Laboratorinė medicina.
2020, t. 22, Nr. 2(86), p. 98–100.

Šigeliozės diferencinė diagnostika: šigelių sukelto gastroenterito klinikinis atvejis

Justina Kapeckaitė[1]
Almina Bajoriūnienė[2]
Silvija Kiverytė[2, 3]

Santrauka

Įvadas. *Shigella* spp. yra *Enterobacterales* šeimai priklausančios gramneigiamos, nejudrios lazdelės sukeliančios ūmų viduriavimą – šigeliozę. Tai didelio invazyvumo patogenas (infekcinė dozė yra 10–100 organizmų), perduodamas fekaliniu-oraliniu būdu. Nors *Shigella* spp. ir *E. coli* pagal biochemines savybes ir klinikinį reikšmingumą yra visiškai skirtingos rūšys, šias bakterijas diferencijuoti laboratoriniais metodais ne visada lengva.

Klinikinis atvejis. Keturiolikos metų mergaitė po atostogų Egipte greitosios pagalbos automobiliu atvežta į Priėmimo ir skubiosios pagalbos skyrių dėl didelio karščiavimo (iki 40 C), pykinimo, bendro silpnumo, viduriavimo kraujingomis išmatomis. Gydymui skirtas intraveninis ceftriaksonas, o būklei negerėjant – peroralinis metronidazolis. Rotavirusų, adenovirusų ir norovirusų antigenų testai išmatose buvo neigiami, *C. difficile* toksinų imunochromatografiniu metodu nerasta, gripo A bei gripo B antigenų nosiaryklėje neaptikta. Kraujo ir išmatų pasėliai taip pat neigiami. Mikroskopiškai išmatose buvo matomas leukocitų bei eritrocitų pilnas regėjimo laukas. Pilvo ultragarsiniu tyrimu pastebėti storosios žarnos uždegimo požymiai. Aštuntą hospitalizacijos parą pacientei pasireiškė neinfekcinio perikardito klinika. Dešimtą parą iš išmatų išaugo *Shigella flexneri* 2a bei *Candida albicans*. Pacientei paskirtas biseptolis, o būklei pagerėjus išleista gydytis ambulatoriškai.

Išvados. *Shigella* spp. ir *E. coli* fenotipinis panašumas itin didelis, tad diferencinė diagnostika reikalauja atidumo. Vienas pirmųjų šigeliozės diagnostikos metodų yra selektyviųjų terpių metodas. Neigiamas pasėlis nebūtinai leidžia atmesti šigeliozės tikimybę. Kadangi laktozės neskaidančių *E. coli* kolonijų aiškiai diferencijuoti nuo *Shigella* spp. masių spektrometrijos metodu MALDI TOF negalima, todėl šigelių diferencinei diagnostikai turi būti daromi papildomi tyrimai.

Reikšminiai žodžiai: šigeliozė, gastroenteritas, išmatų pasėlis, MALDI-TOF MS, automatizuotos mikroorganizmų identifikavimo sistemos.

[1]*Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas*
Faculty of Medicine, Vilnius University
El. paštas: jurika9@gmail.com

[2]*Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras*
Center of Laboratory Medicine, Vilnius University Hospital Santaros Klinikos

[3]*Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra*
Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University

ĮVADAS

Shigella spp. yra *Enterobacterales* šeimai priklausančios gramneigiamos, nejudrios lazdelės, sukeliančios ūmų viduriavimą – šigeliozę. *Shigella* spp. gentyje yra keturios rūšys: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* ir *S. sonnei*. Kiekvienoje rūšyje yra keletas serotipų. Šie serotipai skirstomi pagal O antigeno (O-Ag) struktūrą [1–3]. Šiuo metu pasaulyje paplitusios *Shigella* spp. endeminės formos: *S. flexneri* labiausiai paplitusi besivystančiose šalyse, o *S. sonnei* – išsivysčiusiose šalyse. *S. dysenteriae* atvejai fiksuojami retai [4, 5]. Iki 90 % šigeliozės atvejų tokiose šalyse kaip Kinija, Pietų bei Pietryčių Azija,

Egiptas, Kenija ir Peru nustatoma *S. flexneri*. Dažniausiai aptinkamas *S. flexneri* O serotipas yra 2a, kiek rečiau – 3a ir 6 [6]. Tai didelio invazyvumo patogenas (infekcinė dozė 10–100 organizmų), plintantis fekaliniu-oraliniu būdu [7]. *S. flexneri* bakterijos, transcitozės būdu per M ląsteles kirtusios žarnų epitelio barjerą, susiduria su žarnų makrofagais. Fagocituotos makrofagų šigelės inicijuoja ląstelių apoptozę. Žuvę makrofagai išskiria uždegimo mediatorius: interleukiną 1 (IL-1b) ir IL-18. IL-1 sukelia uždegiminį atsaką žarnų epitelyje, o IL-18 aktyvuoja NK ląsteles bei skatina gama interferono (IFN-) gamybą. Išsilaisvinusios iš žuvusių makrofagų šigelės infiltruoja enterocitus pro jų pamatinę membraną. Pažeisti enterocitai išskiria chemokiną IL-8. Jis skatina polimorfonuklearinių neutrofilų migraciją į infekcijos vietą. Neutrofilams sunaikinus žarnų epitelio vientisumą, sutrinka vandens, maisto medžiagų bei mineralų absorbcija, todėl pasireiškia vandeninga diarėja, išmatose gali būti kraujo ir gleivių [8, 9]. Ligai taip pat būdingas febrilus karščiavimas, vėmimas, tenezmai. Inkubacinis laikotarpis – apytikriai trys paros, o pirmieji simptomai gali pasireikšti po dvylikos valandų ar kelių parų po užsikrėtimo. Kadangi antibiotikai palengvina ir sutrumpina ligos eigą bei apsaugo nuo komplikacijų, antibakterinis gydymas rekomenduojamas vidutinei ar sunkiai šigeliozei gydyti [10]. Šigeliozės diagnozė patvirtinama išskyrus sukėlėją iš išmatų. Nors *Shigella* spp. ir *E. coli* pagal biochemines savybes ir klinikinį reikšmingumą yra visiškai skirtingos rūšys, šias bakterijas diferencijuoti laboratoriniais metodais ne visada lengva [11].

KLINIKINIS ATVEJIS

Keturiolikos metų mergaitė GMP atvežta į Priėmimo ir skubiosios pagalbos skyrių dėl didelio karščiavimo (iki 40 C), pykinimo, bendro silpnumo. Tą pačią dieną po pietų pacientė suviduriavo (iš viso 10 kartų) skystomis, gelsvai žaliomis, vandeningomis išmatomis su gleivių priemaiša, taip pat du kartus vėmė.

Iš epidemiologinės anamnezės žinoma, jog mergaitė susirgo iš karto, kai grįžo iš Egipto, kur praleido savaitę. Taip pat kartu su mergaite serga Egipte buvusi jos mama, teta ir pusseserė.

Hospitalizavimo dieną pacientė karščiavo, jai buvo nustatyta tachikardija (136 k/min) bei leukocitozė (12,21 × 10^9/l). Dėl įtariamos žarnyno infekcijos skirtas intraveninis ceftriaksonas, elektrolitų infuzijos.

Rotavirusų, adenovirusų ir norovirusų testai išmatose buvo neigiami, *C. difficile* toksinų imunochromatografiniu metodu nerasta, gripo A bei gripo B antigenų nosiaryklėje neaptikta. Kraujo ir išmatų pasėliai taip pat neigiami. Mikroskopiškai išmatose buvo matomas leukocitų bei eritrocitų pilnas regėjimo laukas. Atliekant pilvo UG tyrimą pastebėti storosios žarnos uždegimo požymiai. Būklei negerėjant, šeštą hospitalizacijos parą skirtas peroralinis metronidazolis.

Aštuntą hospitalizacijos parą pacientė pasiskundė skausmu širdies plote, plintančiu į kairę ranką. EKG registruota sinusinė tachikardija, sutrikusi repoliarizacija skilvelių miokarde. UG tyrimu nustatytas padidėjęs skysčio kiekis perikarde, širdies funkcija nesutrikusi. Kreatinkinazės kiekis buvo 46 U/l, troponino I – 62 ng/l, o pakartojus troponino I tyrimą kitą dieną – 2 ng/l. Dėl neinfekcinio perikardito skirtas verošpironas, ibuprofenas ir pananginas.

Dešimtą parą iš išmatų pasėlio išaugo *S. flexneri* 2a, atspari ampicilinui, cefuroksimui ir ceftriaksonui. Bakterija buvo jautri amoksicilinui, ampicilinui/sulbaktamui ir ciprofloksacinui. Išmatų pasėlyje taip pat augo *C. albicans*, jautri nistatinui ir flukonazoliui. Gavus antibiogramos atsakymus, pacientei paskirtas biseptolis.

Gydomos ligoninėje pacientės būklė gerėjo. Mergaitė nebeviduriavo, skysčio perikardo ertmėje dinamika buvo teigiama. Praėjus šešiolikai parų nuo hospitalizacijos pradžios, ji išleista gydytis ambulatoriškai.

DISKUSIJOS

Šigeliozės atvejų Lietuvoje pasitaiko nedaug, beveik visi atvejai yra įvežtiniai [12]. Nors šiuo konkrečiu atveju iš pirmo karto ir nepavyko išauginti patogeninių bakterijų kultūros, atsižvelgiant į epidemiologinę anamnezę bei viduriavimo pobūdį buvo įtartas patogeninių bakterijų sukeltas infekcinis enterokolitas.

Shigella spp. diferencijuoti nuo nepatogeninių *E. coli* kaip atrankinis tyrimas taikomas selektyviųjų terpių metodas. Selektyviosiose terpėse (Hectoen, X.L.D.) yra laktozės ir spalvinio indikatoriaus, parodančio jos fermentaciją.

Ant *Hectoen* agaro augančios nepatogeninės *E. coli* padermės skaido laktozę – Laktozė (+), todėl jų kolonijos dažosi oranžiškai geltona spalva dėl išsiskyrusių rūgščių. Tačiau šigelės yra laktozės neskaidančios bakterijos ir nuo nepatogeninių rūšių jas galima atskirti pagal šviesiai žalią ar žalsvai melsvą spalvą [13]. *MacConkey* agaras taip pat tinkamas laktozę skaidančioms bakterijoms diferencijuoti nuo laktozės neskaidančių. Laktozę skaidančių bakterijų kolonijos auga apvaliomis, neskaidriomis, rožinėmis kolonijomis. Laktozės neskaidančios bakterijos ant *MacConkey* agaro auga plokštokomis, bespalvėmis, skaidriomis kolonijomis be precipitacijos zonos [14]. Atsižvelgiant į laktozės skaidymo požymius, atrenkamos šigelių įtarimą keliančios kolonijos detalesniam ištyrimui.

Visi galimi patogenai, esantys mėginyje, ne visada gali būti užauginami naudojant vieną mitybinę terpę. Dėl tos priežasties ieškant šigelių visada turėtų būti sėjama ne tik selektyvioji, bet ir neselektyvioji terpė. Kai kurioms šigelių rūšims gali būti reikalinga ilgesnė inkubacija [15].

Jei aptinkamos kolonijos, panašios į patogeninių žarnyno bakterijų kolonijas, pagal tolesnį diagnostinį algoritmą įprastai jos tiriamos pasitelkiant MALDI-TOF MS (angl. *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*) masių spektometrijos analizės metodą. Tačiau MALDI-TOF masių spektometru negalima patikimai atskirti *E. coli* nuo *Shigella* spp., todėl rekomenduojami papildomi testai [16–19]. Šigelių diferencinei diagnostikai yra daromi šie papildomi tyrimai: biocheminis aktyvumas tiriamas „margosios eilutės“ metodu, naudojamos kitos automatizuotos mikroorganizmų identifikavimo sistemos. Patvirtinus šigeles, agliutinuojančiais serumais nustatoma *Shigella* rūšis [20].

IŠVADOS

Shigella spp. ir *E. coli* fenotipinis panašumas itin didelis, tad diferencinė diagnostika reikalauja atidumo. Vienas pirmųjų šigeliozės diagnostikos metodų yra selektyviųjų terpių metodas. Šigelė – laktozės neskaidanti bakterija, todėl ant *Hectoen* agaro auga žalsvomis, o ant *MacConkey* – bespalvėmis, plokščiomis kolonijomis. Neigiamas išmatų pasėlis nebūtinai leidžia atmesti šigeliozės tikimybę. Kadangi laktozės neskaidančių *E. coli* kolonijų aiškiai diferencijuoti nuo *Shigella* spp. masių spektometrijos metodu MALDI TOF negalima, todėl šigelių diferencinei diagnostikai turi būti daromi papildomi tyrimai „margosios eilutės“ ir kitais automatizuotais mikroorganizmų identifikavimo sistemų metodais, taip pat agliutinuojančiais serumais nustatoma *Shigella* rūšis. ◆

Gauta: 2020 06 07
Priimta spaudai: 2020 06 30

Summary

SHIGELLOSIS DIFFERENTIAL DIAGNOSIS: A CASE REPORT OF SHIGELLA GASTROENTERITIS

Justina Kapeckaitė, Almina Bajoriūnienė, Silvija Kiverytė

Background. *Shigella*, a member of *Enterobacterales* family, is a gramnegative, nonmotile rod. It is a common cause of acute diarrheal disease called shigellosis. *Shigella* is highly infectious (a minimum inoculum of only 10–100 organisms) and is transmitted via the fecal-oral route. Phenotypically, *Shigella* spp. and *E. coli* share many common characteristics, yet they have separate entities in epidemiology and clinical disease, which poses a diagnostic challenge.

Clinical presentation. A 14-year-old girl was brought to Emergency Department by ambulance. The patient was presented with febrile fever (40 C), nausea, general weakness and bloody diarrhoea. The patient was prescribed with ceftriaxone empirically, however, the antibiotic treatment was ineffective and it was decided to add metronidazole perorally. Rotavirus, adenovirus and norovirus antigen tests results were negative, *C. difficile* toxins were negative, influenza antigens A and B were negative. Blood and stool cultures were also negative. Stool microscopy – a full screen of leucocytes and erythrocytes was observed. During abdominal ultrasound colitis signs were revealed. On the eighth day of hospitalization symptoms of non-infectious acute pericarditis have appeared. On the tenth day a *Shigella flexneri* 2a and *Candida albicans* were isolated from the bacterial culture. The treatment was changed to biseptol. After subdue of disease, the patient was discharged from hospital.

Conclusion. *Shigella* spp. and *E. coli* are very difficult to distinguish phenotypically, therefore a differential diagnosis must be done with outmost care. Primary diagnostic method for shigellosis is culture on selective media. Negative culture does not rule out a possibility of shigellosis. MALDI-TOF MS cannot differentiate between lactose negative *E. coli* and *Shigella* spp., so additional diagnostic methods must be applied in case of shigellosis suspicion.

Keywords: shigellosis, gastroenteritis, stool culture, MALDI-TOF MS, automated microbial identification system.

LITERATŪRA

1. Ranjbar R, Farahani A. Shigella: antibiotic-resistance mechanisms and new horizons for treatment. Infect Drug Resist 2019; 12: 3137–67.
2. Gwaham P, Monajemzadeh M, Ashtiani MTH, Mamishi S. Shigellosis and changes of antimicrobial susceptibility during six years. Iran Pediatr 2017; 27(3): e5131.
3. Wang Y, Ma Q, Hao R, Zhang Q, Yao S, Han J, et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of Shigella spp. in Shanxi Province, China, during 2006–2016. BMC Microbiology 2019; 19: 116.
4. Edward S, Mureithi E, Hindawi NS. Shigellosis dynamics: modelling the effects of treatment, sanitation, and education in the presence of carriers. Int J Math Math Sci 2020; 2020: Article ID 3476458.
5. Taneja N, Mewara A. Shigellosis: epidemiology in India. Indian J Med Res 2016; 143(5): 565–76.
6. Ravenscroft N, Braun M, Schneider J, Dreyer AM, Wetter M, Haeuptle MA, et al. Characterization and immunogenicity of a Shigella flexneri 2a O-antigen bioconjugate vaccine candidate. Glycobiology 2019; 29(9): 669–81.
7. Quinn E, Najjar Z, Huhtinen E, Jegasothy E, Gupta L. Culture-positive shigellosis cases are epidemiologically different to culture-negative/PCR-positive cases. Public Health 2019; 43(1): 41–5.
8. Watson JL, Sanchez-Garrido J, Goddard PJ, Torraca V, Mostowy S, Shenoy AR, et al. *Shigella sonnei* O-antigen inhibits internalization, vacuole escape, and inflammasome activation. mBio 2019; 10(6): e02654–19.
9. Ranganathan MS, Doucet M, Grassel CL, Delaine-Elias B, Zachos NC, Barry EM. Evaluating Shigella flexneri pathogenesis in the human enteroid model. Infect Immun 2019; 87(4): e00740–18.
10. Aslam A, Okafor CN. Shigella (Shigellosis). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482337/
11. Ragupathi NKD, Sethuvel DPM, Inbanathan FY, Veeraraghavan B. Accurate differentiation of Escherichia coli and Shigella serogroups: challenges and strategies. New Microbes New Infect 2018; 21: 58–62.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. 18 Dec 2018. https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/shigellosis-annual-epidemiological-report-2016
13. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Overview of bacteria. In: Microbiology and molecular diagnosis in pathology. Elsevier, 2017; 75–117. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805351-5.00006-5
14. Wanger A, Chavez V, Huang RSP, Wahed A, Actor JK, Dasgupta A. Media for the clinical microbiology laboratory. In: Microbiology and molecular diagnosis in pathology. Elsevier, 2017; 51–60. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805351-5.00004-1
15. Lampel KA. Shigella: introduction and detection by classical cultural and molecular techniques. In: Batt CA, Tortorello ML, eds. Encyclopedia of food microbiology. 2nd ed. Academic Press, 2014; 408–14. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00308-6
16. Sethuvel DPM, Ragupathi NKD, Anandan S, Walia K, Veeraraghavan B. Molecular diagnosis of non-serotypeable Shigella spp.: problems and prospects. J Med Microbiol 2017; 66: 255–57.
17. van den Beld MJC, Rossen JWA, Evers A, Kooistra-Smid AMD, Reubsaet FAG. Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight mass spectrometry using a custom-made database, biomarker assignment or mathematical classifiers does not differentiate Shigella spp. and Escherichia coli. bioRxiv 2019; 714295. https://doi.org/10.1101/714295
18. van den Beld M. Shigella spp. and entero-invasive Escherichia coli: diagnostics, clinical implications and impact on public health. Groningen: University of Groningen, 2019; 296 p. https://doi.org/10.33612/diss.101452646
19. Porte L, García P, Braun S, Ulloa MT, Lafourcade M, Montaña A, et al. Head-tohead comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in Chile. PLoS ONE 2017: 12(5): e017792.
20. Darbandi F. Parallel comparison of accuracy in Vitek2 auto analyzer and API 20 E/ API 20 NE Microsystems. Master thesis. University of Boras, 2010. http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1312339/FULLTEXT01.pdf