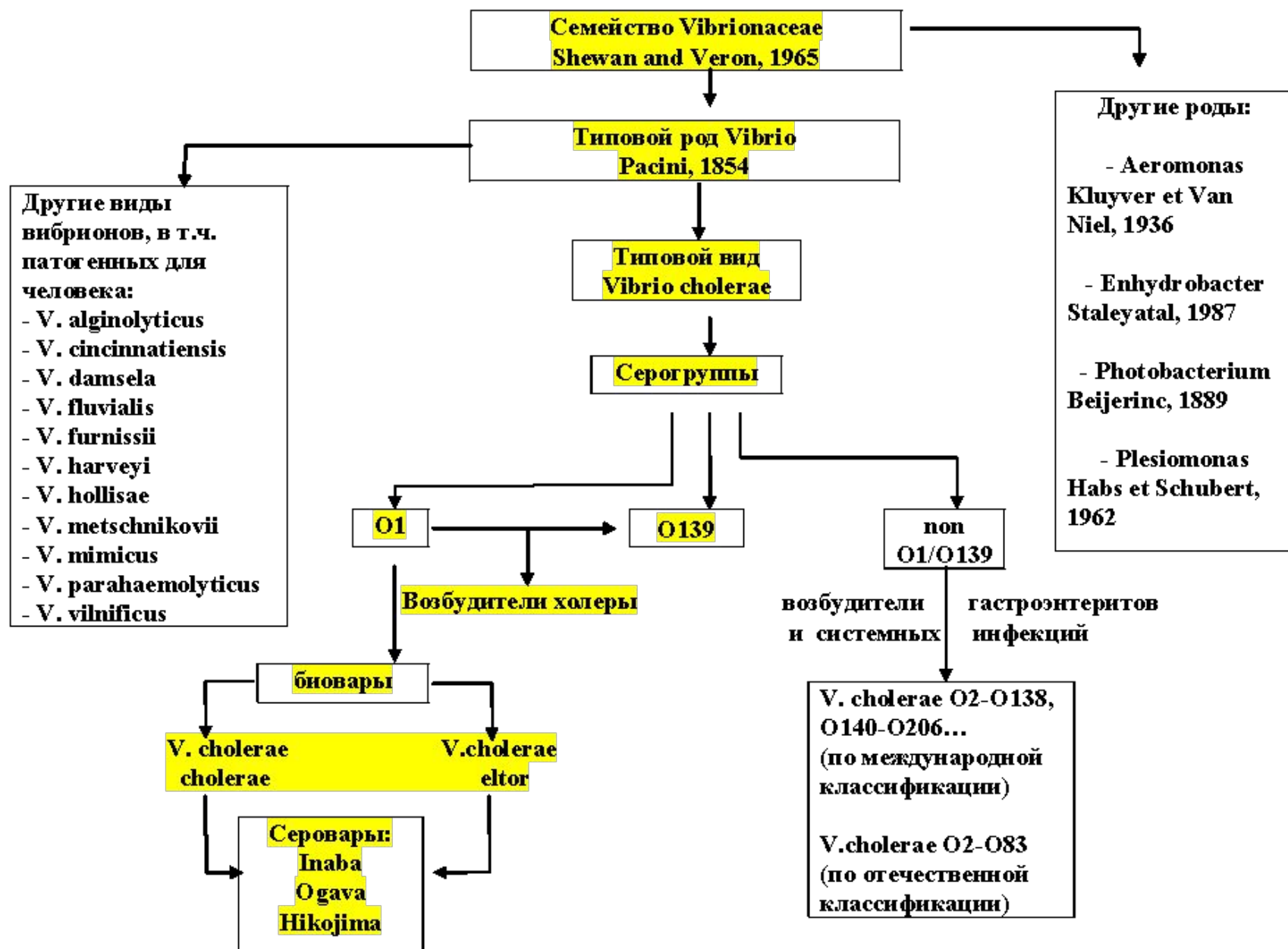


Лабораторная диагностика холеры

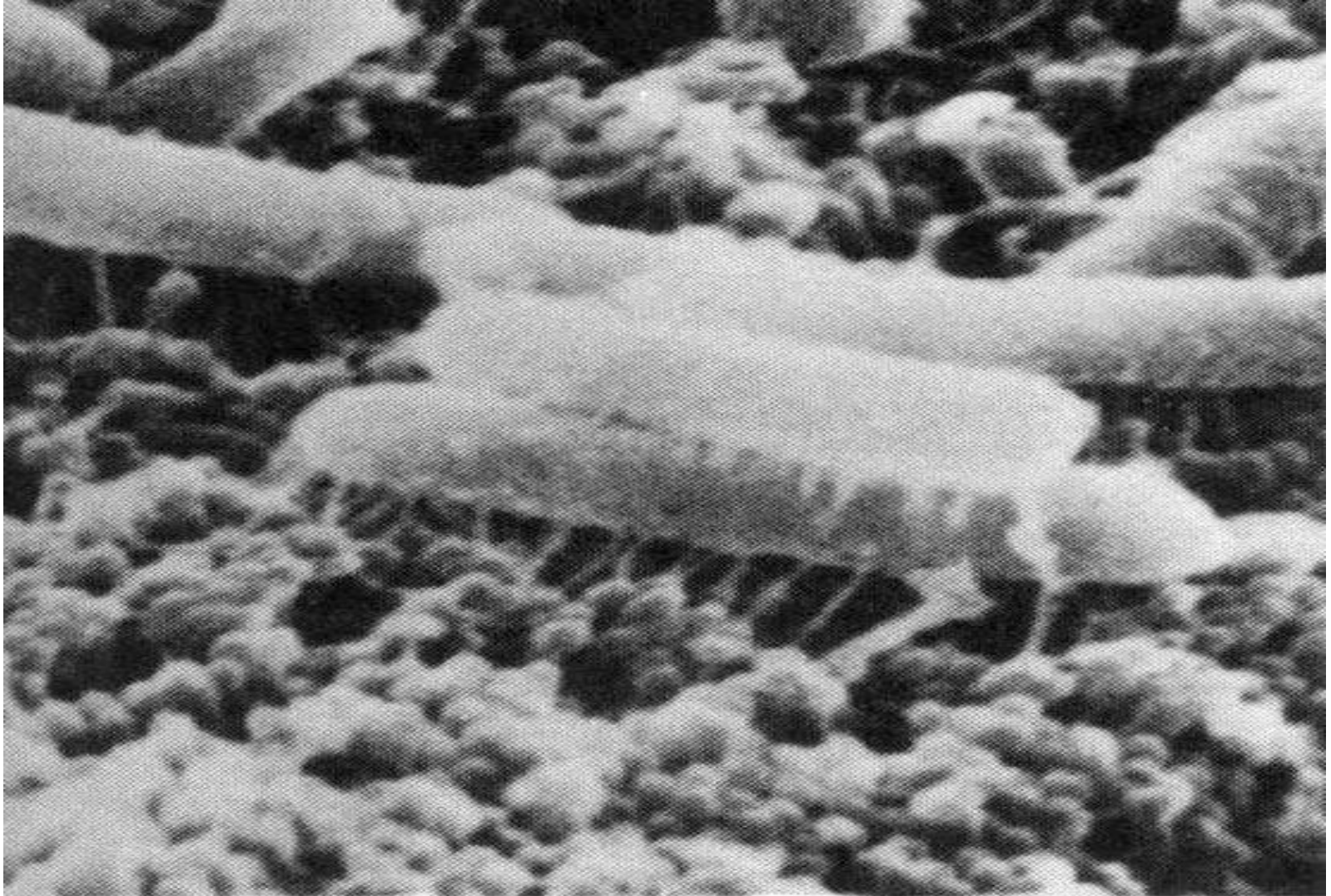


Таксономическое положение холерных вибрионов



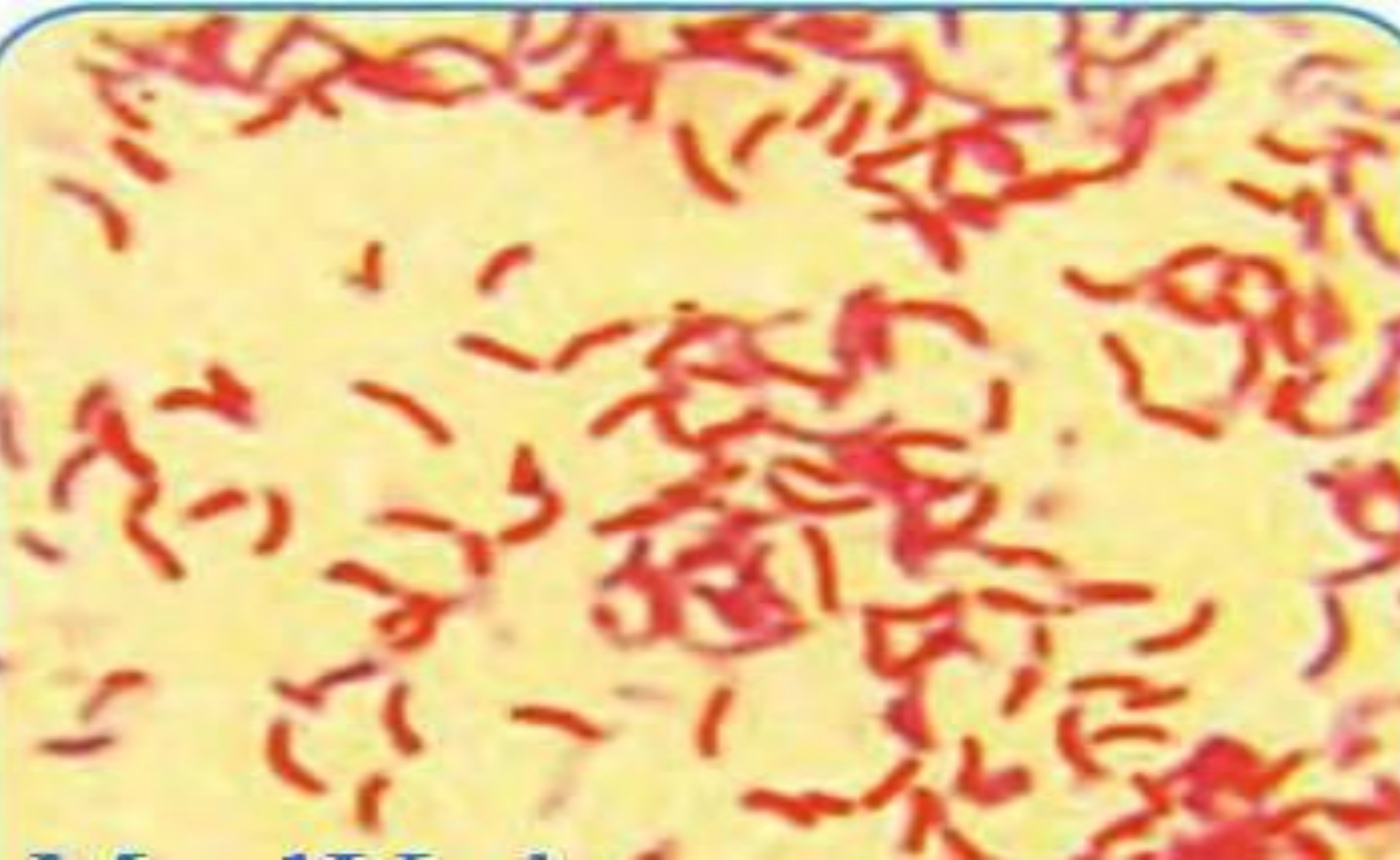


Адгезивные пили



Vibrio cholerae

Окраска по Граму



Питательные среды

Обогащения:

- 1% пептонная вода pH 8,4 - рост 6-8 часов
- 1% пептонная вода pH 8,4 с теллуридом калия -12-18 часов

Плотные:

- щелочной питательный агар pH 8,0 10-16 часов
- щелочной дрожжевой питательный агар pH 8,0

Элективные – 18-24 часа:

- TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Sucrose - тиосульфат-цитратный агар с желчью и сахарозой) состоит из гидролизата рыбной муки, дрожжевого экстракта, сахарозы, цитрата натрия, цитрата железа, хлорида натрия, желчи крупнорогатого скота, тиосульфата натрия, тимолового синего и агара.

Полиуглеводные:

- лактозо-сахарозная
- маннозо-сахарозная



АНТИГЕННАЯ СТРУКТУРА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Н- антиген

(родоспецифический)

О-антиген

(группо- и типоспецифический)

Фракции О-антигена: А, В, С

Серовары О1-группы:

- ОГАВА (АВ)
- ИНАБА (АС)
- ГИКОШИМА (АВС)

Серовар О139-группы:

- О139 (Бенгал)

Классификация вибрионов (по Б.Хейбергу)

Хемогруппа	Манноза	Сахароза	Арабиноза
1	К	К	-
2	-	К	-
3	К	К	К
4	-	К	К
5	К	-	-
6	-	-	-
7	К	-	К
8	-	-	К

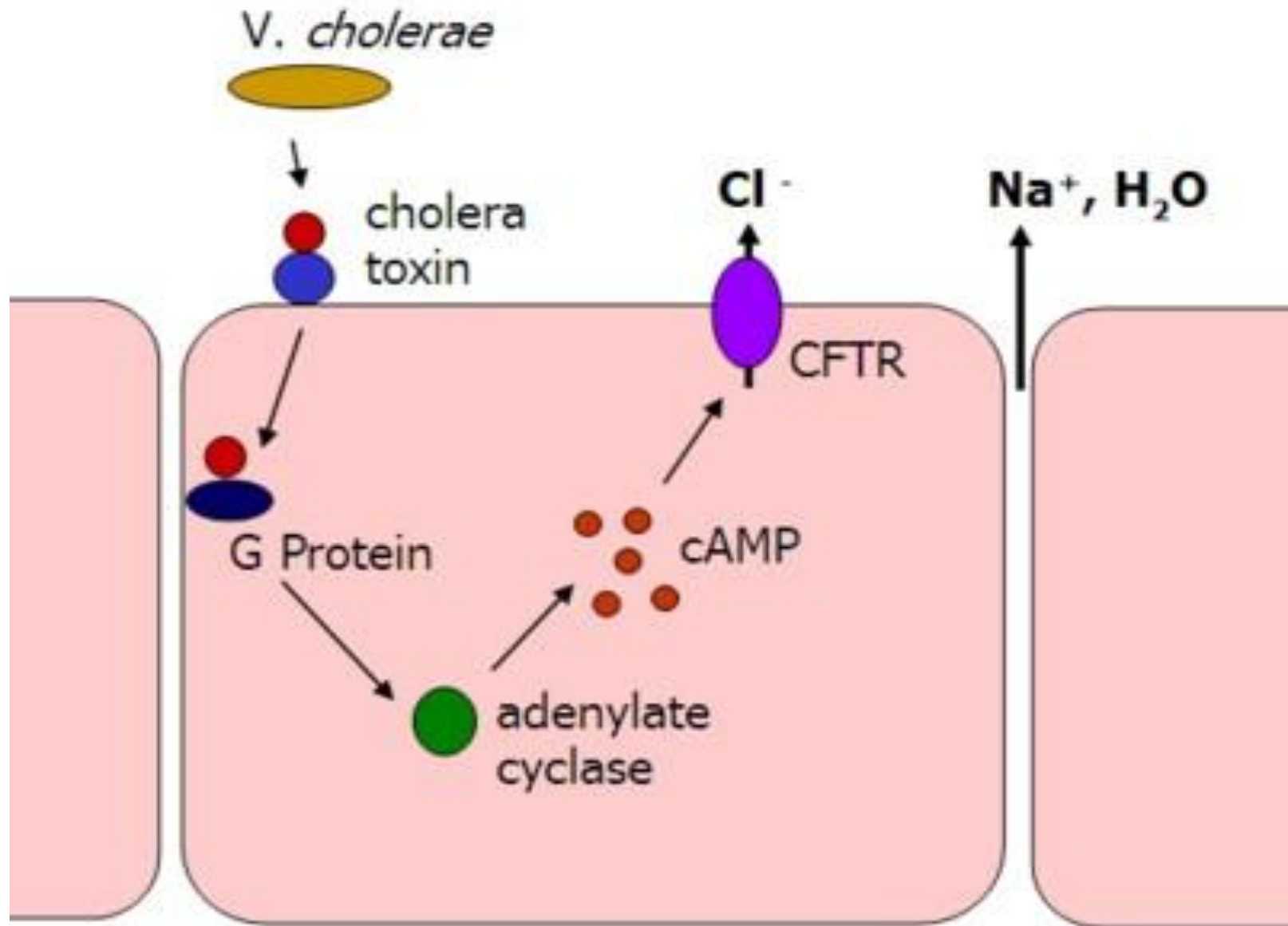
Биологические свойства холерных вибрионов

№	Признак	V. cholerae cholerae O1	V.cholerae eltor O1	V.cholerae O139
1	Чувствительность к полимиксину В (50 ЕД)	+	-	-
2	Чувствительность к классическому холерному бактериофагу С	+	-	-
3	Чувствительность к холерному бактериофагу eltor II	-	+	-
4	Гемолиз эритроцитов барана	-	+	-
5	Агглютинация эритроцитов кур	-	+	+
6	Нитрозоиндоповая			

ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

- ПОДВИЖНОСТЬ, **ХЕМОТАКСИС**
- АДГЕЗИЯ И КОЛОНИЗАЦИЯ
- ФЕРМЕНТЫ АГРЕССИИ (**МУЦИНАЗА**,
ПРОТЕИНАЗА, ЛЕЦИТИНАЗА,
НЕЙРАМИНИДАЗА)
- **ФАКТОР, ПОВЫШАЮЩИЙ ПРОНИЦАЕМОСТЬ**
КАПИЛЛЯРОВ
- **ХОЛЕРОГЕН**
- ЦИТОТОКСИН (НЕКРОТИЧЕСКИЙ,
ШИГАПОДОБНЫЙ)
- ЭНДОТОКСИН

Механизм действия холерного токсина



Бактериологическая диагностика холеры

Материал для исследования:

- клинический: испражнения, рвотные массы, желчь, белье;
- трупный: отрезок тонкой кишки, желчный пузырь;
- окружающая среда: вода, ил, гидробионты, зоопланктон, мухи, смывы;
- пищевые продукты

МАТЕРИАЛ

- ЩА,
- Элективная среда

пептонная вода

- Экспресс методы:
- МФА
 - РИВ
 - РНГА
 - ПЦР

- ЩА,
- Элективная среда

- Отбор подозрительных колоний, (Ориентировочная РА)

- Полиуглеводные среды
- Скошенный ЩА

РА

В лабораторию
ООИ
В эпидситуации –
на месте
по сокращенной
схеме

Сокращенная схема идентификации чистой культуры

Бактериоскопия: по Граму; МФА и РИВ с с O1, O139 сыворотками

Рост на полиуглеводных средах

Оксидазный тест (+)

Окисление/ферментация глюкозы в среде Хью-Лейфсона (к/к)

Ферментация лизина (+), аргинина (-), орнитина (+),

маннита (к), инозита (-), лактозы (-), глюкозы (к), сахарозы (к), арабиноза (-)

Желатина (+), индол (+), нитратредуктаза (+), β-галактозидаза (+)

Биолюминисценция (+/-)

РА с O1, PO, O139

Чувствительность к бактериофагам: классическому и эль-тор

Ориентировочная оценка эпидзначимости:

- гемолитическая активность (-)

- чувствительность к бактериофагам (фаги: stx+ - лизирует токсигенный штамм, stx- - лизирует нетоксигенный штамм)

Полная схема идентификации в лаборатории ООИ

Определение биовара

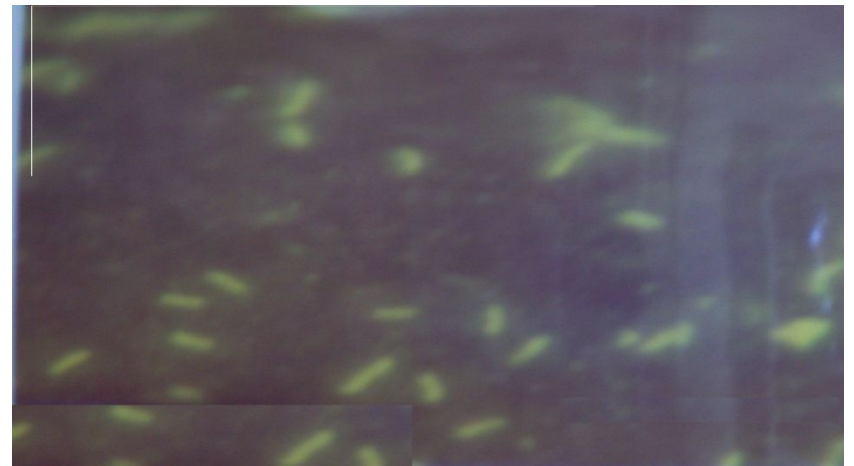
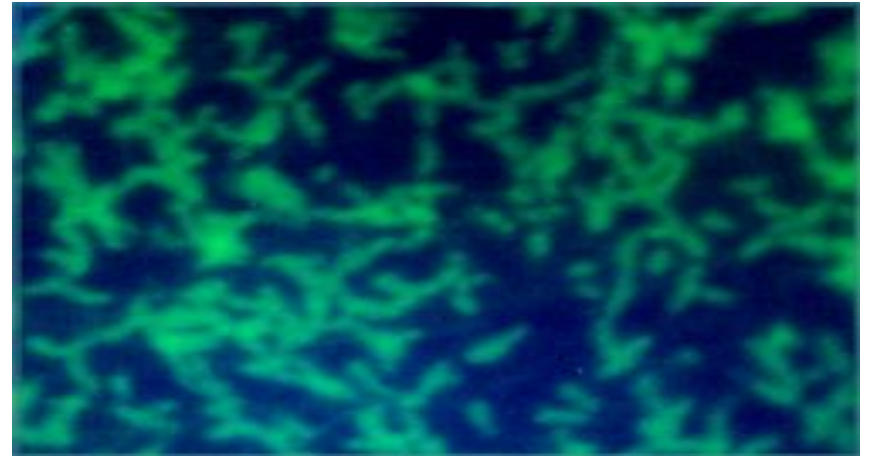
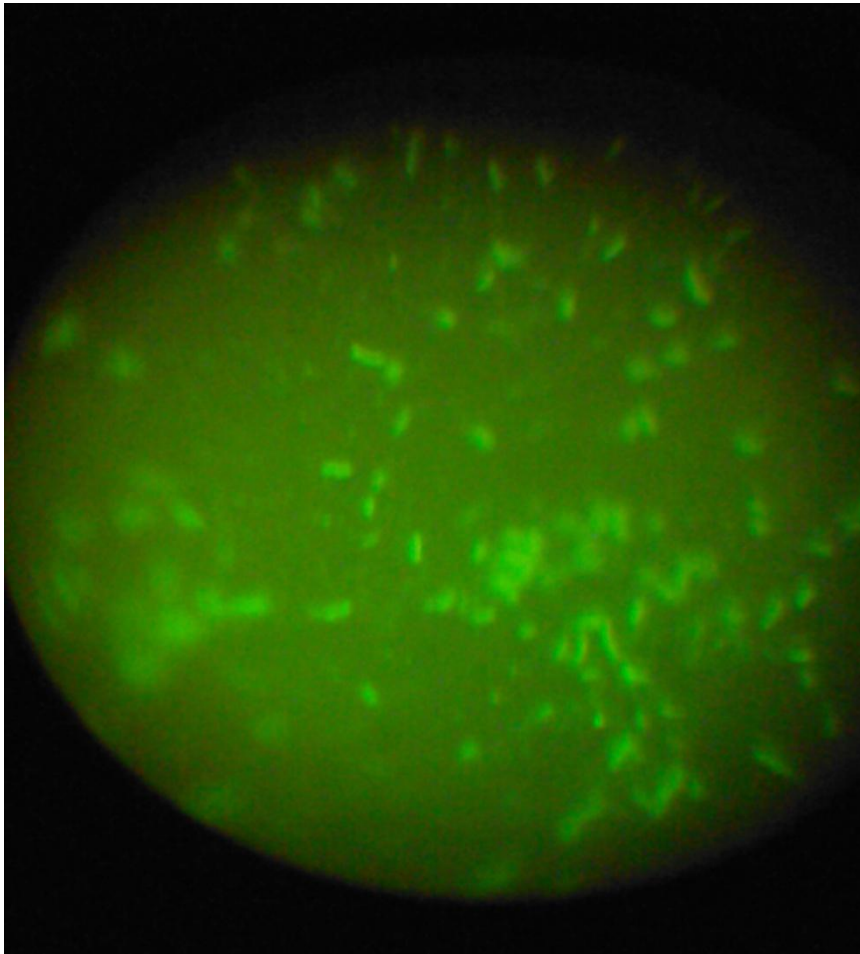
Определение антибиотикограммы

Оценка эпидзначимости:

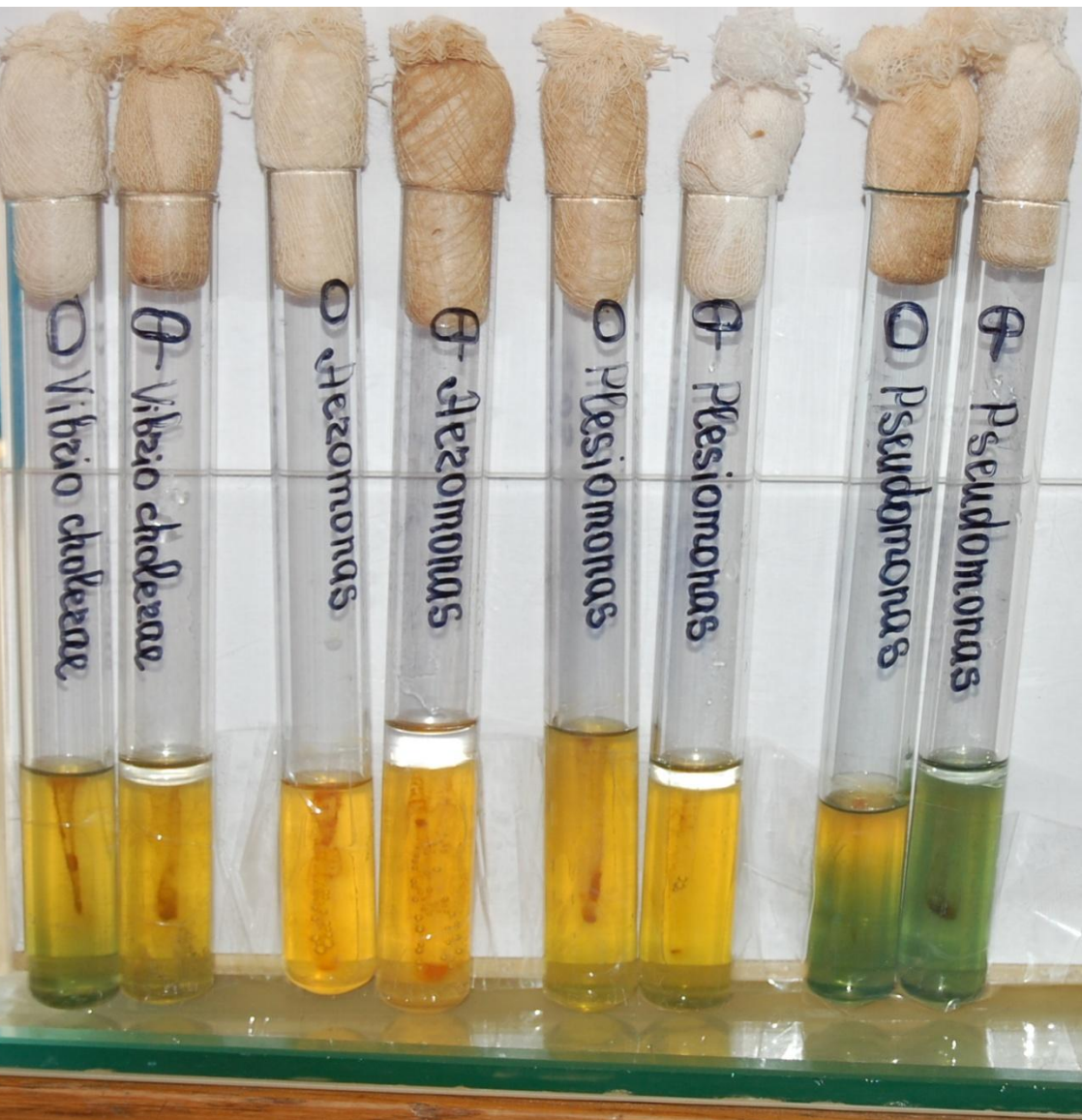
-ПЦР ген stx АБ (холерного токсина) и ген tcp А (токсин-корегулируемых пилей)

(оценка токсигенности биологическим методом)

Люминесцентная микроскопия (МФА) холерных вибрионов O1 серогруппы

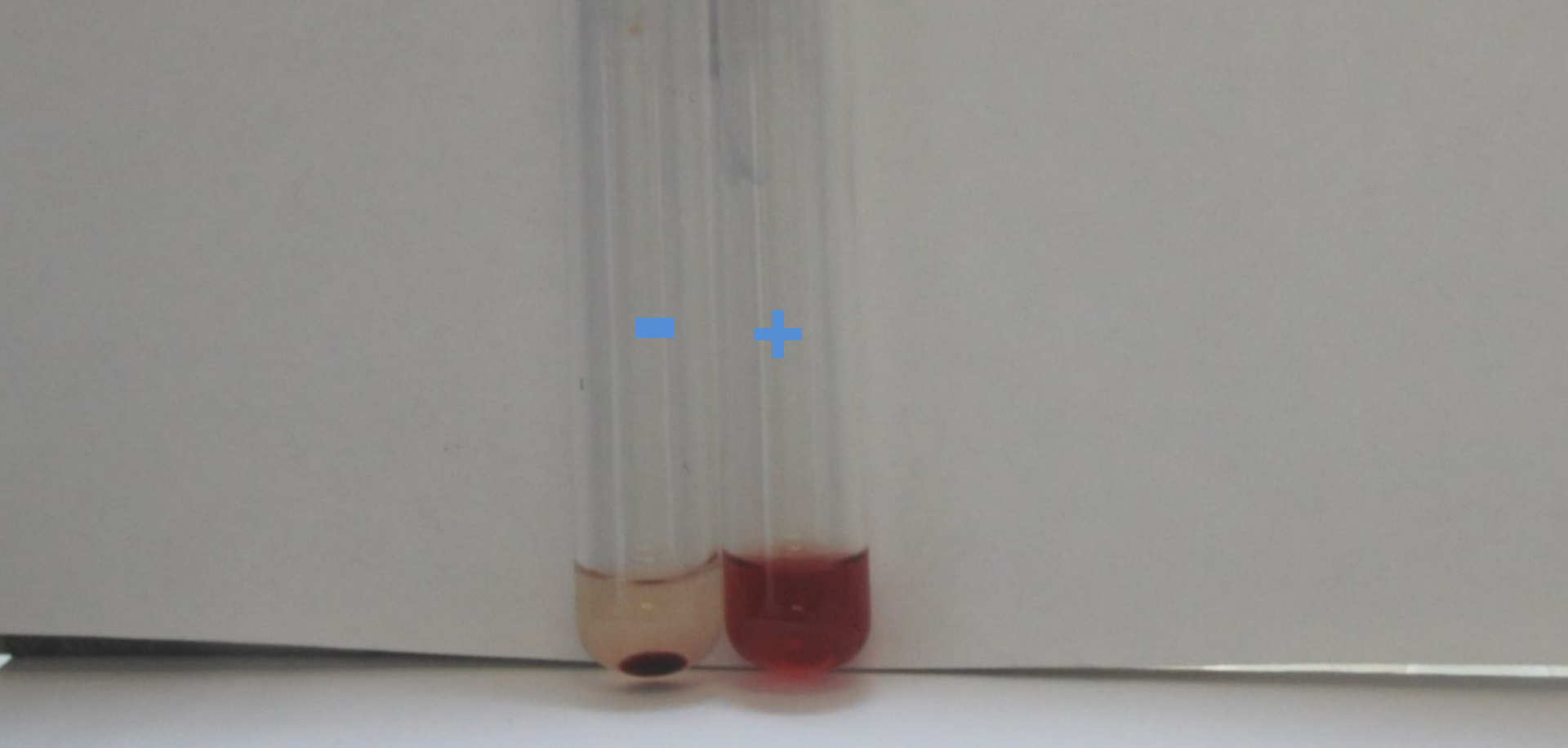


Ферментация глюкозы в среде Хью – Лейфсона (окисление/ферментация)



Среду используют для определения ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях.

Среда содержит высокую концентрацию углевода и низкую концентрацию пептического перевара животной ткани, чтобы образующиеся в ходе ферментации пептона амины не могли нейтрализовать кислоту, которая, в небольшом количестве образуется при окислении углевода. Фосфат придает буферные свойства. Концентрация агар-агара способствует распространению кислоты в среде. Микроорганизмы, окисляющие углевод, продуцируют кислоту в аэробных условиях, а в анаэробных не растут и не образуют кислоту, тогда как ферментирующие образуют кислоту в обеих пробирках (в аэробных и анаэробных условиях).



ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВИБРИОНОВ

Лизабельность холерных вибрионов диагностическими монофагами (классическим и эльтор)



Определение чувствительности к полимиксину



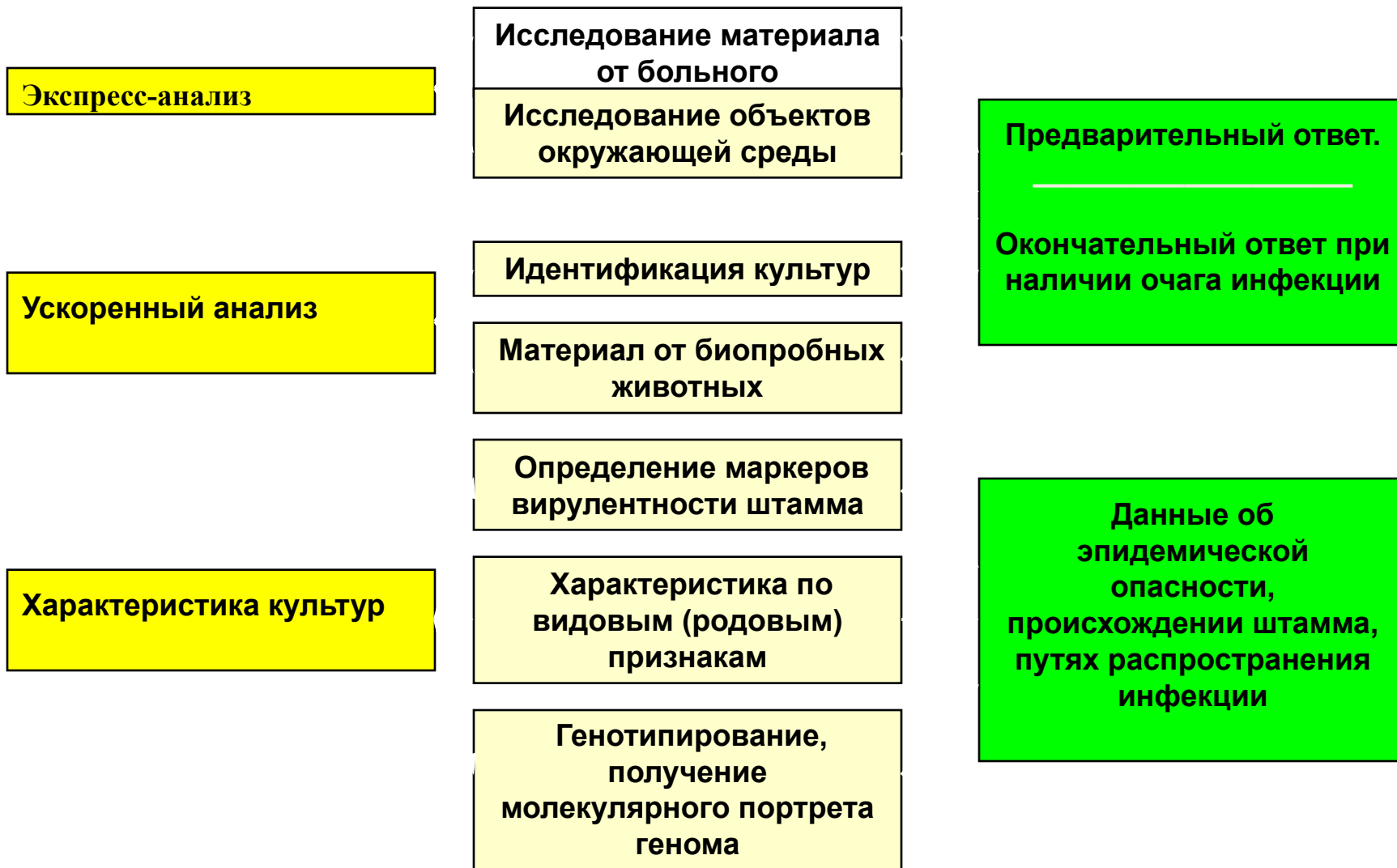
ЛИЗАБЕЛЬНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ФАГАМИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ



Определение чувствительности к антибиотикам методом дисков



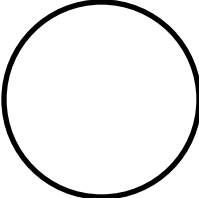
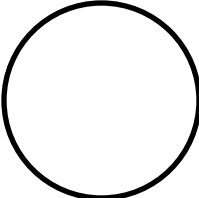
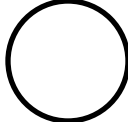
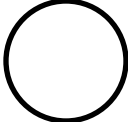
ПРИОРИТЕТЫ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ













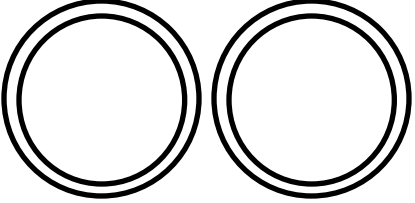
Работа в холерной лаборатории



Протокол. Лабораторная диагностика холеры

Дата	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
	Испражнения, рвотные массы, секционный материал	Посев на 1% щелочную пептонную воду и щелочной питательный агар (ЩА)	
6 часов	Рост на 1% пептонной воде	<ol style="list-style-type: none"> 1) Описать характер роста на пептонной воде 2) Оценить подвижность в препарате «раздавленная капля» 3) Изучить демонстрационный мазок, окрашенный по Граму, зарисовать 4) Пересев на чашку с ЩА 	<ol style="list-style-type: none"> 1) _____ _____ 2) _____ _____ 3) 
12 час	Рост на чашке с ЩА	<ol style="list-style-type: none"> 1) Описать морфологию колоний 2) Приготовить мазок-препарат из колонии, окрасить по Граму, микроскопировать, зарисовать 3) Провести ориентировочную РА с О-І сывороткой на стекле, зарисовать 4) Пересев на скошенный ЩА и на среды Гисса с сахарозой, маннозой, арабинозой 	<ol style="list-style-type: none"> 1) _____ _____ 2)  3) Контроль  Опыт  Заключение: _____ _____

24 часа	Рост на скошенном ЩА и на средах Гисса	<p>1) Оценить чистоту накопленной культуры: визуально и в мазке-препарате</p> <p>2) Провести ориентировочную РА с О-1 сывороткой на стекле</p> <p>3) Оценить развернутую РА с О-1 сывороткой (в демонстрации)</p> <p>4) Оценить развернутую РА с сыворотками Инаба и Огава (в демонстрации)</p> <p>5) Оценить ферментацию сахарозы, маннозы, арабинозы (в демонстрации), определить принадлежность к хемовару по Хейбергу, зарисовать</p> <p>6) Посев для определения биовара: - на среду с полимиксином; - на ЩА для определения чувствительности к бактериофагу Эль-тор</p>	<p>3) Заключение _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>4) Заключение: _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>5)</p> <table style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>Манноза</td> <td>Сахароза</td> <td>Арабиноза</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>Заключение: _____</p> <p>_____</p>	Манноза	Сахароза	Арабиноза			
Манноза	Сахароза	Арабиноза							
									

36 часов	Результат посевов на среду с полимиксином и на чувствительность к бактериофагу	<p>1) Оценить чувствительность к бактериофагу и полимиксину, зарисовать</p> <p>2) Сделать заключение о выделенной культуре</p>	<p>1) Фаг Эль-тор</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Фаг Эль-тор Контроль</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Полимиксин</p> </div> </div> <p>2) Заключение: _____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>
----------	--	--	---

Развернутая реакция агглютинации с О-І сывороткой (титр 1:800)

Разведения сыворотки	1:100	1:200	1:400	1:800	Контроль сыворотки	Контроль антигена
Холерная О-І сыворотка	1мл	1мл	1мл	1мл	1мл	Физ. р-р 1 мл
Взвесь культуры	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	-	0,1 мл
Учет						

Развернутая реакция агглютинации с типовыми сыворотками

Разведения сыворотки	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:2000	Контроль сыворотки	Контроль антигена
Холерная сыворотка Огава, титр 1:2000	1мл	1мл	1мл	1мл	1мл	1мл	Физ.р-р 1мл
Взвесь культуры	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	-	0,1 мл
Учет							

Разведения сыворотки	1:50	1:100	1:200	1:400	Контроль сыворотки	Контроль антигена
Холерная сыворотка Инаба, титр 1:400	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	Физ.р-р 1 мл
Взвесь культуры	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	-	0,1 мл
Учет						

Специфическая профилактика холеры

Холероген-анатоксин - очищенный и концентрированный препарат, полученный из центрифугата бульонной культуры холерного вибриона штамма 569В, обезвреженного формалином.

Холерная вакцина корпускулярная относится к числу убитых вакцин и готовится на основе вирулентных штаммов холерного вибриона классического биотипа или биотипа Эль-Тор серотипов Инаба и Огава, инактивированных нагреванием или формалином.

Вакцина холерная бивалентная химическая (Холероген-анатоксин и О-антиген) - смесь холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур *V. cholerae* O1 классического биовара штаммов 569 В или KM-76 (569 pCO107-2) серовара Инаба и M-41 серовара Огава, путем выделения, очистки и концентрирования сернокислым аммонием)

Вакцинация и ревакцинация проводятся по эпидемиологическим показаниям с целью профилактики холеры и регулируются вышестоящими органами здравоохранения. Проводятся однократно за месяц перед эпидемическим сезоном один раз в год.