

ХОЛЕРА.

Vibrio cholerae: Холерный вибрион под электронным микроскопом



Холера на современном этапе



Холера – острое инфекционное антропонозное заболевание, относящееся к группе карантинных (особо опасных), с фекально-оральным механизмом передачи.

Характеризуется быстрым развитием обезвоживания организма вследствие потерь жидкости электролитов, с водянистым стулом и рвотой, и возможными осложнениями в виде гиповолемического шока и ОПН.





**ХОЛЕРА- особо опасная инфекционная
болезнь
с диарейным синдромом
Фекально-оральный механизм передачи
возбудителя
Водный, пищевой, контактный путь
распространения
Инкубационный период - 1-5 дней
В странах умеренного климата – летне-
осенняя
сезонность
с греч. *Холера* - «желоб»**

(Р.Кох открыл возбудителя холеры в 1883г)

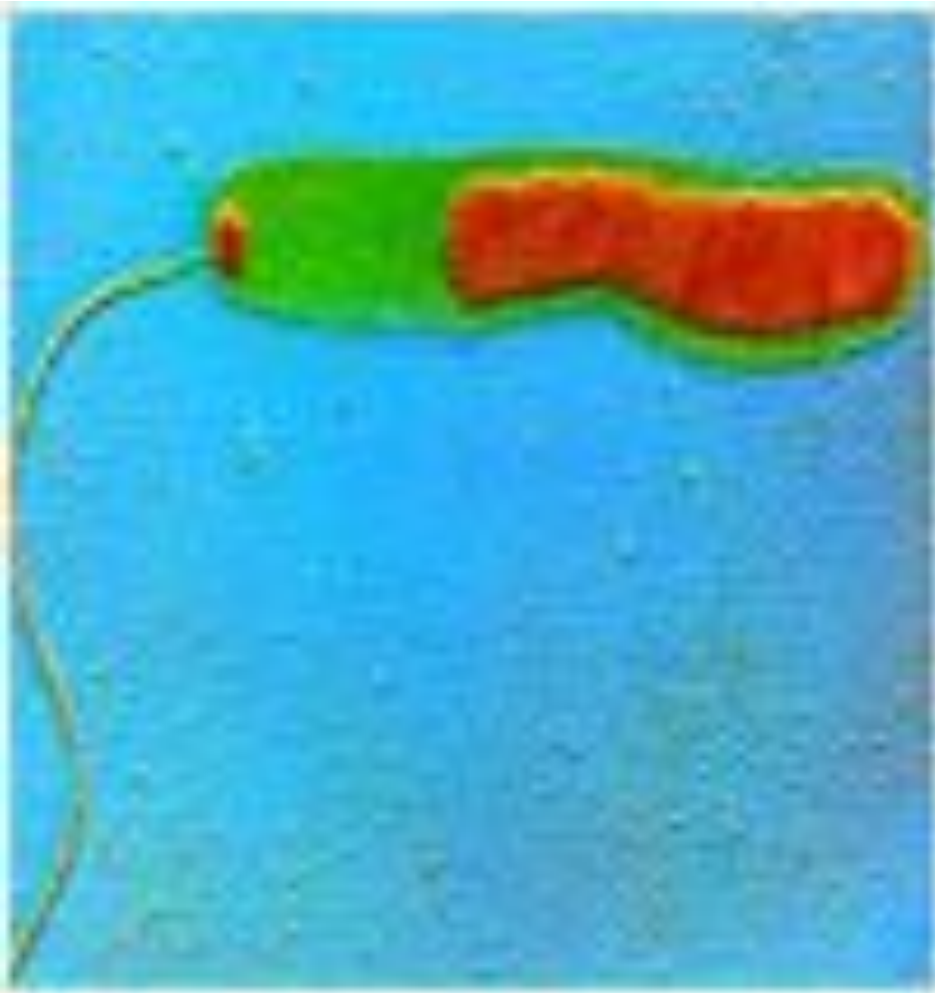
**Холера представляет собой явление в высшей степени
сложное, загадочное.**

**Это, в буквальном смысле слова - сфинкс, который нас
приводит в ужас своим смертоносным взглядом, но которого мы
до сих пор понять не можем, несмотря на то, что разгадкой его
заняты тысячи ученых во всех странах мира”.**

Эрисман Ф.Ф., высказывание датируется примерно 1887годом

Возбудитель холеры - холерные вибрионы.

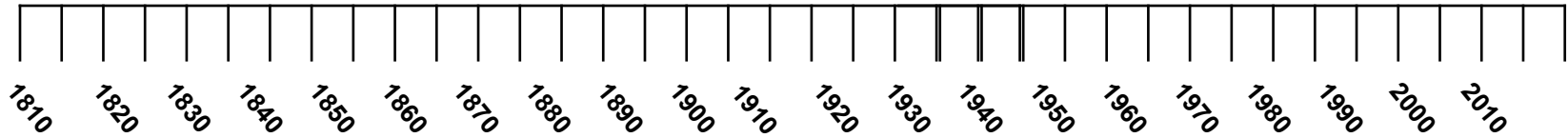
Это небольшая грамотрицательная палочка в форме запятой, любит тепло. Единственным источником заразного начала при холере являются люди, выделяющие вибрионы во внешнюю среду главным образом с испражнениями и реже с рвотными массами.



История

- Человечество на протяжении всей своей истории время от времени страдало от разрушительных вспышек холеры. Ещё Гиппократ и Гален писали об этой болезни, а многочисленные сведения указывают на то, что болезнь уже знали в античные времена на равнинах Ганга.
- Современные представления о холере начали появляться лишь к началу 19-го века, когда начались первые исследования, направленные на лучшее понимание причин возникновения и распространения этой болезни и способов её адекватного лечения.
- Однако до середины 20-го века холера оставалась одной из наиболее опасных эпидемических болезней, уносящая сотни тысяч и даже миллионы жизней.
- В современном мире холера уже не представляет такой опасности, какую представляла раньше, однако до сих пор регистрируют отдельные случаи и даже вспышки эпидемии холеры в развивающихся и бедных странах, и особенно при массовых стихийных бедствиях, например, при землетрясениях.

Хронология пандемий холеры (1817 – 2011 гг.)



Первые пять пандемий
1817-1896
Биовар Classica?



6-я пандемия
1899-1923
Биовар
Classica



Межпандеми-
ческий период
1923-1961



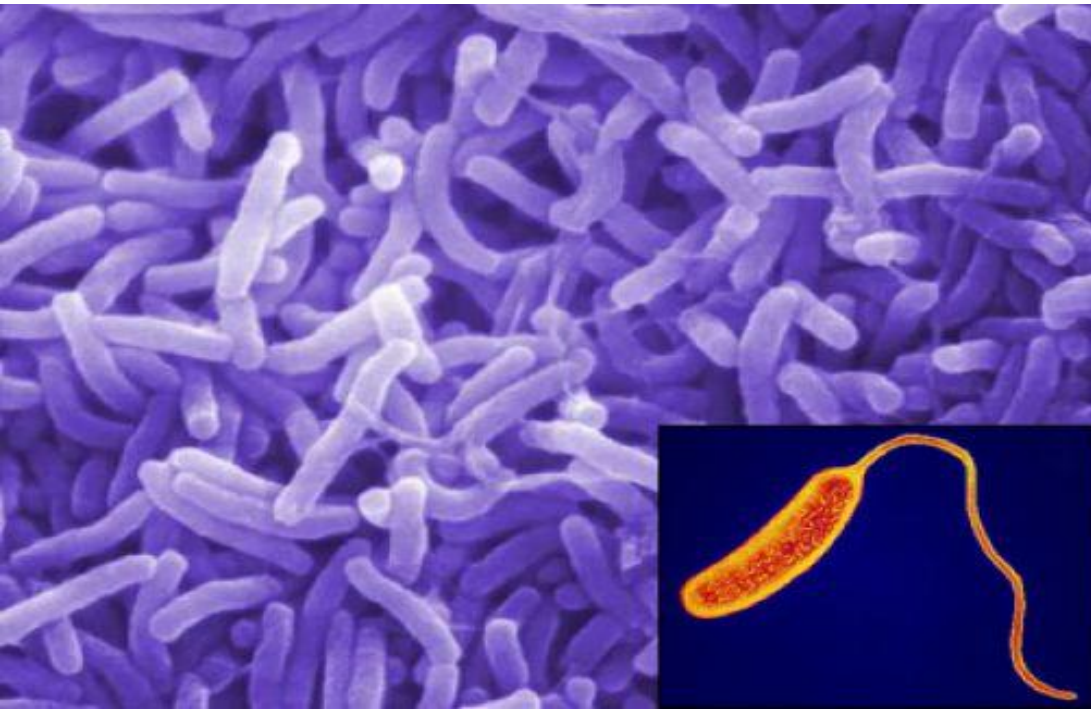
7-я пандемия
1961 - наст. время
Биовар El Tor



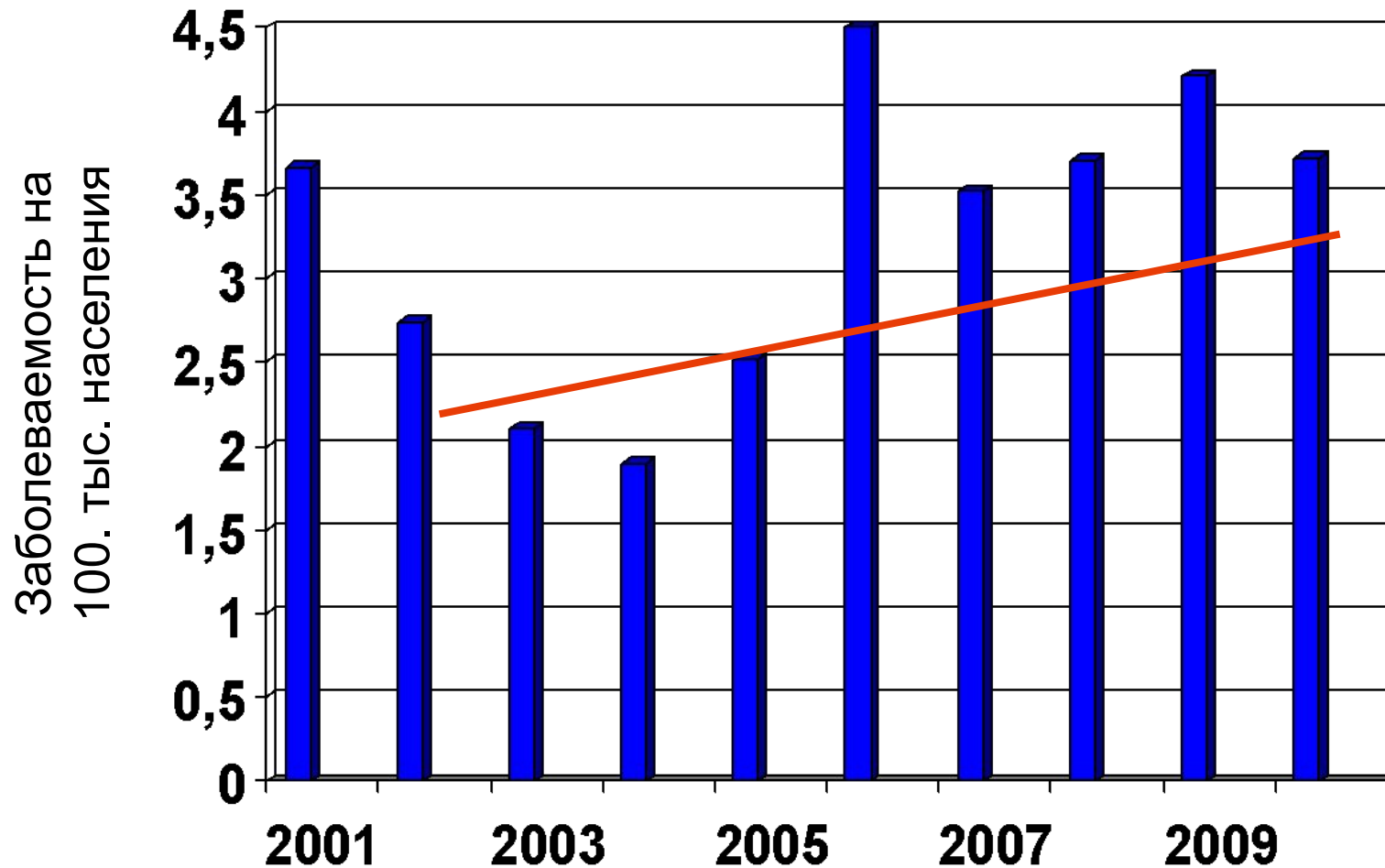
Серогруппа O139 (биовар
Bengal)
1992 - наст. время



Атипичные
El Tor штаммы
1991 – наст. время



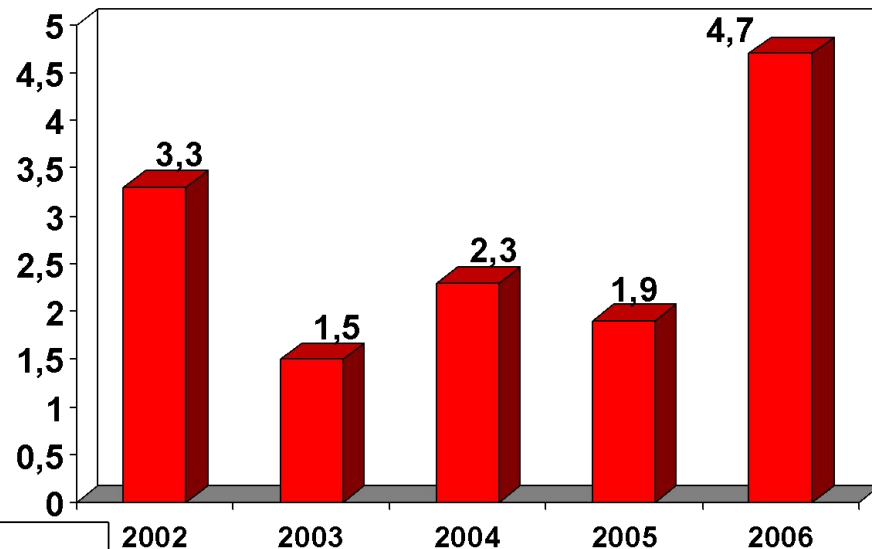
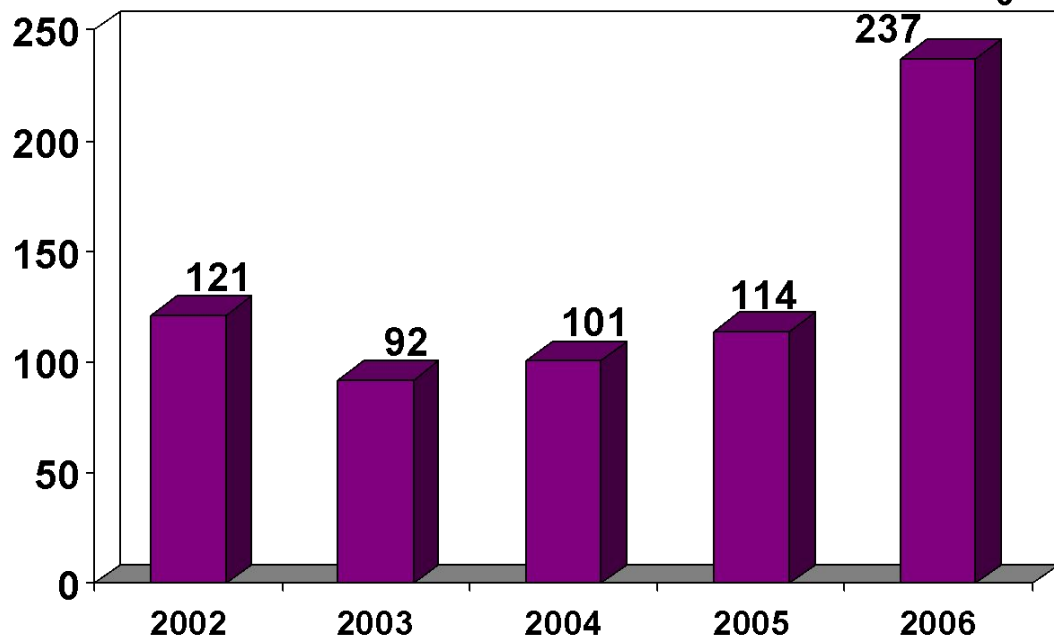
Анализ динамики заболеваемости холерой в мире



Численность больных и умерших от холеры в мире (2002-2006 г.), тыс.

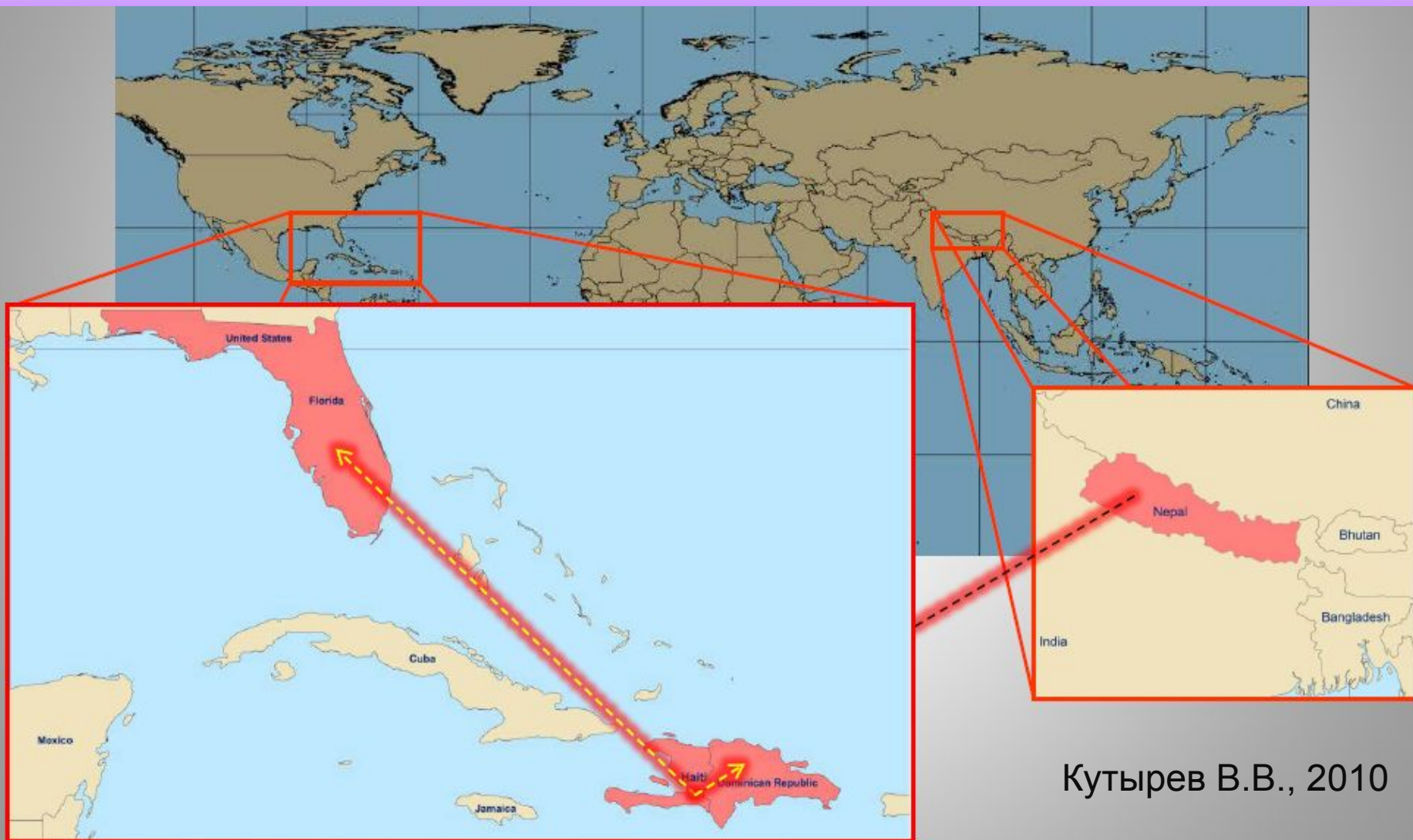
2007 г. эпидемии в Ираке, Конго
2008 г. – Вьетнам

■ - Больные ■ - Умершие



Малеев В.В.,
2011

Эпидемия холеры на Гаити и в Непале в 2010 году



Кутырев В.В., 2010

Всего 268 000 случаев, из них 4758 летальных

Завозные случаи холеры в России в 1997-2010 гг.



ЭТИОЛОГИЯ

- Известно более 150 серогрупп *Vibrio cholerae*; их разделяют на агглютинирующуюся типовой холерной сывороткой O1 (*V. cholerae* O1) и на не агглютинирующуюся типовой холерной сывороткой O1 (*V. cholerae non O1*).

- «Классическая» холера вызывается холерным вибрионом серогруппы O1 (*Vibrio cholerae* O1).

Различают два биовара (биотипа) этой серогруппы:

классический (Vibrio cholerae biovar cholerae) и

Эль-Тор (Vibrio cholerae biovar eltor).

- По морфологическим, культуральным и серологическим характеристикам они сходны: короткие изогнутые подвижные палочки, имеющие жгутик, грамотрицательные аэробы, хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, спор и капсул не образуют, растут на щелочных средах (рН 7,6-9,2) при температуре 10-40 °С.
- Холерные вибрионы Эль-Тор в отличие от классических способны гемолизировать эритроциты барана (не всегда).

В том числе патогенные для человека:

- V. alginolyticus*;
- V. cincinnatiensis*;
- V. damsela*;
- V. fluvialis*;
- V. furnissii*;
- V. harveyi*;
- V. hollisae*;
- V. metschnikovii*;
- V. mimicus*;
- V. parahaemolyticus*;
- V. vulnificus*

Семейство ***Vibrionaceae***

Типовой род ***Vibrio***

Типовой вид ***Vibrio cholerae***

Серогруппы ***Vibrio cholerae***

O1

O139 (*V. cholerae* Bengal)

НАГ-вибрионы
(не-O1/O139) –
свыше 60 серогрупп

Возбудители холеры (токсигенные штаммы),
продуцируют экзотоксин (холероген)

Возбудители
гастроэнтеритов и
системных
инфекций

Биовары *V. cholerae* O1

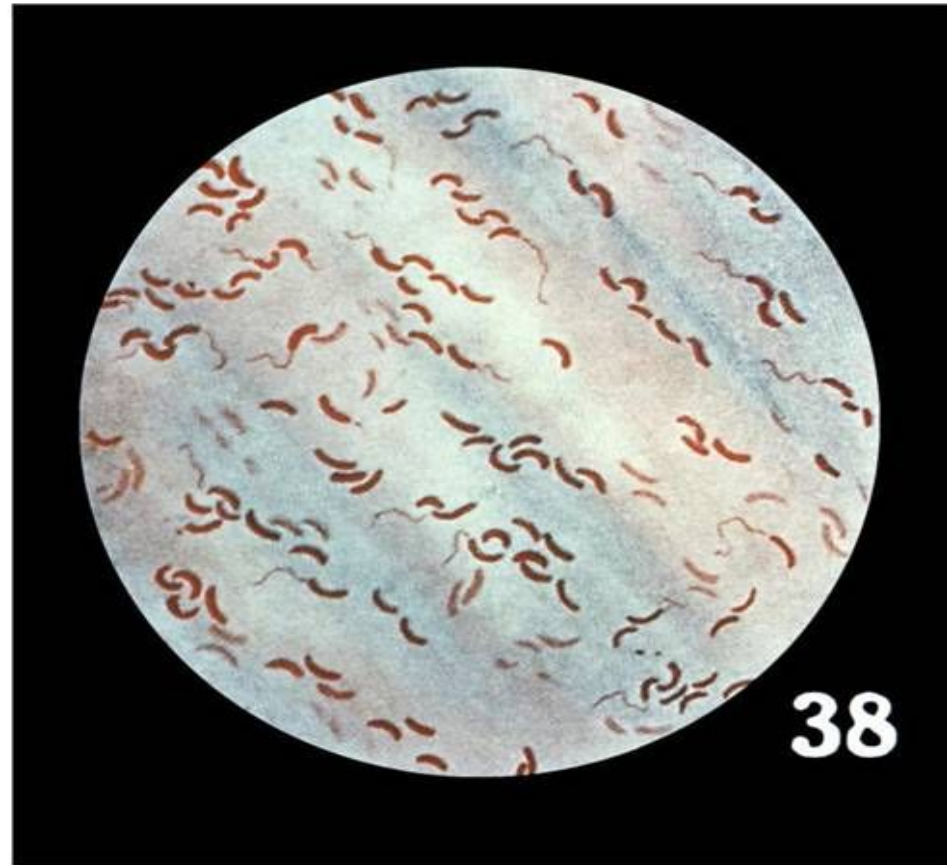
***V. cholerae* classica**

***V. cholerae* El Tor**

Серовары: ***Inaba*, *Ogava*, *Hikojima***

V. cholerae. Окраска по Граму.

Грамотрицательные
прямые или изогнутые
палочки с полярно
расположенным жгутиком,
аэробы (цитохромоксидаза
положительна), хорошо
окрашиваются
анилиновыми
красителями



Антигены

- **O-антиген** (полисахаридная часть ЛПС), термостабильный; по его специфичности выделяют 139 серогрупп, большинство непатогенны; возбудителями холеры являются представители серогрупп O1 (*V.cholerae* биовар *cholerae* и *V.cholerae eltor*) и O139 (*V.cholerae Bengal*)

O- антиген состоит А,В, С компонентов, по сочетанию которых выделяют серотипы Огава(А, В),Инаба (А, С), Гикошима (А,В,С)

- **H-антиген** – жгутиковый белок флагеллин, термолабильный, общий у всех возбудителей холеры
- Капсульный антиген только у *V.cholerae Bengal*

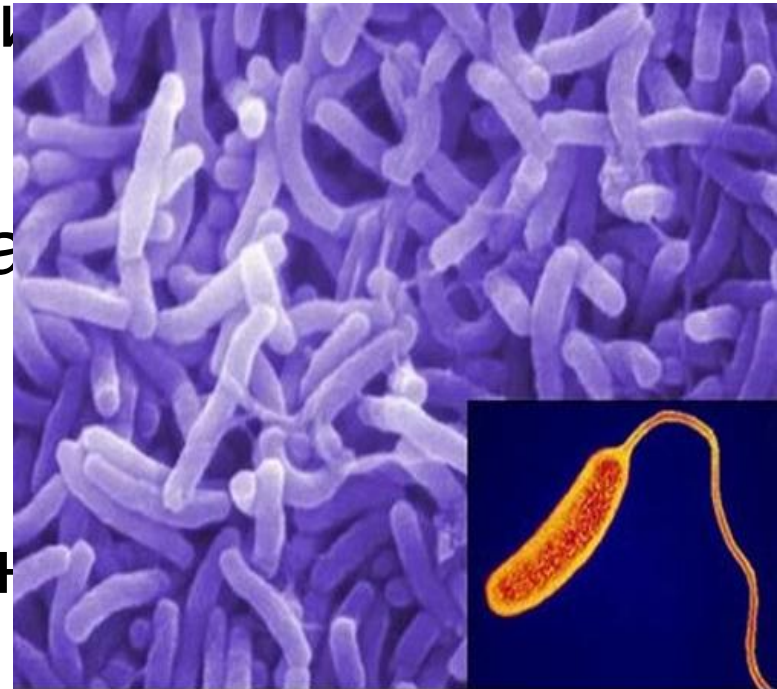
Протективными антигенами считаются: О-аг, Н-аг, белки наружной мембраны, капсульный антиген для серогруппы O139

Факторы патогенности

- Высокая подвижность
- Адгезины и факторы колонизации, связанные с фимбриями
- Муциназа (разрушает муцин и открывает доступ к рецептору – ганглиозиду Gm1); нейраминидаза, протеазы, гемагглютинин
- Эндотоксин, высвобождающийся при разрушении вибрионов (роль в патогенезе неясна, возможно, действует на ССС)
- Главный фактор патогенности – холероген = термолабильный энтеротоксин, сходный по строению и биологическому действию с LT-токсином эшерихий.

Факторы патогенности

- Для колонизации: **жгутик**, **муциназа** (разжижает слизь и облегчает проникновение к поверхности эпителия) и **нейраминидаза** (обеспечивает взаимодействие с микроворсинками).
- Эндотоксин холеры — термостабильный ЛПС, сходный по структуре и активности с эндотоксинами прочих грамотрицательных бактерий. Он проявляет иммуногенные свойства, индуцируя синтез вибриоцидных АТ.



blogspot.com->novostey.com

Патогенез

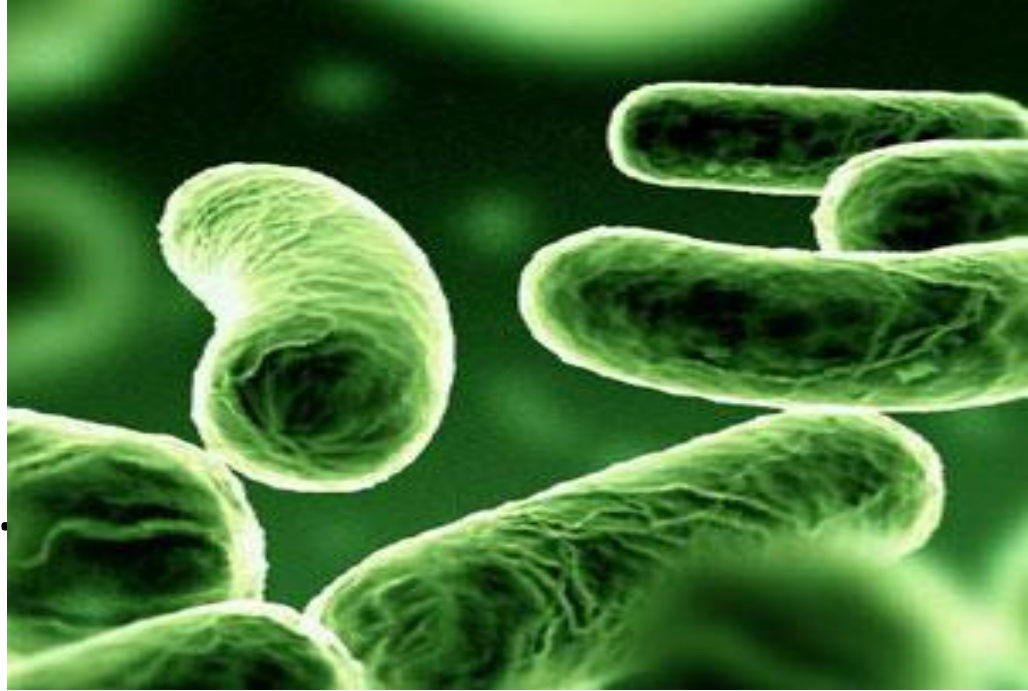
- **Симптомы заболевания вызываются не самим холерным вибрионом, а продуцируемым им холерным токсином.**
- Входными воротами инфекции является пищеварительный тракт. Часть вибрионов гибнет в кислой среде желудка под воздействием соляной кислоты.
- Преодолев желудочный барьер, микроорганизмы проникают в тонкий кишечник, где, найдя благоприятную щелочную среду, начинают размножаться. У больных холерой возбудитель может быть обнаружен на всем протяжении желудочно-кишечного тракта, но в желудке при рН не более 5,5 вибрионы не обнаруживаются.
 - Вибрионы колонизируют поверхность эпителия тонкого кишечника, не проникая внутрь его и выделяют холерный токсин (англ. СТХ) — **белковый энтеротоксин, состоящий из двух частей: субъединицы А и субъединицы В.**

Патогенез

- В результате происходит активация **аденилатциклазы**, приводящая к повышению содержания циклического **аденозинмонофосфата (цАМФ)** — одного из внутриклеточных стимуляторов кишечной секреции.
- Присутствие повышенного цАМФ ведёт к выделению в просвет кишечника огромного количества изотонической жидкости с низким содержанием белка и высокой концентрацией ионов натрия, калия, хлоридов, гидрокарбонатов.
- Развивается диарея, рвота и обезвоживание. Потеря жидкости, гидрокарбонатов и калия ведёт к развитию метаболического ацидоза, гипокалиемии.

- **Экзотоксин холеры (холероген)** — термолабильный белок.

- Включает 2 компонента — А и Б.



Компонент Б взаимодействует с рецепторами эпителия тонкой кишки, облегчая проникновение в клетку компонента А.

Компонент А приводит к увеличению внутриклеточного содержания цАМФ (аденозинмонофосфат а) и выходу жидкости и электролитов в просвет кишечника.

Патогенез холеры (продолжение)

Потеря воды и электролитов приводит к обезвоживанию организма:

- Падает артериальное давление
- Нарушается микроциркуляция
- Развивается гипоксия тканей
- Метаболический ацидоз
- Гипокалиемия
- Острая почечная недостаточность
- Сердечная недостаточность
- Возможен гиповолемический шок



Эпидемиология

- **Все способы передачи холеры являются вариантами фекально-орального механизма.**
- **Источником инфекции** является человек — больной холерой и здоровый (транзиторный) вибриононоситель, выделяющие в окружающую среду *Vibrio cholerae* с фекалиями и рвотными массами.
 - **Большое значение** для распространения заболевания играют здоровые вибриононосители. Соотношение носители/больные может достигать 4:1 при варианте *Vibrio cholerae* O1 и 10:1 при non-O1 *Vibrio cholerae* (НАГ-вибрионы).
- **Заражение происходит** главным образом при питье необеззараженной воды, заглатывании воды при купании в загрязнённых водоёмах, во время умывания, а также при мытье посуды заражённой водой.
- Заражение может происходить **при употреблении пищи**, инфицированной во время кулинарной обработки, её хранения, мытья или раздачи, особенно продуктами, не подвергающимися термической обработке (моллюски, креветки, вяленая и слабосоленая рыба).
 - **Возможен контактно-бытовой (через загрязнённые руки) путь передачи.** Кроме того, холерные вибрионы могут переноситься **мухами.**

- **Во внешнюю среду** холерный вибрион выделяется 4 категориями лиц, эпидемиологическое значение которых различно:
- больными с выраженной формой холеры в остром периоде заболевания;
- лицами, находящимися в периоде выздоровления после перенесенной холеры, т.е. реконвалесцентами;
- лицами со стертыми формами холеры;
- здоровыми вибрионовыделителями, т.е. заразившимися, но незаболевшими.

Эпидемиология

- **Инкубационный период** длится от нескольких часов до 5 суток, чаще 24-48 часов.
- Тяжесть заболевания варьирует — от стёртых, субклинических форм до тяжёлых состояний с резким обезвоживанием и смертью в течение 24-48 часов.
- По данным ВОЗ «многие пациенты, инфицированные *V. cholerae*, не заболевают холерой несмотря на то, что бактерии присутствуют в их фекалиях в течение 7-14 дней.
- В 80-90 % тех случаев, когда развивается болезнь, она принимает формы лёгкой или средней тяжести, которые трудно клинически отличить от других форм острой диареи.
- Менее чем у 20 % заболевших людей развивается типичная холера с признаками умеренного или тяжёлого обезвоживания.
- Для типичной клинической картины холеры характерно три степени течения.

Лёгкая степень При этой форме наблюдается жидкий стул и рвота, которые могут быть однократными. Обезвоживание не **превышает 1-3 % массы тела (дегидратация 1-й степени)**. Самочувствие больного удовлетворительное. Жалобы на сухость во рту, повышенную жажду, мышечная слабость. Такие больные не всегда обращаются за медицинской помощью, чаще всего их обнаруживают в очагах. Через 1-2 дня всё прекращается.

Среднетяжёлая степень Начало заболевания острое, с частым стулом до 15-20 раз в сутки, который постепенно теряет каловый характер и принимает вид рисового отвара. При поносе отсутствует боль в животе, тенезмы. Иногда могут быть незначительные боли в области пупка, дискомфорт, урчание и «переливание жидкости» в животе. Вскоре к поносу присоединяется обильная рвота без тошноты. Нарастает обезвоживание, **потеря жидкости составляет 4-6 % массы тела (дегидратация 2-й степени)**. Появляются судороги отдельных групп мышц. Голос становится сиплым. Больные жалуются на сухость во рту, жажду, слабость. Отмечается цианоз губ, иногда акроцианоз. Тургор кожи уменьшается. Тахикардия.

Тяжёлая степень Характеризуется выраженной степенью обезвоживания с **утратой 7-9 % жидкости и нарушением гемодинамики (дегидратация 3-й степени)**. У больных отмечается частый, обильный и водянистый стул, рвота, выраженные судороги мышц. Артериальное давление падает, пульс слабый, частый. Появляется одышка, цианоз кожного покрова, олигурия или анурия. Черты лица заостряются, глаза западают, голос становится сиплым вплоть до афонии. Тургор кожи снижен, кожная складка не распрямляется, пальцы рук и ног в морщинах. Язык сухой. Отмечается незначительная болезненность в эпигастрии и окологрудной области. Больные жалуются на значительную

Степени обезвоживания у больных холерой по В.И. Покровскому и В.В. Малееву

I ст. – 1-3% массы тела;

II ст. – 4-6% массы тела;

III ст. – 7-9% массы тела;

IV ст. – 10% и более массы тела.

В настоящее время I ст. эксикоза
наблюдается

у 50-60% больных,

II ст. – у 20-25% больных,

III и IV ст. – по 8-10% каждая.



Для типичной клинической картины холеры характерно

- **Острое начало**
- **Диарея: безболезненные обильные дефекации от 3 до 30 в сутки. В некоторых случаях объём испражнений может достигать 250 мл/кг от массы человека за 24 часа.**
- **Характерный стул:** кашицеобразные или жидкие каловые массы, сначала бело-серого цвета затем бесцветные, без запаха и примеси крови, с плавающими хлопьями. **Всё это напоминает «рисовый отвар».**
- **Рвота:** сначала съеденной пищей, затем жидкая типа «рисового отвара».
- **Повышение температуры:** обычно отсутствует, в тяжёлых случаях температура понижена до 35-35,5°C.
- **Обезвоживание:** жажда, сухость слизистых, заострившиеся черты лица, западающие глаза — «лицо Гиппократата», снижение тургора кожи — «руки прачки», гипотония, тахикардия, нитевидный пульс, слабость, заторможенность, ступор.
 - **Олигурия и анурия**
 - Судорожные сокращения жевательных и икроножных мышц.
 - **Гипокалиемия:** сердечные аритмии.

Дегидратационный синдром. Резкое понижение тургора кожи.



Обезвоживание IV степени при холере



Обезвоживание IV степени у больного холерой Эль-Тор

Особенности холеры Эль Тор:

- Длительное вибрионосительство;
- Большая частота стёртых форм и вибрионосительства по сравнению с классическим сероваром (50% и 20% соответственно);
- Преимущественное поражение детей в возрасте 1-5 лет в эндемичных странах.



Лабораторная диагностика

Клинический материал: испражнения, ректальные мазки и др.

Методы:

1. **Бактериологический** –основной метод диагностики;
2. **Серологические методы** (опеделение антител против холерогена, агглютининов, вибриоцидных в сыворотке в реакциях агглютинации, бактериолиза, ИФА, РНГА ит.д.);
3. **Молекулярно-генетический метод** (ПЦР для определения генов, кодирующих факторы патогенности);
4. **Ускоренные методы диагностики** (прямой иммунофлуоресцентный метод, метод иммобилизации вибрионов O1 или O139-сывороткой при микроскопии в темном поле зрения, реакция микроагглютинации с холерной агглютинирующей O-сывороткой).

МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. От больных и исследуемых на вибриононосительство: испражнения, рвотные массы, желчь, загрязненное испражнениями белье (нательное и постельное)
2. Трупный материал: отрезки тонкого кишечника и желчный пузырь
3. Объекты окружающей среды: вода (сточная, открытых водоемов, водопроводная и др.), ил, гидробионты (лягушки, рыба, раки), зоопланктон (дафнии, циклопы), мухи, смывы с объектов окружающей среды
4. Пищевые продукты

ОТБОР И ДОСТАВКА МАТЕРИАЛА

1. Необходимо учитывать

- высокую чувствительность холерных вибрионов к дезинфицирующим средствам и кислотам,
- возможность антагонистического действия сопутствующей микрофлоры
- предполагаемую концентрацию возбудителя в исследуемом материале

Если в материале от больных алгидной формой холеры концентрация возбудителя достигает $10(6) - 10(9)$ м.к./мл, то в испражнениях больных легкой формой и леченных антибиотиками, реконвалесцентов и носителей количество холерных вибрионов обычно не превышает $10(2) - 10(4)$ м.к./г.

2. Для отбора проб использовать чистую стерильную посуду, не содержащую следов дезинфицирующих растворов.
3. Доставлять материал для исследования не позже, чем через 2 часа после его взятия.
4. Использовать транспортные среды в случае удлинения сроков доставки

ТРАНСПОРТНЫЕ СРЕДЫ

- 1% пептонная вода (pH $8,4 \pm 0,1$)
- 1% пептонная вода (pH $8,4 \pm 0,1$)
с теллуридом калия 1:100000-1:200000
- 1% пептонная вода (pH $8,4 \pm 0,1$)
с жидким моющим средством
«Прогресс» в концентрации 0,1-0,2%
 - 2% раствор NaCl

ФОРМА НАПРАВЛЕНИЯ МАТЕРИАЛА ОТ ЛЮДЕЙ

Направление проб от людей в лабораторию _____
для исследования на _____

от " " 200 г.

№ регистрационный (проставляют в лаборатории) _____

№ пробы _____

Первичная или повторная _____

Характер материала _____

Фамилия, И.О. _____

Возраст _____

Диагноз _____

Принимал(а) ли антибиотики; если да, то какие, когда и сколько _____

Адрес места жительства _____

Место работы _____

Время отбора проб (часы, минуты) _____

Пробы отбирали (Ф.И.О., должность, подписи) _____

Пробы доставил (Ф.И.О., должность, подписи) _____

Время доставки пробы (дата, время - часы, минуты) _____

ФОРМА НАПРАВЛЕНИЯ ПРОБ ООС

Направление проб из объектов окружающей среды

в лабораторию _____

для исследования на _____

от " " 200 г.

№ регистрационный (проставляют в лаборатории) _____

№ пробы _____

Место отбора проб _____

Объект для исследования _____

Характер материала _____

Объем (количество) _____

Время отбора проб (часы, минуты)

1. _____

2. _____

3. _____

Пробы отбирали (Ф.И.О., должность, подписи) _____

Пробы доставил (Ф.И.О., должность, подписи) _____

Время доставки проб (дата, часы, минуты) _____

СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Среды обогащения

- 1. основной раствор пептона рН $8,4 \pm 0,1$
- 2. 1% пептонная вода рН $8,4 \pm 0,1$
- 3. 1% пептонная вода с теллуридом калия рН $8,4 \pm 0,1$

Плотные среды для выделения холерных вибрионов

- 1. щелочной мясопептонный агар рН $8,0 \pm 0,2$
- 2. щелочной дрожжевой агар рН $8,0 \pm 0,2$

Элективные среды

- 1. сэдх (сухая элективная дифференциальная среда для выделения холерных вибрионов)
- 2. tsbs

Полиуглеводные среды

- 1. среда ресселя
- 2. лактозо-сахарозная среда
- 3. среда клиглера
- 4. маннозо-сахарозная среда

Посевы исследуемого материала на всех этапах выращивают

- в 1% пептонной воде **6-8 часов**,
- в 1% пептонной воде с теллуридом калия **12-18 часов**,
- на щелочном агаре не менее **14-16 часов**,
- на плотных элективных средах **18-24 часа**.

Теллурид калия следует добавлять в 1% пептонную воду с рН не ниже $8,3 \pm 0,1$ до внесения исследуемого материала.

Продолжительность хранения

- рабочего раствора теллурида калия (1:1000) - 7 дней,
- питательных сред с теллуридом калия - не более 2-х суток при условии содержания в холодильнике.

ПРИНЦИП СХЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

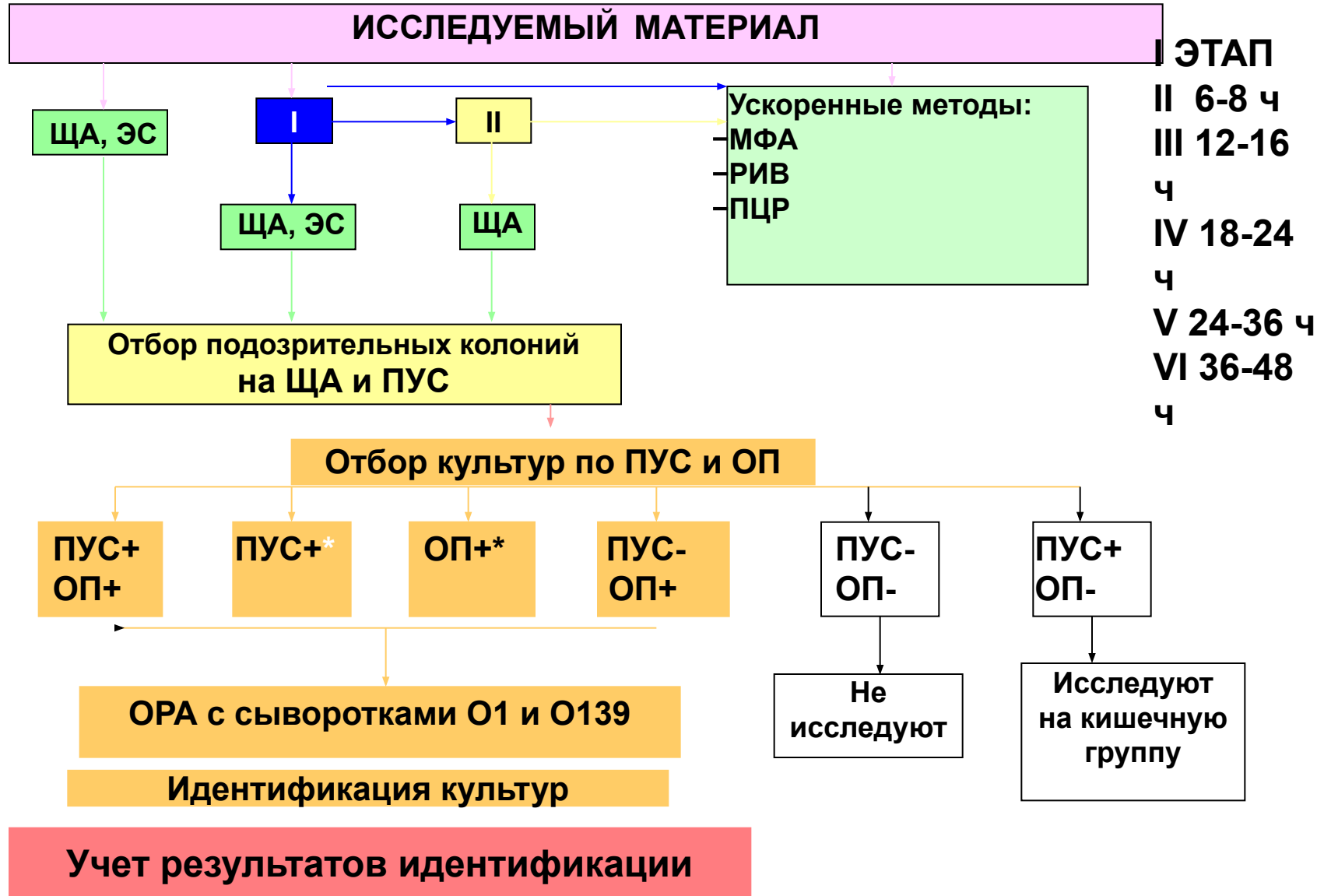
При выделении необходимо учитывать следующие биологические особенности холерного вибриона :

- Неприхотлив к питательным средам
- Устойчив к высоким концентрациям щелочи (рН 8,2-9,0)
- Быстро размножается, опережая сопутствующую микрофлору
- Аэрофилен, при росте в жидкой среде в первую очередь скапливается на поверхности

На этих особенностях и основана схема исследования:

- Подраживание имеющихся в исследуемом материале холерных вибрионов в 1% пептонной воде рН $8,4 \pm 0,1$ с последующим высевом на щелочной агар через 6-8 часов. Это тот срок, когда холерные вибрионы уже размножились, а сопутствующая микрофлора отстает.
- Материал для пересевов берется строго с поверхности жидких питательных сред, где имеет место наибольшее скопление вибрионов.

СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ НА ХОЛЕРУ



I этап

- *Испражнения, рвотные массы больных, а также содержимое кишечника, желчного пузыря и суспензию кусочков слизистой тонкого кишечника трупа* в объеме 0,5 - 1,0 мл засевают пипеткой в 50 - 100 мл накопительной среды, петлей - на щелочной агар и одну из элективных сред (СЭДХ, ТСBS).
- **При исследовании материала от больных с подозрением на заболевание холерой не допускается использование в качестве накопительной среды 1%-й пептонной воды с теллуридом калия.**
- **В случае поступления материала от больных с подозрением на холеру могут быть использованы ускоренные методы исследования: иммунолюминесцентный, иммобилизация и ПЦР со специфическими праймерами на первом, втором и последующих этапах исследования.**
- *Материал от подозреваемых на вибрионосительство* засевают в 50 мл среды накопления при индивидуальных анализах и в 100 мл - при групповых, объединяя в один флакон по 0,5 - 1,0 мл пробы не более чем от 5 человек. К групповым посевам прибегают в редких случаях при проведении массовых обследований на вибрионосительство.

I этап

- **Материал, доставленный в 5 мл 1%-й пептонной воды, полностью используют для посева в 50 мл среды накопления.** В случае поступления в лабораторию материала, забранного в 50 мл 1%-й пептонной воды во флаконе, и доставки его не позже 2-х ч после забора пробы, флакон помещают в термостат на 6 ч для накопления возбудителя. При доставке материала в более поздние сроки 5 мл его засевают в 50 мл 1%-й пептонной воды.
- В отдельных случаях, *при бактериологическом исследовании материала от лиц, принимавших антибиотики*, активные по отношению к возбудителю холеры, его засевают в 200 - 300 мл 1%-й пептонной воды (предпочтительно в широкогорлые колбы) и на 2 чашки щелочного агара так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37°C в течение 24 ч, производя последовательные высевы через 8 - 10 ч инкубации с поверхностного слоя среды на пластинки щелочного агара. Использование второй среды обогащения в этом варианте исследования нецелесообразно.

II этап (6-8 ч от начала исследования)

- С первой среды накопления делают высев на щелочной агар и одну из селективных сред и в 5 - 8 мл второй среды накопления. Пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды большой бактериологической петлей диаметром 5 мм.
- При отрицательных результатах исследования нативного материала ускоренными методами их повторяют после 6 ч инкубации первой среды накопления.

III этап (12 - 16 ч от начала исследования)

- Высев со второй среды накопления на щелочной агар.
- В случае необходимости ускорения хода анализа материала от больного, подозрительного на заболевание холерой, отбор колоний со щелочного агара, засеянного в начале исследования, можно начинать уже на этом этапе, в остальных случаях - на следующем. первой среды накопления делают высев на щелочной агар и одну из селективных сред и в 5 - 8 мл второй среды накопления. Пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды большой бактериологической петлей диаметром 5 мм.
- При отрицательных результатах исследования нативного материала ускоренными методами их повторяют после 6 ч инкубации первой среды накопления.

IV этап (18 - 24 ч от начала исследования)

- **Отбор подозрительных на холерный вибрион колоний в посевах на плотные среды нативного материала, а также в высевах из 1-й и 2-й накопительных сред.**
- **а) Чашки с посевами просматривают в проходящем свете невооруженным глазом или с помощью лупы, а также (особенно в вечернее и ночное время) под стереоскопическим микроскопом в косо проходящем свете и отбирают подозрительные на вибрионы колонии для выделения и идентификации культуры.**
- **На щелочном агаре колонии холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в типичной S-форме - круглые, гладкие, плоские, голубоватые, гомогенные, с ровными краями, прозрачные в проходящем свете и светло-серые с голубым или зеленоватым оттенком под стереоскопическим микроскопом в косо проходящем свете.**

IV этап (18 - 24 ч от начала исследования)

- Колонии холерных вибрионов на элективных средах TCBS и СЭДХ имеют ярко-желтую окраску на зеленом или синем фоне среды, полупрозрачные.
 - Размеры колоний на щелочном агаре через 10 - 12 ч инкубации обычно не превышают 1 мм, а к 18 - 24 ч достигают 2 - 3 мм в диаметре.
 - Темпы формирования колоний холерных вибрионов на элективных средах несколько замедлены, поэтому просмотр посевов на СЭДХ или TCBS следует проводить не ранее чем через 18 - 20 ч инкубации, когда размеры их становятся близки к колониям, вырастающим на щелочном агаре.
- В отдельных случаях в посевах могут также встречаться атипичные колонии: мутные с плотным центром, пигментированные (коричневые или светло-желтые), мельчайшие коккоподобные, шероховатые. Следует иметь в виду, что состав и качество питательных сред оказывают влияние на величину и плотность колоний холерных вибрионов, а также на морфологию клеток.

IV этап (18 - 24 ч от начала исследования)

- б) При отборе колоний можно использовать пробу на индофенолоксидазу с однокомпонентным реактивом (без альфа-нафтола) с индикаторными бумажками из набора СИБ-1 для идентификации вибрионов или - тест-системы ОКСИ-тест. С колониями, обнаруженными на элективных средах, пробу на оксидазу ставить не рекомендуется.
 - в) Подозрительные колонии проверяют в слайд-агглютинации с сывороткой холерной О1 в разведении 1:50 - 1:100.
- При положительной реакции и достаточном количестве подозрительных колоний ставят слайд-агглютинацию с вариантоспецифическими сыворотками Инаба и Огава в том же разведении, готовят мазки для окраски по Граму и обработки флюоресцирующими иммуноглобулинами.
- При отрицательных результатах колонии, обнаруженные в посевах материала от больных, проверяют в слайд-агглютинации с холерными сыворотками О139 и РО.

IV этап (18 - 24 ч от начала исследования)

- Положительная ориентировочная реакция агглютинации с холерной O1 сывороткой в разведении 1:100 и вариантоспецифической в разведении 1:50 или положительная реакция с флюоресцирующими иммуноглобулинами в сочетании с морфологическими, культуральными признаками и специфической иммобилизацией **позволяют выдать на соответствующем этапе предварительный ответ** об обнаружении в исследуемом материале холерного вибриона O1, а в случае положительной реакции с сывороткой O139 - холерного вибриона O139 серогруппы.
- г) Подозрительные на вибрионы колонии, агглютинирующиеся и не агглютинирующиеся холерными O1 и O139 сыворотками, отсеивают на одну из полиуглеводных сред (лактозо-сахарозная, Ресселя, Клиггера, маннозо-сахарозная или др.) и (или) на сектор пластинки щелочного агара для выделения чистой культуры, ее идентификации и определения чувствительности к антибиотикам.

V этап (24 - 36 ч от начала исследования)

- **Отбор культур для идентификации**
- **На полиуглеводных средах отбирают культуры с типичными для вибрионов характером роста и изменениями:**
 - **- на двууглеводных средах (лактозо-сахарозная, глюкозо-лактозная и Клиглер) наблюдается характерное для кислой реакции изменение цвета столбика при сохранении цвета скошенной части без образования газа, а также сероводорода, продуцируемого в среде Клиглера, отдельными штаммами за счет расщепления серосодержащихся компонентов;**
 - **- в маннозо-сахарозной среде за счет ферментации обоих углеводов окрашиваются и столбик, и скошенная часть, а также в отдельных случаях улавливается образование сероводорода.**
- **Культуры, выросшие на щелочном агаре, проверяют на наличие индофенолоксидазы.**
- **Определяют морфологию микроорганизмов и чистоту отобранных культур, выросших на щелочном агаре и полиуглеводных средах, с помощью окрашенных по Граму мазков.**

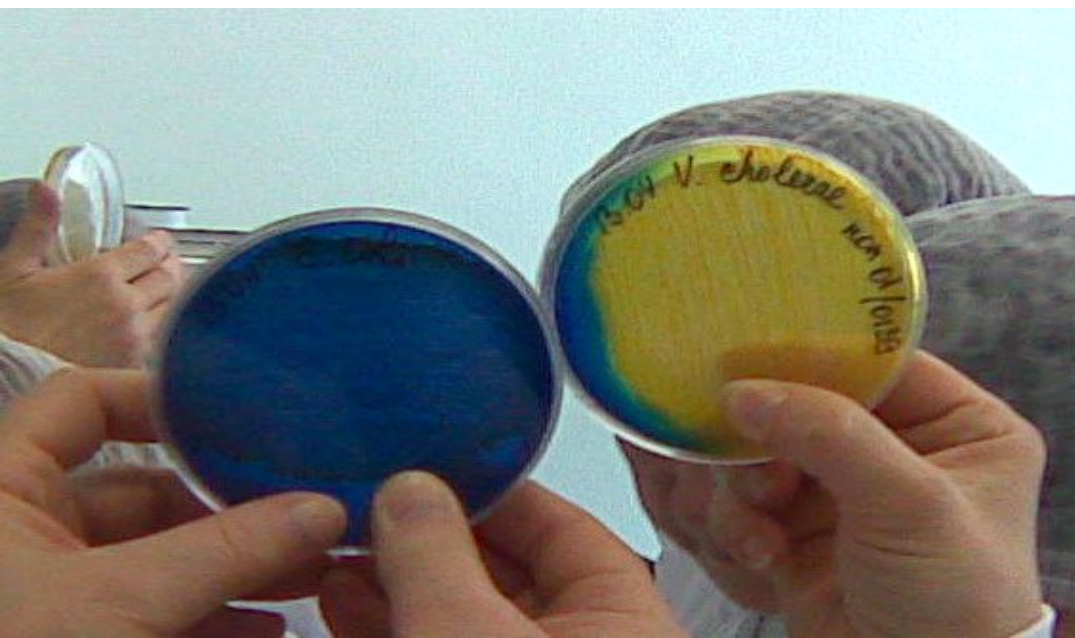
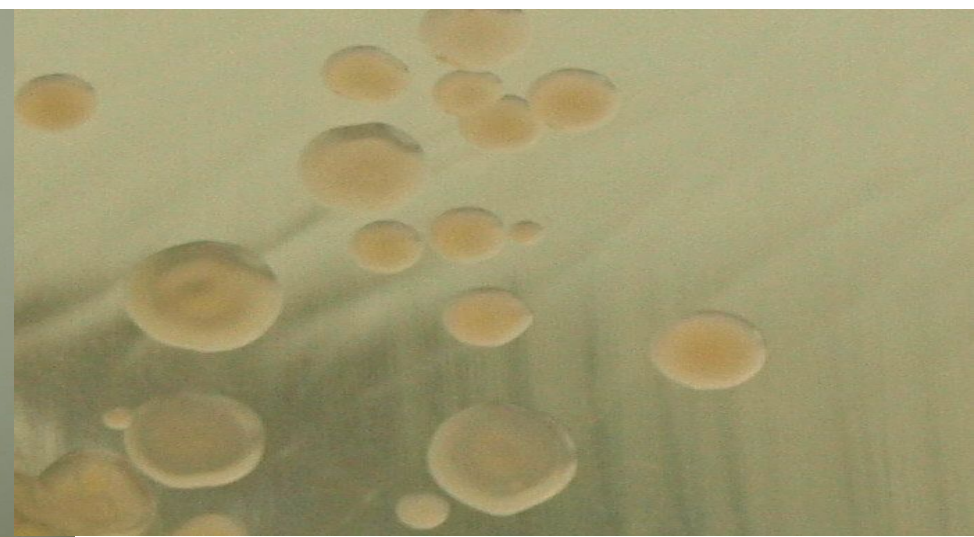
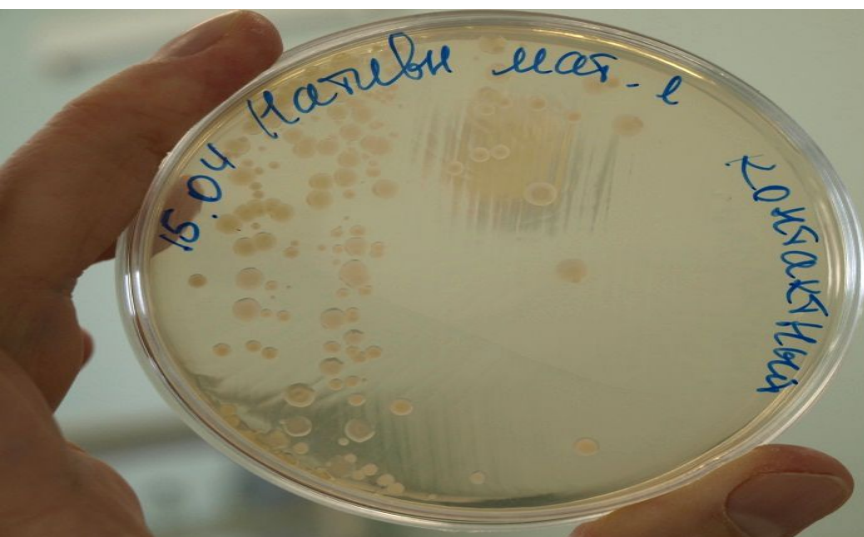
V этап (24 - 36 ч от начала исследования)

- Культуры, дающие характерные изменения на полиуглеводных средах и положительные в пробе на оксидазу, проверяют в ориентировочной слайд-агглютинации с холерными сыворотками O1 в разведении 1:100, PO, Инаба и Огава - в разведении 1:50. При отрицательных результатах с этими сыворотками ставят слайд-агглютинацию с холерной сывороткой O139 серогруппы, используя ее в соответствии с инструкцией по применению. На основании положительных результатов агглютинации с сыворотками O1, Инаба или/ и Огава **выдают предварительный положительный ответ о выделении из исследуемого материала культуры холерного вибриона O1 соответствующего серовара.**
- Если выделенная культура реагирует с холерной сывороткой O139 при отрицательных результатах с сыворотками O1 серогруппы, выдают ответ о выделении холерного вибриона O139 серогруппы.
- Проводят идентификацию выделенных на полиуглеводных средах или на щелочном агаре агглютинирующихся и не агглютинирующихся сыворотками O1, PO или O139 серогрупп оксидазопозитивных культур по сокращенной или полной схеме, не агглютинирующихся холерными O1, PO и O139 сыворотками - до определения вида с учетом основных

VI этап (36 - 48 ч от начала исследования)

- Учитывают результаты идентификации и **выдают окончательный ответ** о выделении культуры холерного вибриона соответствующей серогруппы и биовара.
- Для холерных вибрионов O1 эпидемическую значимость ориентировочно оценивают по тестам гемолитической активности и чувствительности к фагам эльтор ctx(+) и ctx(-), а в специализированных учреждениях - окончательно по результатам ПЦР или генетического зондирования на присутствие в геноме выделенной культуры ctx АВ (А) гена, а также токсигенности на модели кроликов-сосунков. Эпидемическую значимость холерных вибрионов O139 серогруппы определяют по тем же тестам, кроме чувствительности к фагам эльтор ctx(+) и ctx(-). К окончанию этого этапа исследования должна быть определена антибиотикочувствительность выделенной культуры.
- При выделении от больного или вибриононосителя культуры холерного вибриона, не агглютинирующейся холерными сыворотками O1 и O139, выдают ответ о выделении холерных вибрионов не O1 и не O139. При наличии вибрионных агглютинирующих диагностических сывороток определяют принадлежность к другим серогруппам (O2-O83).

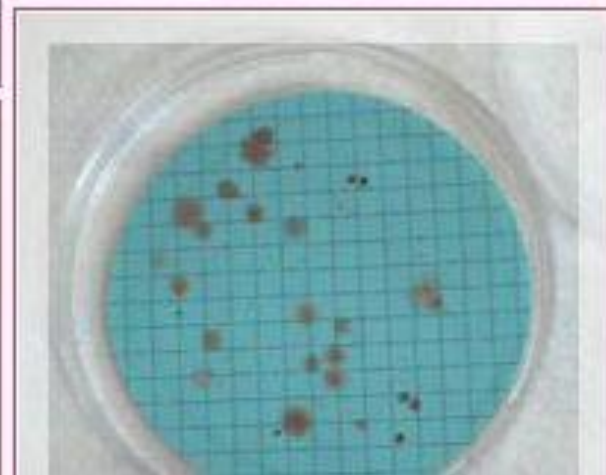
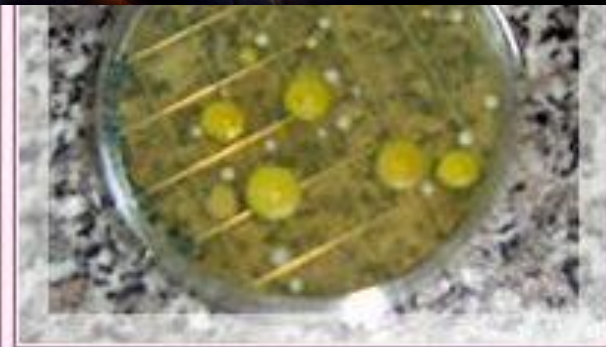
МОРФОЛОГИЯ РОСТА НА ЩА



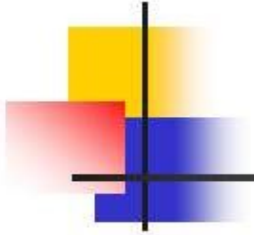
МОРФОЛОГИЯ РОСТА НА ЭС СЭДХ

Культуральные свойства

- На **твердых** средах – круглые прозрачные S-колонии;
- На **жидких** – помутнение с образованием голубой пленки;
- На средах с **тиосульфатом**, **цитратом**, **ЖЧК** – желтые

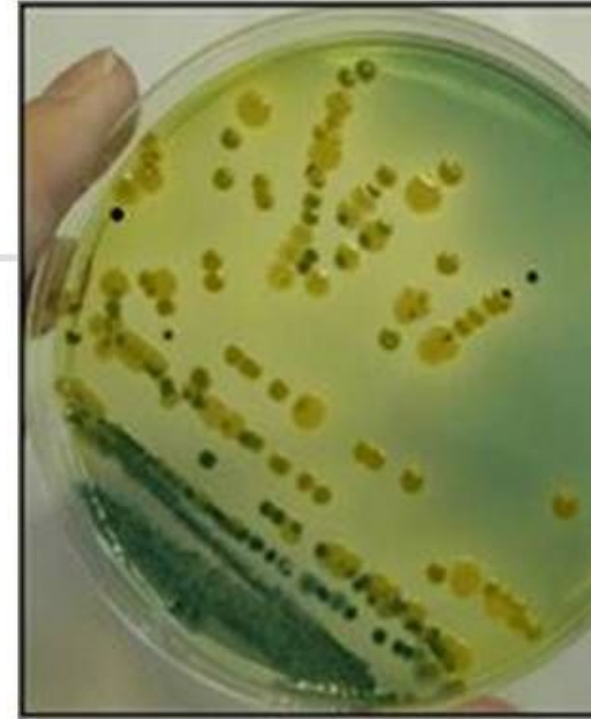


V.cholerae on TCBS Agar



V.cholerae на TCBS агаре образует желтые колонии, а *V.parahaemolyticus* - зеленые

V.cholerae устойчивы к действию щелочи, убивающей большинство комменсалов ЖКТ, но чувствительны к действию кислот. Растет при температуре от 10 до 40 °С (оптимальная 37 °С) на **щелочных** средах (при pH от 7,6 до 9,2).



Биохимические свойства

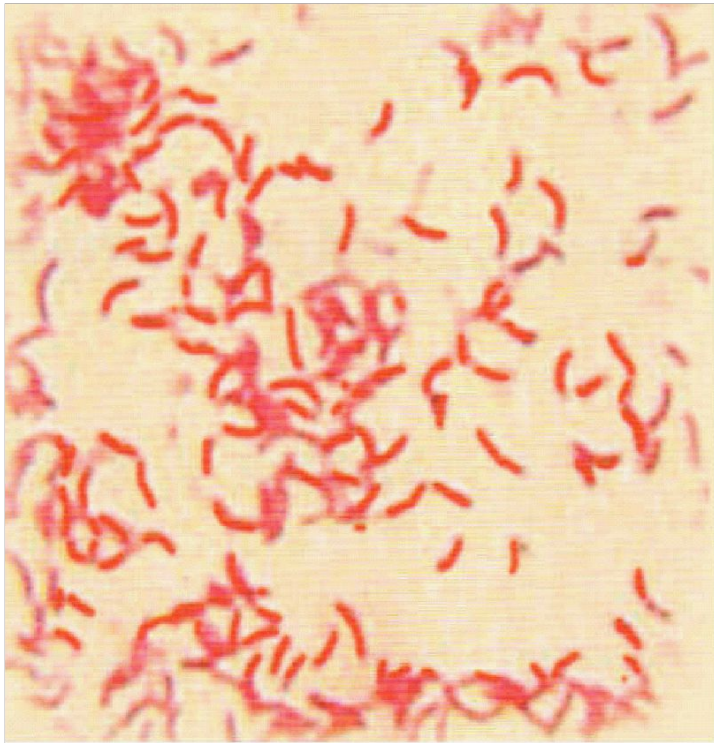
- Сбраживают глюкозу, сахарозу, мальтозу, маннит, лактозу (без образования газа);
- Ферментируют маннозу, сахарозу, арабинозу (диагностически значимо);
- Разжижают желатину;
- Оксидазоположительны;
- Сворачивают белки.



СОКРАЩЕННАЯ СХЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

- Морфология и подвижность микробных клеток
- ОП (оксидазный тест)
- О/Ф тест (окисление и ферментация глюкозы)
- Отношение к отдельным углеводам и аминокислотам
- МФА (метод флюоресцирующих антител)
- РИВ (реакция иммобилизации вибрионов)
- РА агглютинация с сыворотками О1, Инаба, Огава, РО, О139
- Чувствительность к фагам холерным классическому и эльтор
- Ориентировочная оценка эпидемической значимости
 - гемолитическая активность по Грейгу
 - чувствительность к фагам холерным эльтор **ctx+** и **ctx-**

Морфология микробных клеток



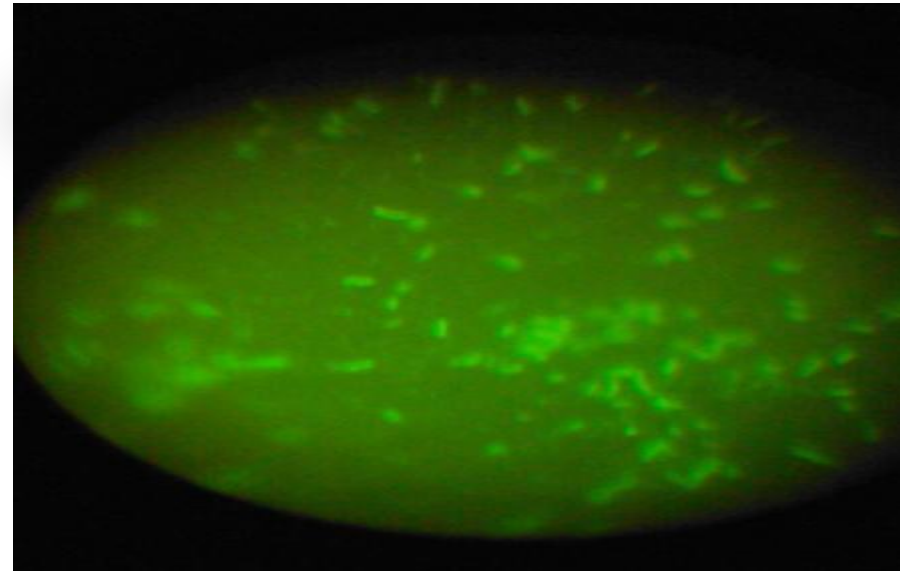
Чистая культура *V. cholerae*. Окраска по Граму



Чистая культура *V. cholerae*, окраска фуксином

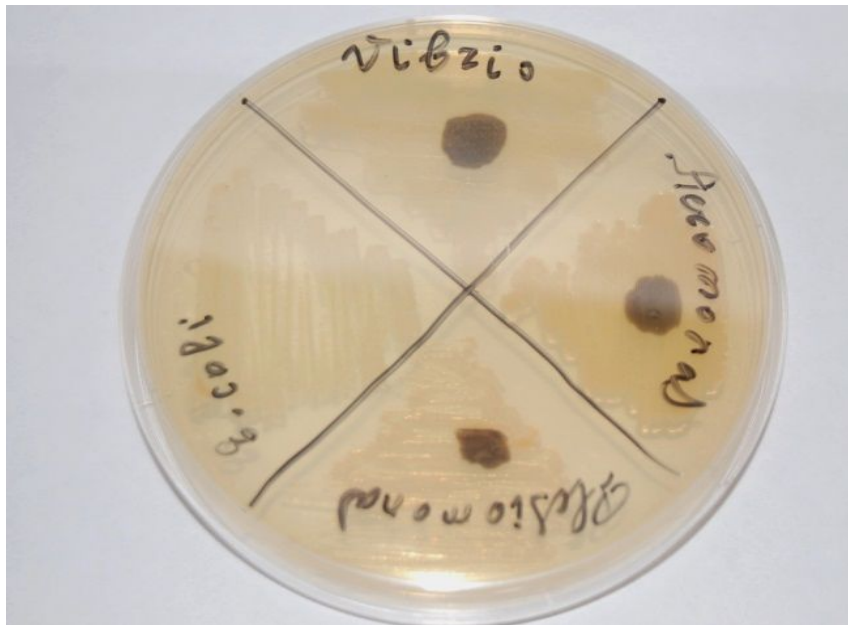
Подвижность микробных клеток

- В раздавленной капле (+ РИВ)
- В 0,3% полужидком агаре

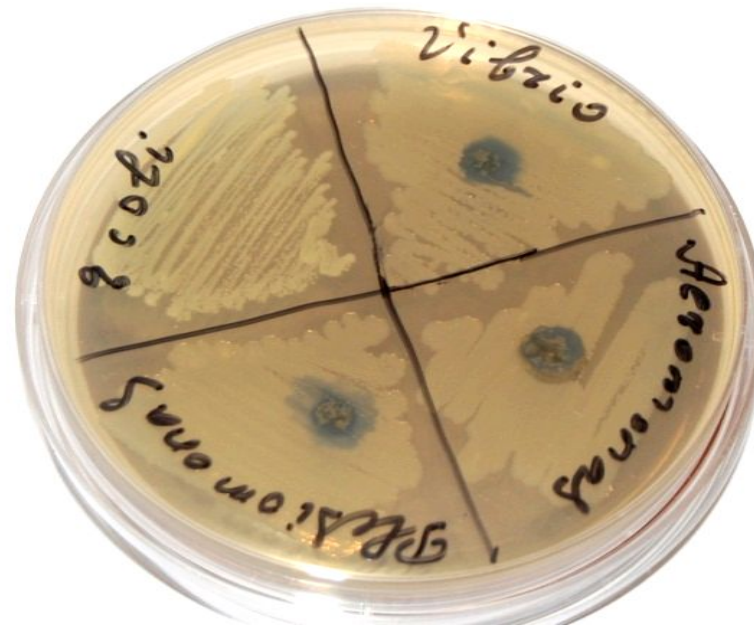


ОКСИДАЗНАЯ ПРОБА

однокомпонентная



двухкомпонентная



Определение индофенолоксидазы

а) С помощью реактивов.

Реактивы: 1%-е водные растворы диметил-пара-фенилендиамина, тетраметил-пара-фенилендиамина (гидрохлорида), этилоксиэтил-пара-фенилендиамина серно-кислого (из набора для обработки бумаги "фотоцвет") и пара-аминодиметиланилина (гидрохлорида или оксалата) в сочетании с 1%-м спиртовым раствором альфа-нафтола или без него. Реактивы должны быть бесцветными, их следует хранить во флаконах из темно-коричневого стекла со стеклянной пробкой без доступа света в холодильнике. В случае помещения реактива во флаконы из светлого стекла их следует обернуть алюминиевой фольгой или темной бумагой.

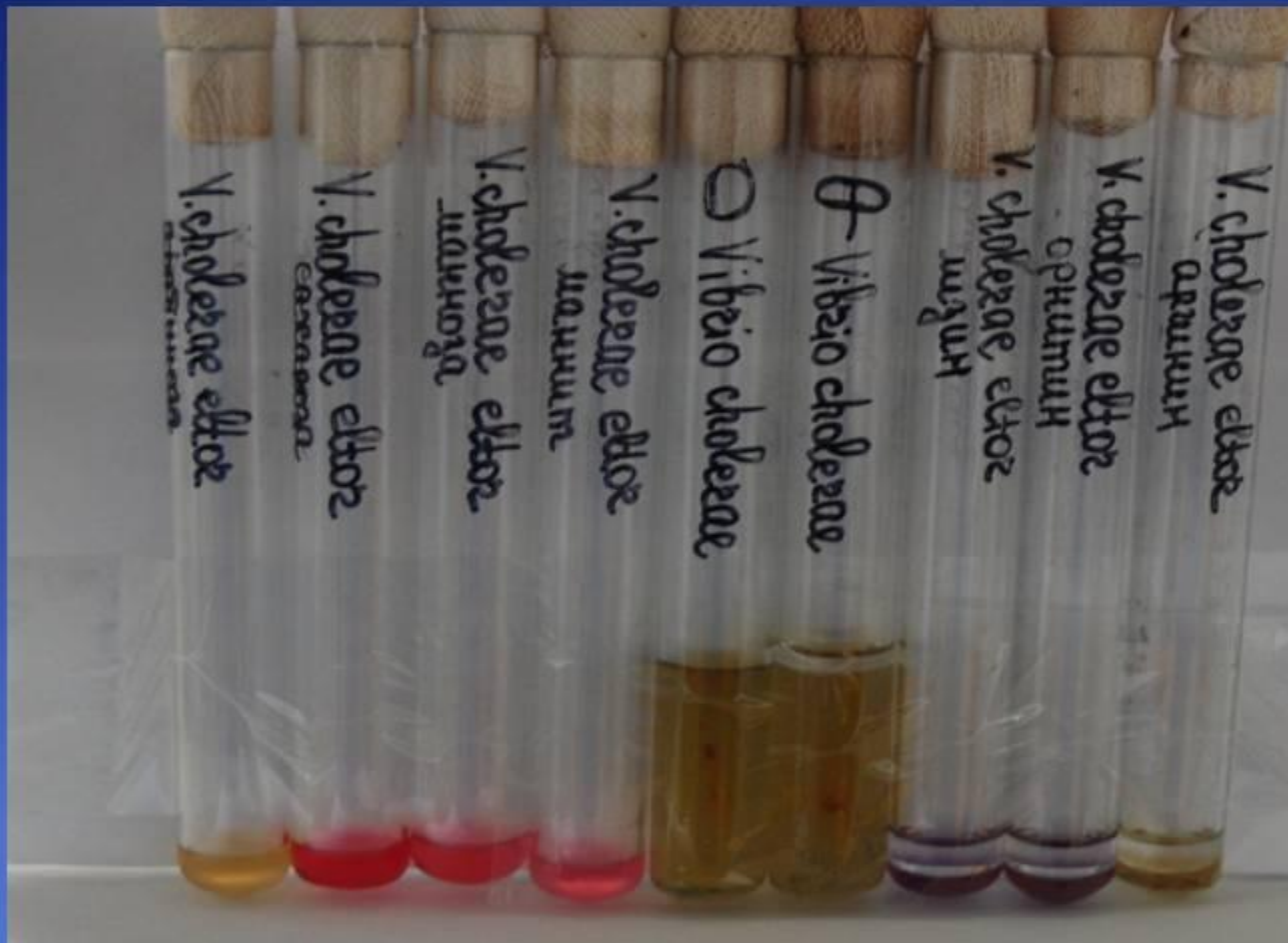
Постановка пробы:

на поверхность 18-часовой агаровой культуры, подозрительной колонии или полусливного роста на щелочном агаре наносят 1 каплю 1%-го водного раствора одного из указанных реактивов.

Положительная реакция на индофенолоксидазу - ярко красная окраска культуры через 20 - 30 с.

При использовании двухкомпонентной реакции (в сочетании с альфа-нафтолом) в положительных случаях - синее окрашивание культуры в течение 1 - 2 мин.

ФЕРМЕНТАЦИЯ УГЛЕВОДОВ И АМИНОКИСЛОТ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ O1 И O139 СЕРОГРУПП



- Арабиноза (-), сахароза (+), манноза (+)
- Маннит (+)
- О/Ф глюкозы на среде Хью-Лейфсона (+/+)
- Декаррбоксилазы лизина (+) и орнитина (+), дигидролаза аргинина (-)

Идентификация холерных вибрионов неO1/не O139 серогрупп



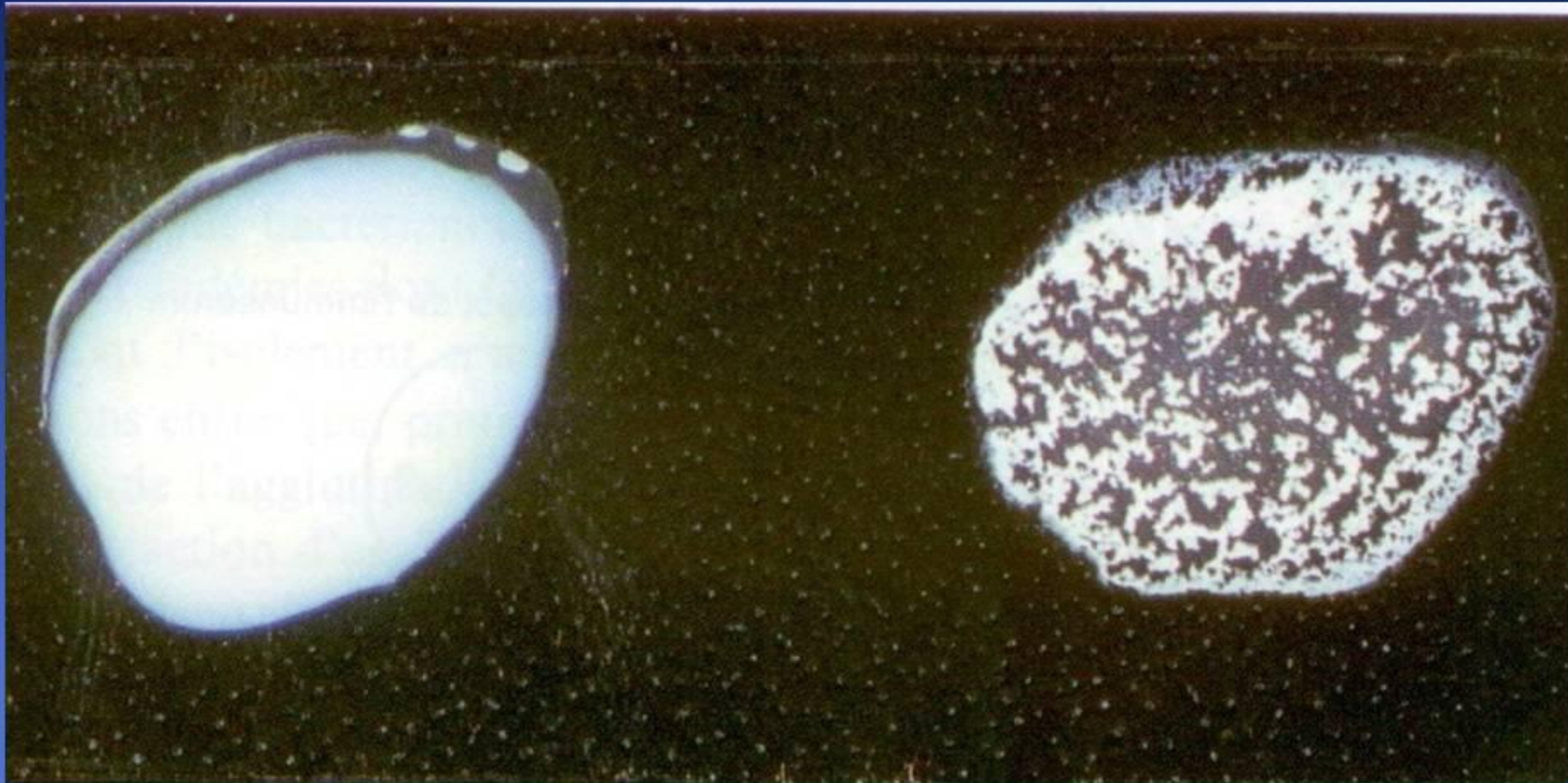
0,3% ПЖА (+) арабиноза (-) сахароза (+) манноза (+) лактоза (-)
маннит (+) инозит (-) глюкоза O/Ф (+/+) сероводород (-) индол
(+)

лизин (-) орнитин (-) аргинин (-)

ФЕРМЕНТАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ (ЛИЗИН, ОРНИТИН, АРГИНИН) представителями семейства Vibrionaceae

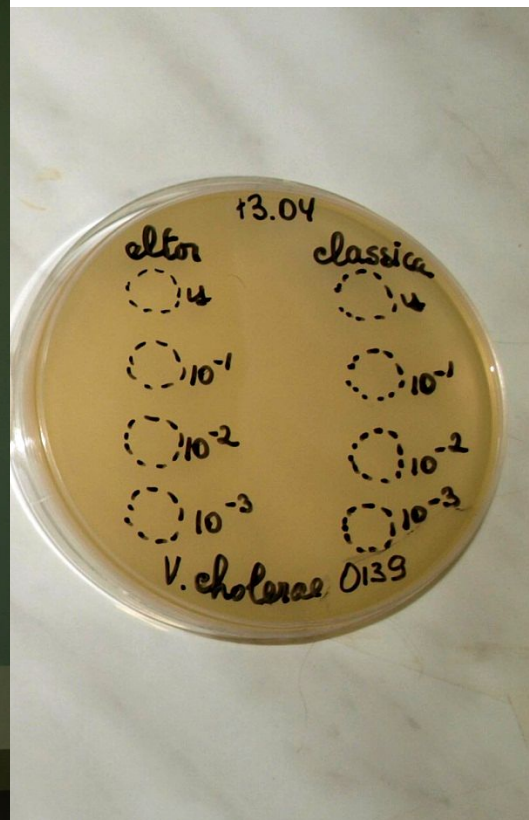
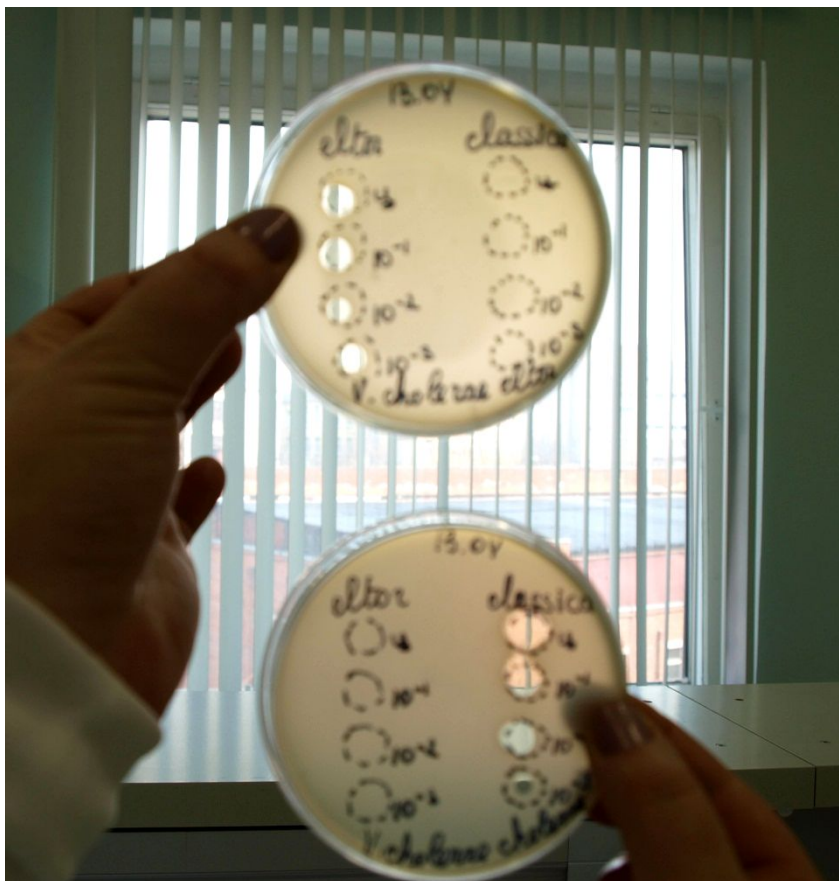


ОРИЕНТИРОВОЧНАЯ РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ НА СТЕКЛЕ С ХОЛЕРНОЙ СЫВОРОТКОЙ (СЛАЙД-АГГЛЮТИНАЦИЯ)

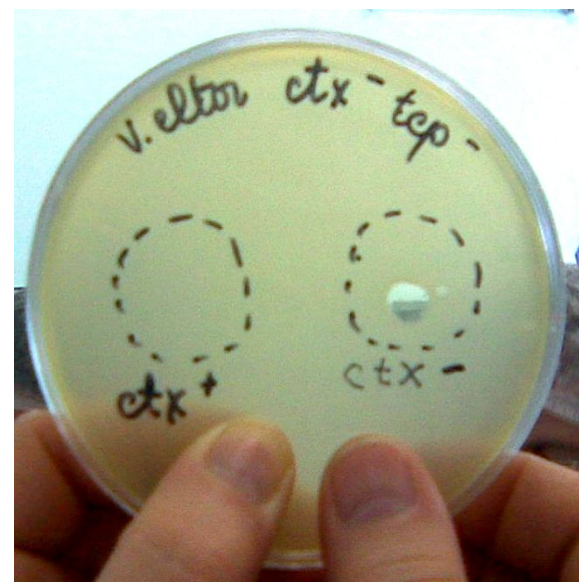
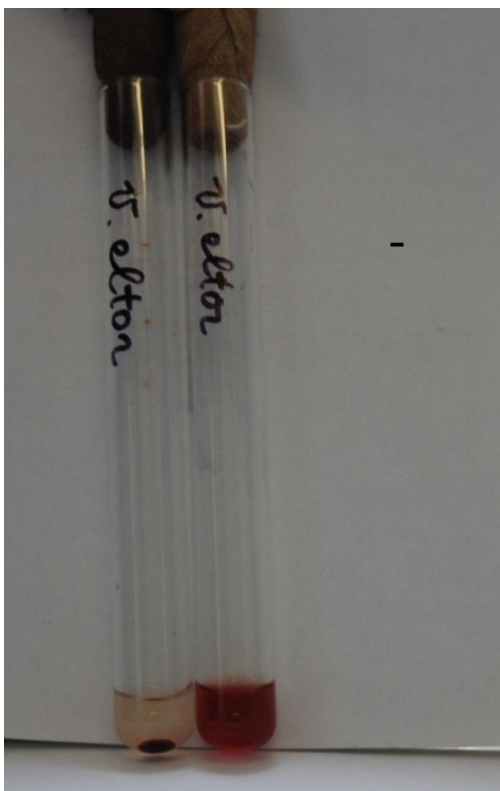


РА с сыворотками О1, Инаба, Огава, РО, О139

Чувствительность к холерным фагам классическому и эльтор



Ориентировочная оценка эпидемической значимости холерных вибрионов эльтор



- гемолитическая активность по Грейгу
- чувствительность к фагам холерным эльтор **ctx+** и **ctx-**

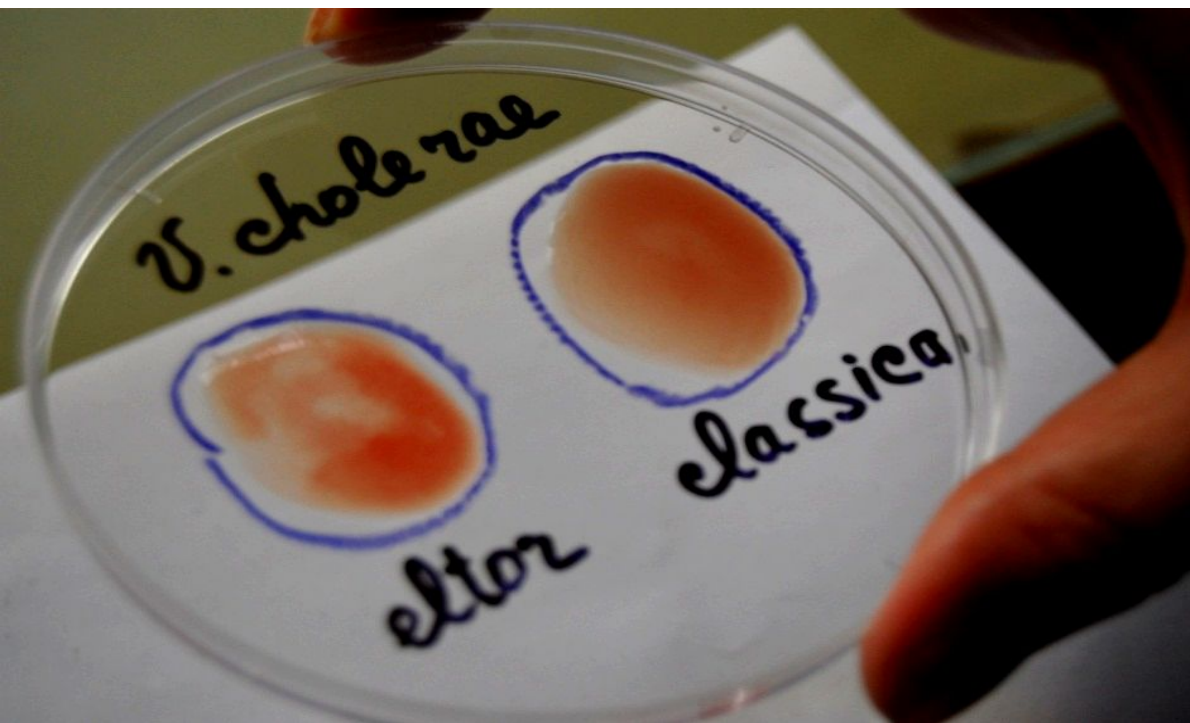
СХЕМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ЭЛЬТОР

| Группы | Варианты | Гемолиз по Грейгу | Чувствительность к фагам | | Оценка эпидемической значимости |
|--------|----------|-------------------|--------------------------|------------------|---|
| | | | ctx ⁺ | ctx ⁻ | |
| I | 1 | - | + | - | Эпидемически опасны |
| II | 2 | - | - | - | Для оценки эпидемической значимости не обходимы дополнительные исследования на наличие генов ctxAB, tcpA или определение токсигенности на кроликах-сосунках |
| | 3 | - | + | + | |
| | 4 | + | + | + | |
| | 5 | + | + | - | |
| III | 6 | + | - | + | Эпидемически не опасны |
| | 7 | + | - | - | |
| | 8 | - | - | + | |

ПОЛНАЯ СХЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

- Дополнительные признаки биовара
 - гемагглютинация куриных эритроцитов (или эритроцитов морской свинки)
 - чувствительность к полимиксину В (50ЕД/мл)
 - реакция Фогес-Проскауэра
- Определение антибиотикограммы
- Окончательная оценка эпидемической значимости
 - ПЦР на наличие *ctxAB* (A) *tcrA* генов
 - токсигенность на кроликах-сосунках
- Уточнение родовой и видовой принадлежности атипичных культур по расширенному набору признаков

РЕАКЦИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ



Постановка реакции гемагглютинации

На предметное стекло в чашке Петри помещают каплю 0,9%-го раствора хлорида натрия и суспендируют в ней петлей 18-часовую агаровую культуру.

Затем добавляют каплю 2,5%-й взвеси куриных эритроцитов, трижды отмытых 0,9%-м раствором хлорида натрия.

Стекло покачивают до смешивания взвеси эритроцитов и вибрионов.

При положительной реакции в течение 1 мин наступает склеивание эритроцитов.

Реакцию сопровождают двумя контролями:

- в каплю 0,9%-го раствора хлорида натрия добавляют каплю 2,5%-й взвеси эритроцитов;
- в капле 0,9%-го раствора хлорида натрия суспендируют испытуемую культуру.

Контроли должны быть отрицательными.

Для постановки пробы могут быть использованы эритроциты морской свинки.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПОЛИМИКСИНУ В



Определение чувствительности к полимиксину В

В расплавленный и остуженный до 45°C питательный агар (pH 7,2 ± 0,1) добавляют полимиксин В из расчета 50 единиц на 1 мл среды.

После тщательного перемешивания среду разливают в чашки Петри.

На застывшие агаровые пластинки наносят обычной бактериологической петлей 18- или 3-часовую бульонную культуру.

Результаты учитывают после инкубирования посевов при температуре 37°C в течение 18 ч.

Холерные вибрионы биовара cholerae не растут на полимиксиновом агаре, для холерных вибрионов биовара eltor - признак вариабелен.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ



ОКОНЧАТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ

- ПЦР на наличие ctx АВ (А) tcp А генов
- токсигенность на кроликах-сосунках

ОСНОВНЫЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ К ХОЛЕРНЫМ ВИБРИОНАМ не O1/O139 СЕРОГРУПП ИЛИ ДРУГИМ ВИДАМ ПАТОГЕННЫХ ВИБРИОНОВ

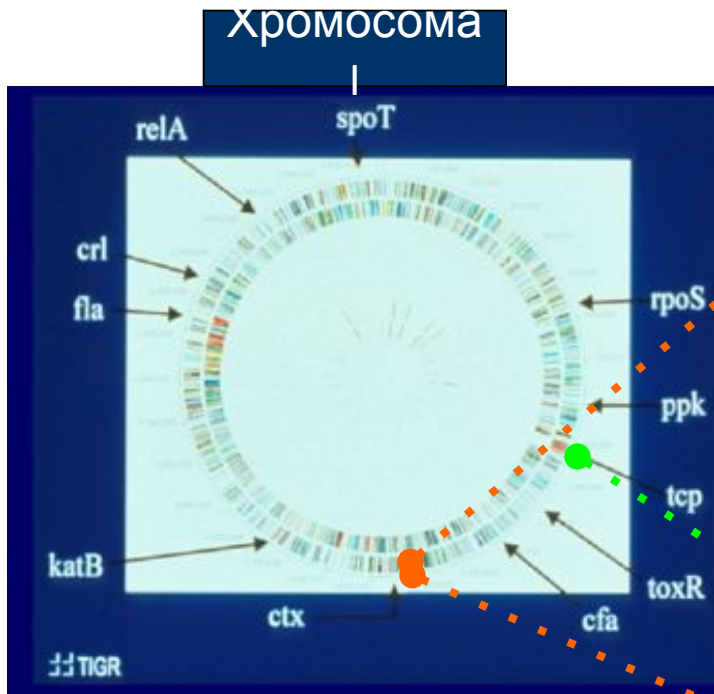
1. Окраска по Граму, морфология
2. Подвижность
3. Роение на агаре
4. Оксидаза
5. Рост на средах с различными концентрациями NaCl (0%, 3%, 6%, 10%)
6. Рост при различных температурах (4-45 С)
7. Чувствительность к вибриостатику O129 (2,4-диамино-6,7-диизопропилптериоидин)
8. О/Ф глюкозы в среде Хью и Лейфсона
9. Газ из глюкозы
0. Декарбоксилазы лизина и орнитина, дигидролаза аргинина
1. Ферментация лактозы, маннита, сахарозы, маннозы, арабинозы, инозита
2. Образование ацетилметилкарбинода в реакции Фогес-Проскауэра
3. Образование индола
4. Образование нитратредуктазы
5. Образование бета-галактозидазы
6. Образование амилазы
7. Образование желатиназы
8. Биолюминесценция

3. Молекулярно-генетические методы:

- Метод молекулярного зондирования;
- ПЦР со специфическими праймерами.

Определяется наличие генов *ctxAB* и
tcrA.

Рекомендованные комитетом МИБП для внедрения в практику здравоохранения ПЦР-тест-системы для обнаружения ДНК *Vibrio cholerae*



ctxA

«Тест-система для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции»
РосНИПЧИ «Микроб»

tcpA

«Тест-система для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+ tcpA+) методом полимеразной цепной реакции»

ctxA

НИИ микробиологии Минобороны России (г. Киров) и Ростовский-на-Дону НИПЧИ.

Исследование объектов окружающей среды

- Схема анализа объектов окружающей среды отличается от схемы исследования материала от больных только на I этапе, II - VI этапы изложены выше.

а) Вода поверхностных водоемов и водопроводная

В зависимости от времени доставки пробы возможны следующие варианты посевов с целью первичного накопления вибрионов:

- - к исследуемой воде добавляют раствор основного пептона до 1%-й концентрации, определяют рН, в случае необходимости подщелачивают 10%-м раствором едкого натрия до рН 8,4 +/- 0,1. Время инкубации в 1-й среде накопления - 8 - 10 ч. Объем 2-й среды накопления - 10 мл; время инкубации в

- среде без теллурита калия - 6 ч, а с теллуритом калия - 18 - 20 ч;

- - в исследуемую воду добавляют раствор основного пептона до 1%-й концентрации и теллурит калия из рабочего разведения 1:1 000 до концентрации 1:100 000 или 1:200 000 в соответствии с данными проверки. Устанавливают рН 8,4 +/- 0,1. Время инкубации 18 - 24 ч; вторая среда накопления - 10 мл среды без теллурита калия, время инкубации 6 - 8 ч;

б) Хозяйственно-бытовые сточные воды

- Сточные воды, доставленные в объеме 1 л, фильтруют через бумажный или матерчатый фильтр для освобождения от механических примесей (при необходимости).
- После добавления к пробам основного раствора пептона до 1%-й концентрации устанавливают рН 8,4 +/- 0,1 и инкубируют в объемах по 500 мл 8 - 10 ч (1 среда накопления) или с добавлением теллурита калия 1:100 000 (1:200 000) - 18 - 24 ч.
- При заборе сточных вод марлевыми тампонами последние помещают в широкогорлые колбы или банки с накопительной средой (500 мл) и далее исследуют, как указано

Исследование объектов окружающей среды

• **в) Гидробионты**

- Лягушку непосредственно перед исследованием обездвигивают уколом иглы в спинной мозг и фиксируют на препаровальной доске брюшком вверх. Поверхность брюшка обрабатывают спиртом и ножницами делают медиальный разрез. Желчный пузырь отсекают от печени, разрезают и делают отпечаток на пластинке щелочного агара. Остатки желчи вместе с желчным пузырем помещают во флаконы с 50 - 100 мл 1%-й пептонной воды. Содержимое желудка засевают в 1%-ю пептонную воду, а внутренней поверхностью стенки делают отпечатки на агаровые пластинки. Посев кишечника делают таким же образом, отсекая несколько петель в верхнем, среднем и нижнем отделах кишечника.
- У крупных рыб в том же порядке засевают в накопительную среду содержимое желчного пузыря, желудка, кишечника и жаберы. Мелких рыб (мальков) измельчают ножницами по 10 - 20 экз. в одной пробе и делают посев суспензии петлей на чашку с агаром и в 1%-ю пептонную воду.
- Дафний, циклопов и других рачков, так же, как и фитопланктон, растирают в ступке и засевают петлей в 1%-ю пептонную воду.
- У раков исследуют кишечник и жаберы, делая посев содержимого в среду накопления и слизистой стенки - отпечатком на агаровую среду

• **г) Пищевые продукты**

- Безалкогольные напитки исследуют тем же методом, что и воду.
- Молоко в количестве 5 мл сеют в 50 - 100 мл среды накопления или к 0,5 л молока добавляют основной раствор пептона до 1%-й концентрации его в молоке. Другие молочные продукты (кефир, сметану, творог, мороженое и т.д.) в количестве 5 - 10 мл засевают в 1%-ю пептонную воду.
- Из твердых пищевых продуктов берут навеску 25 г, растирают в стерильной ступке с 2 - 3 г кварцевого песка и физиологическим раствором, а затем переносят в 125 мл накопительной среды и петлей на агаровые среды.
- Масло засевают в жидкую среду накопления в количестве 5 - 10 г, размягчив его в термостате, или делают посев смыва с поверхности его кусков.
 - После посева продукта устанавливают pH среды $8,4 \pm 0,1$.

- **д) Смывы с объектов внешней среды** и мух засевают в 1%-ю пептонную воду и исследуют по обычной схеме.

МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

- **Серологические методы исследования, как правило, имеют дополнительное значение, и лишь в отдельных случаях при проведении оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа их результаты могут быть решающими.**
- **Для серологической диагностики холеры используют иммунологические реакции, выявляющие в сыворотке крови больных, переболевших и вибрионосителей, а также вакцинированных специфические антитела: агглютинины, антитоксины и вибриоцидные антитела.**

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

- Питательные среды, консерванты, ингибиторы посторонней микрофлоры, используемые в диагностике холеры, подлежат обязательной проверке в соответствии с МУК 3.3.2.2124-06 «Методические указания. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза»

Лечение холеры



- **Симптоматическое** – восстановление водно-электролитного баланса: использование сухих регидратационных смесей или внутривенные вливания в тяжелых случаях. Состав смесей: NaCl, KCl, NaHCO_3 , глюкоза (для использования симпорта – канала совместного входа в клетку глюкозы и натрия, т.к. основной канал блокирован холерогеном)
- **Патогенетическое** – антибиотикотерапия (тетрациклины)





Профилактика холеры

- ❖ *Специфическая:* вакцинация по эпидемическим показаниям
вакцина холерная бивалентная химическая
таблетированная – содержит холероген-анатоксин и О-антиген сероваров Инаба и Огава
-вакцина холерная (холероген-анатоксин + О-антиген) жидкая
- ❖ *Неспецифическая:* повышенные санитарно-гигиенические требования; употребление кислых продуктов (лимоны, уксус и т.д.)

**БЛАГОДАРЮ ЗА
ВНИМАНИЕ !**

