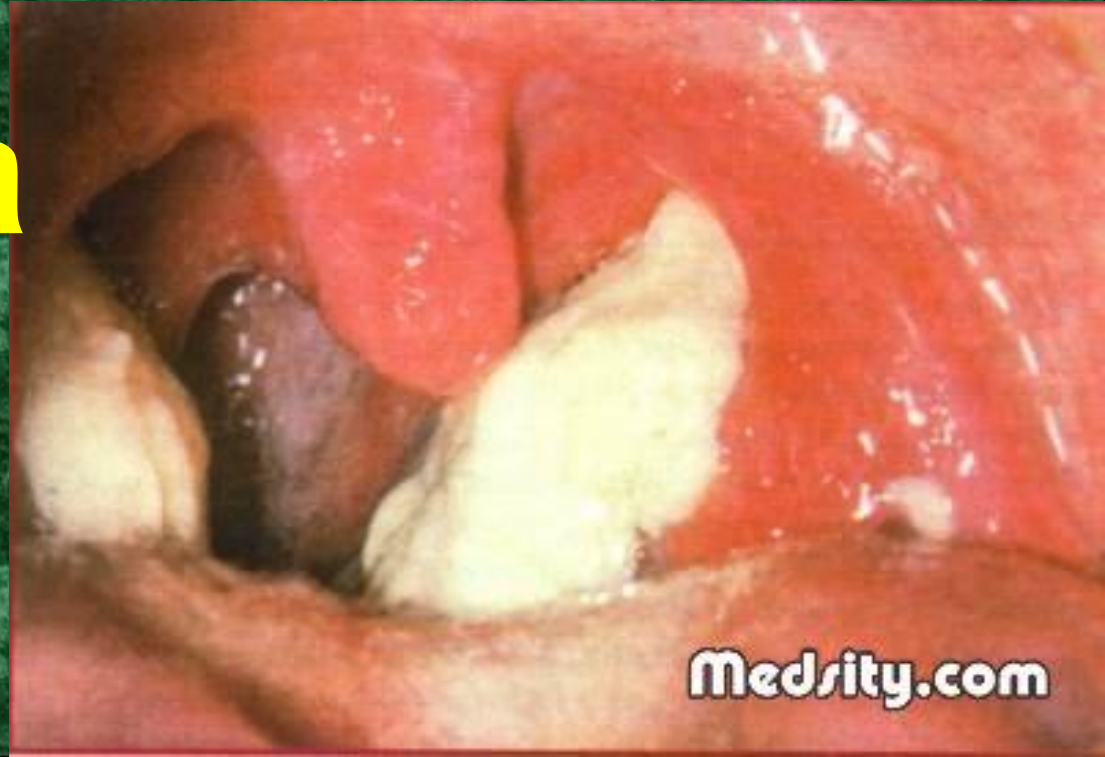


# Лабораторная диагностика дифтерии и коклюша



# КЛАССИФИКАЦИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

**ПОРЯДОК** Actinomycetales

**СЕМЕЙСТВО** Corynebacteriaceae

**РОД** Corynebacterium

## **ВИДЫ**

Corynebacterium non diphtheriae

**ВОЗБУДИТЕЛЬ ДИФТЕРИИ**

**C. diphtheriae**

**C. pseudotuberculosis**

верхние дыхательные пути  
поверхность кожи  
урогенитальный тракт

**C. pseudodiphtheriticum**

верхние дыхательные пути  
поверхность кожи

**C. xerosis**

поверхность кожи  
урогенитальный тракт

**C. amycolactum**

урогенитальный тракт

**БИОВАРЫ:**

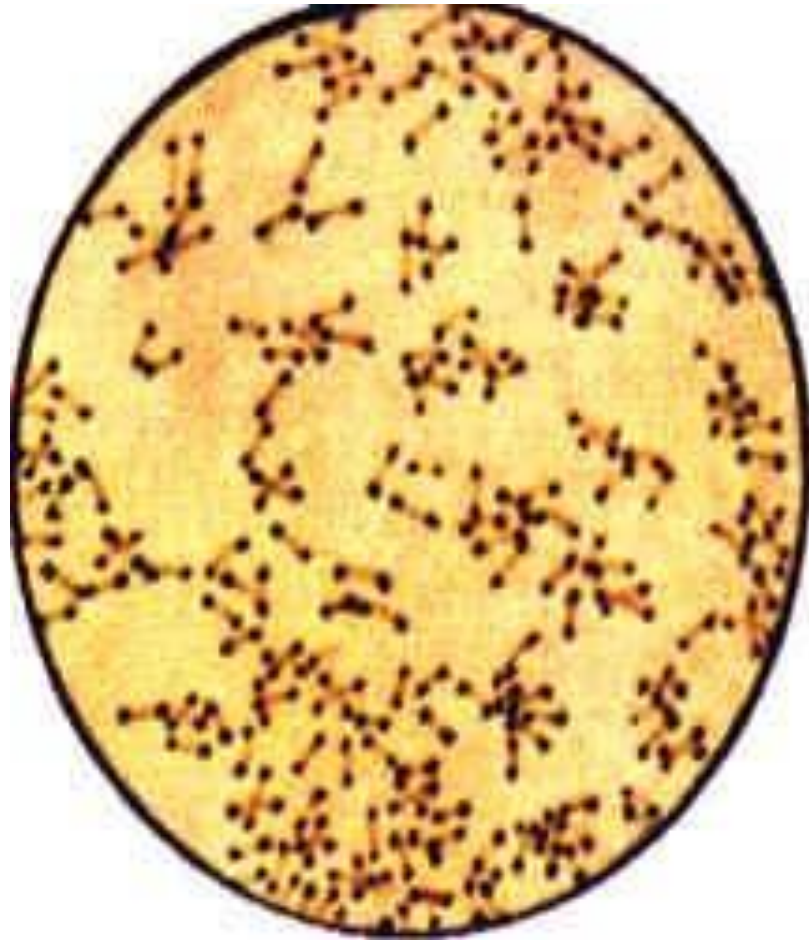
***gravis***

***mitis***

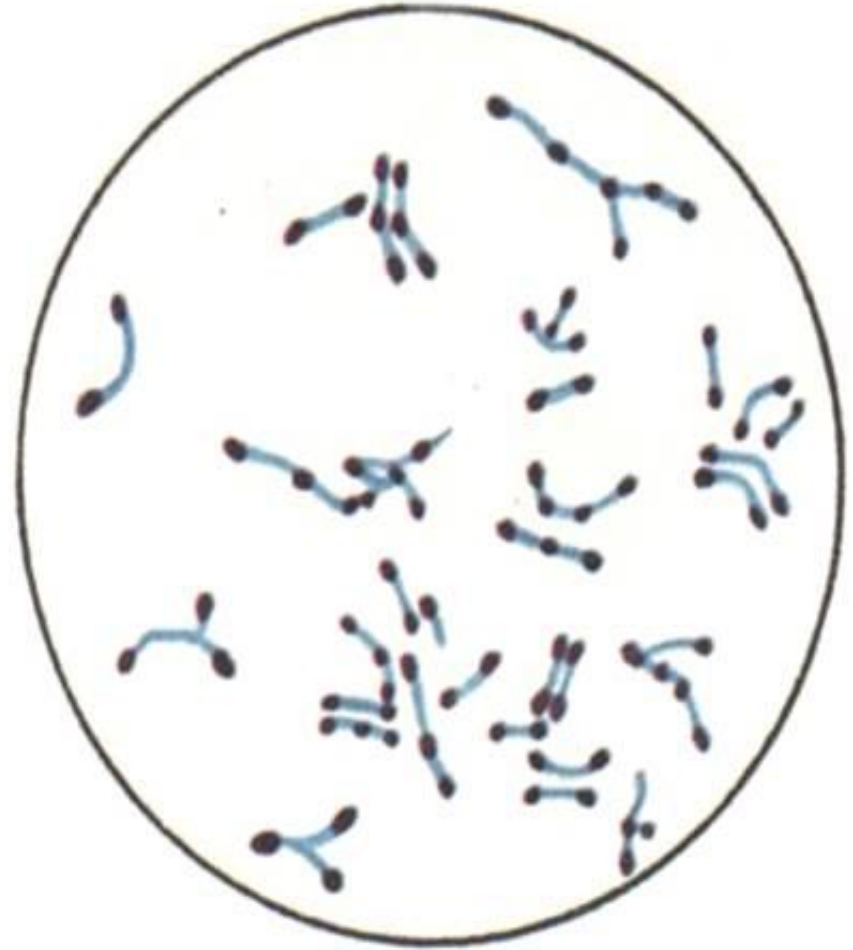
***intermedius***

# МАЗОК ИЗ КУЛЬТУРЫ *C. diphtheriae*

ОКРАСКА ПО НЕЙССЕРУ



ОКРАСКА ПО ЛЕФФЛЕРУ



# СРЕДЫ ДЛЯ ПЕРВИЧНОГО ПОСЕВА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

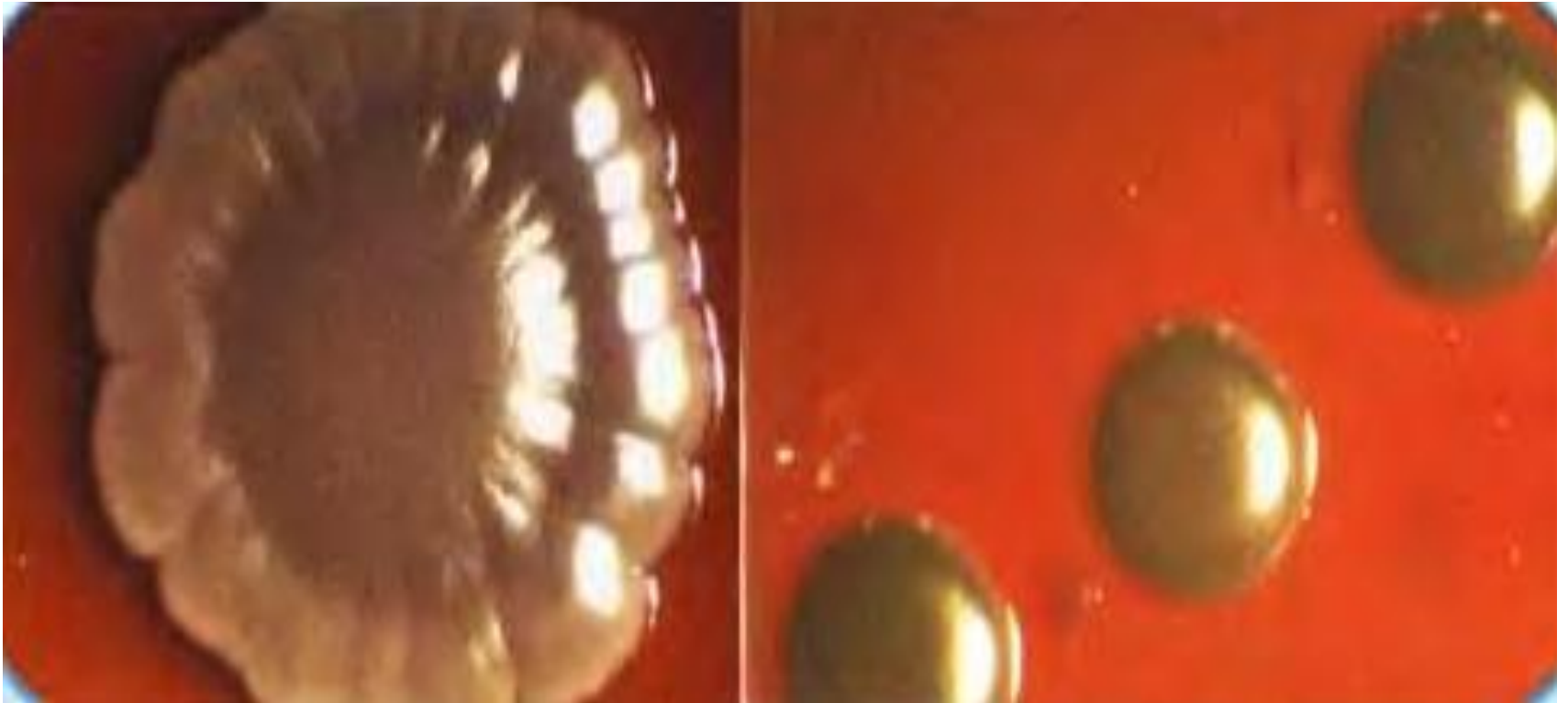
## Среда Клауберга II

- Питательный агар
- Теллурит калия
- Глицериновая смесь
- Лаковая кровь

## Кровяной теллуритовый агар (КТА)

- Питательный агар
- Теллурит калия
- Дефибрированная или гемолизированная кровь

# Колонии *C. diphtheriae* на среде Клауберга



Биовар *gravis*

Биовар *mitis*

# ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ сухая (КОРИНЕБАКАГАР)

## НАЗНАЧЕНИЕ:

Для выделения коринебактерий из инфицированного материала от больных дифтерией, реконвалесцентов и носителей.

РУ № ФСР 2007/00003.

Патент РФ № 2041947.

## КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ:

Панкреатический гидролизат рыбной муки, стимулятор роста гемофильных микроорганизмов, натрий хлористый, глюкоза, агар.  
Добавка - раствор теллурита калия.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА:

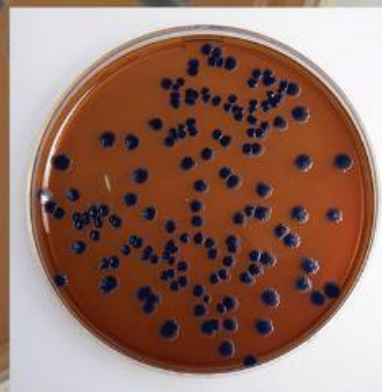
Тест-штамм	Наблюдаемый эффект
<i>Corynebacterium diphtheriae gravis</i> 665	Шероховатые, темно-серые колонии со складчатой поверхностью и неровными краями - тип «маргаритки» диаметром 2,0-3,5 мм
<i>Corynebacterium diphtheriae mitis</i> 6765	Круглые, гладкие, темно-серые, блестящие, с ровными краями колонии диаметром 1,5-3,0 мм
<i>Corynebacterium xerosis</i> 1911	Круглые, выпуклые, блестящие, серовато-черного цвета колонии, диаметром 1,2-2,0 мм
<i>Corynebacterium ulcerans</i> 675	Круглые, выпуклые, блестящие, серовато-черного цвета колонии, диаметром 0,5-1,5 мм
<i>Staphylococcus aureus</i> Wood-46	Рост подавлен
<i>Streptococcus pyogenes</i> Dick I	Рост подавлен



*Corynebacterium diphtheriae mitis*



*Corynebacterium ulcerans*

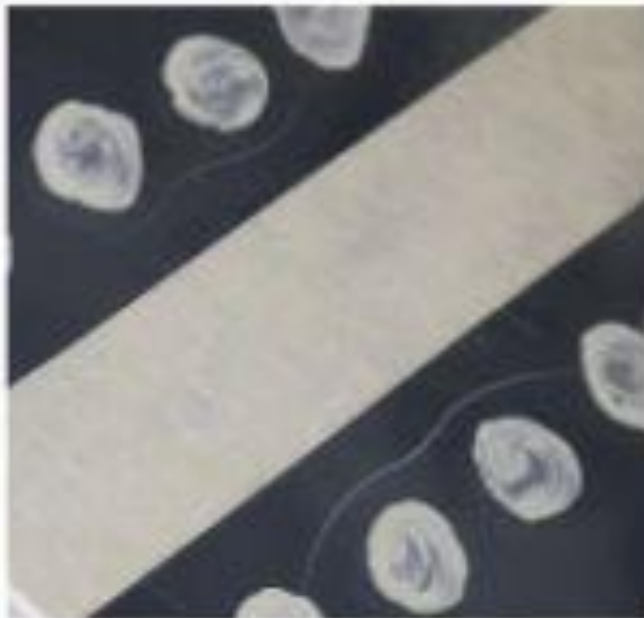


*Corynebacterium diphtheriae gravis*

# ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ *C. diphtheriae*

Факторы вирулентности	Биологический эффект
Белковый экзотоксин (гистотоксин) состоит из А- и В-субъединиц	Нарушает синтез белка, поражая клетки миокарда, надпочечников, нервных ганглиев
Гликолипид (6-6'-дизфир-трегалозы)	Нарушает фагоцитоз
Гиалуронидаза	Нарушают проницаемость ткани
Нейраминидаза	

## Коринетоксагар



*C. diphtheriae gravis, C. diphtheriae mitis, C. diphtheriae intermedius*

## Коринетоксагар

предназначен для определения токсигенности дифтерийных микробов.

**Состав:** панкреатический гидролизат минтая, натрия хлорид, натрия карбонат, агар, 20 % сыворотки крови крупного рогатого скота или сыворотки лошадиной.



Токсигенная культура

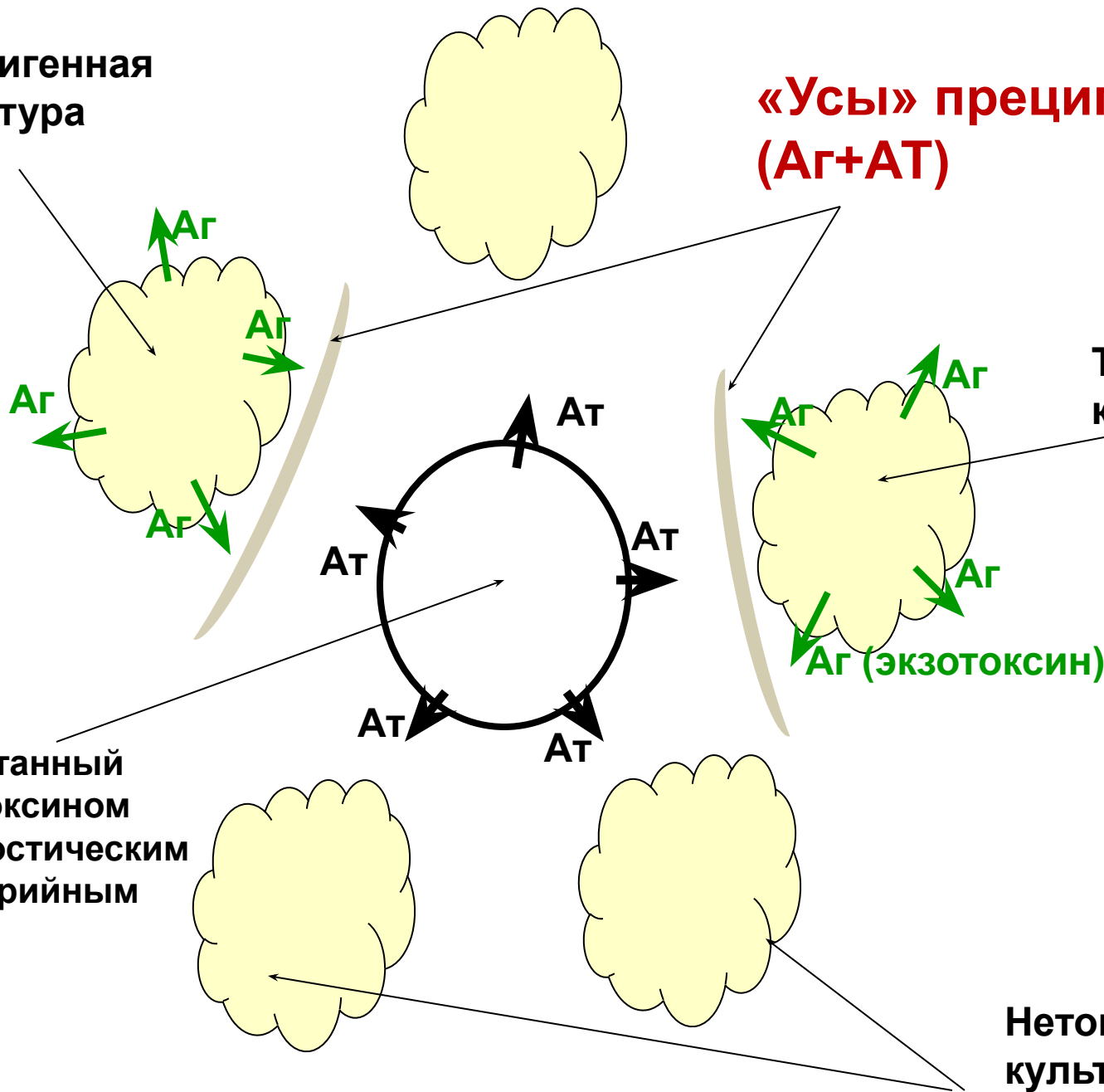
«Усы» преципитации (Ag+AT)

Токсигенная культура

Ag (экзотоксин)

Диск, пропитанный антитоксином диагностическим дифтерийным

Нетоксигенные культуры

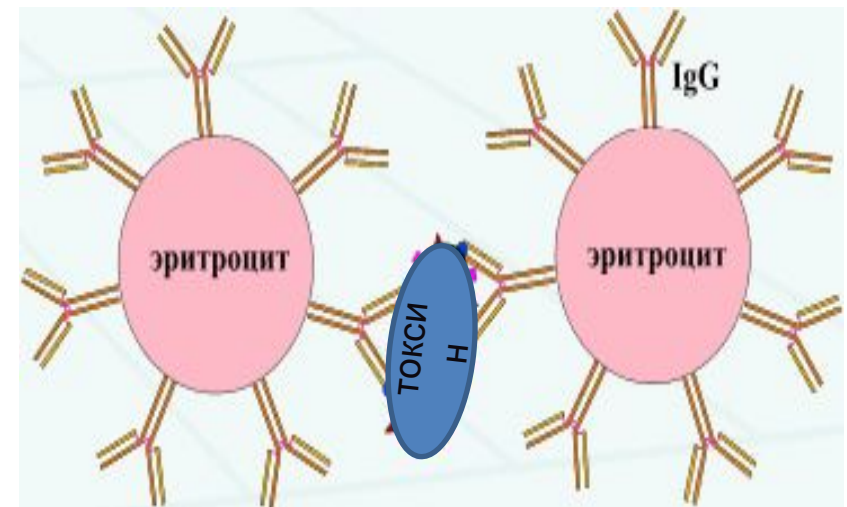


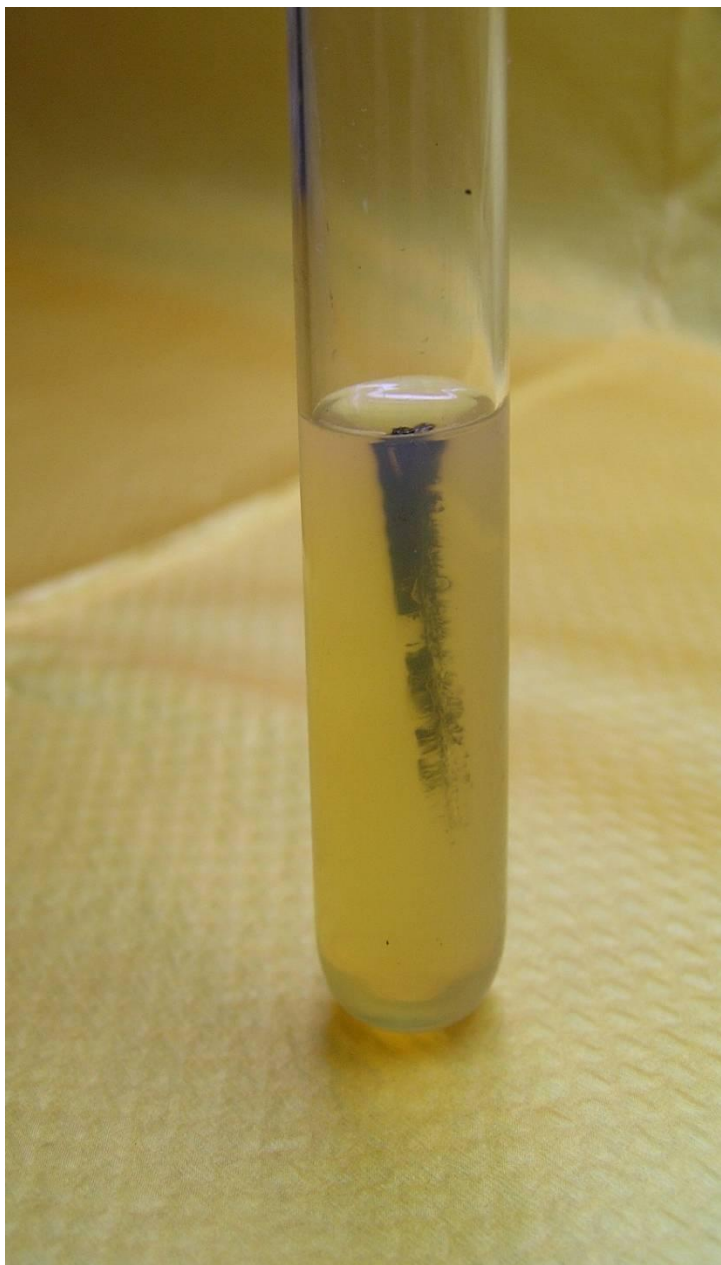
# РНГА (РОПГА) для выявления дифтерийного ТОКСИНА

Диагностикум эритроцитарный дифтерийный  
антительный жидкий для определения токсина в РНГА – моноклональные  
антитела, связанные с эритроцитами.

Штаммы коринебактерий дифтерии засевают в жидкую питательную среду и  
инкубируют при **37° С** в течение  
**18** часов, используют надосадочную жидкость среды культивирования

Через **2,5 - 3,5** часа производят учет результатов реакции. Допускается -  
через **18 - 24** часа.





## Положительная проба Пизу на наличие цистиназы

В составе питательной среды:  
цистин и уксусно - кислый свинец.

Цистиназа расщепляет цистин, выделяется сероводород, который взаимодействуя с индикатором, образует серно - кислый свинец - соединение темно - коричневого цвета.

Инкубация **37 °C – 24** часа  
Ускоренный метод - большое количество культуры – **3** часа.

# Проба на наличие уреазы



***C. diphtheriae***  
не имеет уреазы

В составе питательной среды:  
мочевина и фенолрот (крезолрот).  
Уреаза расщепляет мочевину с  
образованием аммиака и углекислоты.  
Повышается рН среды - покраснение  
индикатора.

При отсутствии фермента среда  
остается желтой.

Ускоренная проба Заксе: 37 °С – 30 мин.  
Бульон с мочевиной: 37°С – 24 часа

# Определение активности нитратредуктазы

Тест позволяет определить способность восстанавливать нитраты в нитриты. Способность к восстановлению  $\text{NO}_3$  в  $\text{NO}_2$  определяют культивированием в МПБ 24 часа при  $37^\circ \text{C}$ , содержащем 1% раствор  $\text{KNO}_3$ . Для определения нитритов в среду добавляют несколько капель реактива Грисса. Этот реактив состоит из сульфаниловой кислоты и  $\alpha$ -нафтиламина. При взаимодействии реактива Грисса с нитритами образуется азокраситель, и при положительном результате наблюдают появление красного окрашивания.



Вид	Разложение					Редукция нитратов
	цистина	глюкозы	сахарозы	крахмала	мочевины	
<b><i>C. diphtheriae gravis</i></b>	+	K	-	K	-	+
<b><i>C. diphtheriae mitis</i></b>	+	K	-	-	-	+
<b><i>C. pseudo-diphtheriticum (C. hofmani)</i></b>	-	-	-	-	+	+

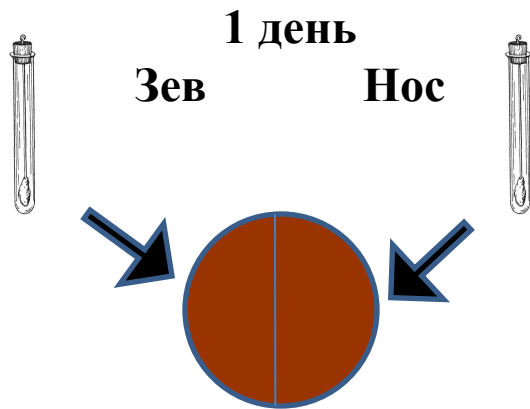
# **БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД**

**Исследуемый материал  
(отделяемое слизистой  
зева, носа и  
из места атипичной  
локализации)**

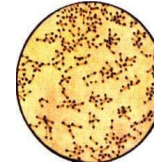
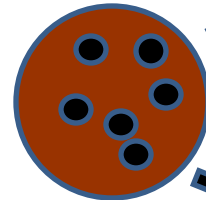


Тампоны должны быть доставлены в лабораторию не позднее **3**-х часов с момента взятия материала.

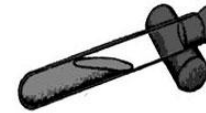




24 часа  
2 день



**Постановка проб на:**  
**токсигенность, цистиназу**



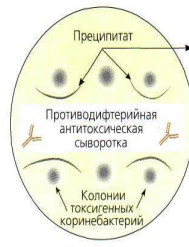
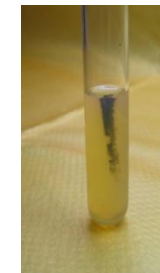
48 часов / 3 день



**Посев на:**  
**сахарозу**  
**глюкозу**  
**крахмал**  
**мочевину**

**Учет**

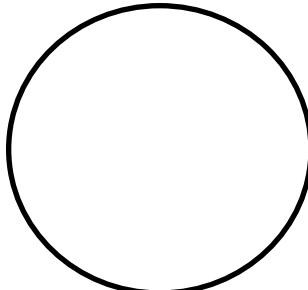
72 часа / 4 день

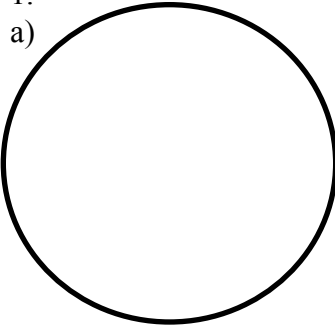
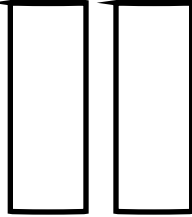
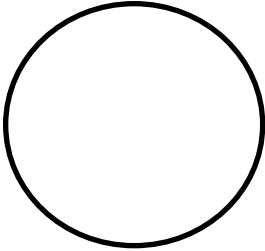













**Учет свойств**

**Определение биохимического варианта**

# Протокол. Лабораторная диагностика дифтерии

День исслед-я	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
1 день	Отделяемое слизистой зева, носа (из мест атипичной локализации) на тампонах	Посев на чашку с КТА	
2 день	2)Рост колоний на чашках с КТА (24 часа)	1) Описать колонии  2)Изучить и зарисовать мазок из материала колоний, окраска по Нейссеру (Леффлеру) – демонстрация  3) Поставить пробы на: - токсигенность, - цистиназу  4) Провести пересев на скошенный сывороточный агар	1) _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____  2) 

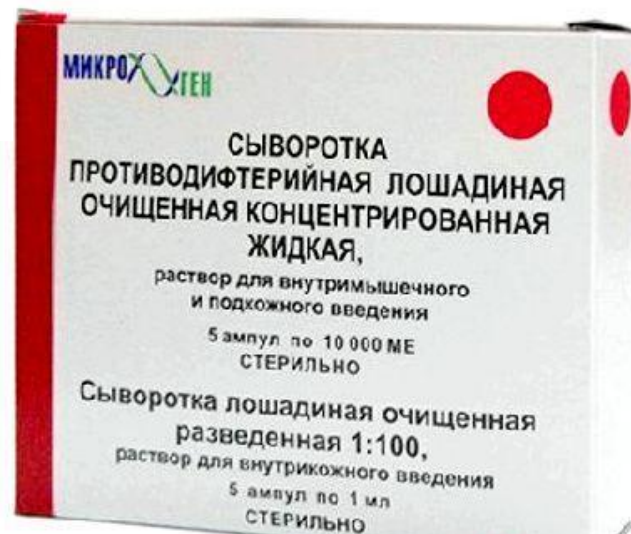
<p>3 день</p>	<p>1. Пробы на а) токсигенность б) цистиназу</p> <p>2. Рост чистой культуры на скошенном сывороточном агаре</p>	<p>1) Учесть результаты проб, зарисовать</p> <p>2) Описать характер роста.</p> <p>3) Приготовить мазок-препарат, окрасить по Нейссеру, зарисовать</p> <p>4) Провести посев на среды Гисса с сахарозой, глюкозой, крахмалом, тест с мочевиной</p>	<p>1. а) </p> <p>б)  C. diphtheriae Цистиназа</p> <p>2. Рост в виде «шагренево́й кожи»</p> <p>3. </p>
<p>4 день</p>	<p>Рост культуры на средах Гисса с сахарозой, глюкозой, крахмалом, тест с мочевиной.</p>	<p>Изучить биохимические свойства</p>	<p><i>C. diphtheriae gravis</i>   </p> <p><i>C. diphtheriae mitis</i>   </p> <p><i>C. hofmani</i>   </p> <p>Сахароза    Глюкоза    Крахмал</p> <p><i>C. diphtheriae</i>   C. diphtheriae <math>\langle\langle - \rangle\rangle</math>    <math>\langle\langle + \rangle\rangle</math> Уреаза</p>
<p>Заключение:</p>			

# Противодифтерийная сыворотка

получена в 1892 году Э.Берингом и использована для лечения в 1894 году.



**Показания для применения.**  
Лечение больных дифтерией.



# дифтерийный анатоксин



Гастон Рамон  
(1886-1963)

Культуру бактерий, продуцирующих экзотоксин, выращивают в жидких питательных средах для накопления токсина, а затем фильтруют через бактериальные фильтры для удаления микробных тел. К фильтрату добавляют 0,3—0,4% раствора формалина и помещают в термостат при температуре 37—40 °С на 3—4 нед до полного исчезновения токсических свойств.

## Вакцины, содержащие дифтерийный анатоксин

- АКДС
- АДС-анатоксин
- АДС-М- анатоксин
- АД-М-анатоксин
- Д.Т. Вакс (дифтерия, столбняк)
- БУБО-Кок (дифтерия, столбняк, коклюш, гепатит В)

# Тетракок

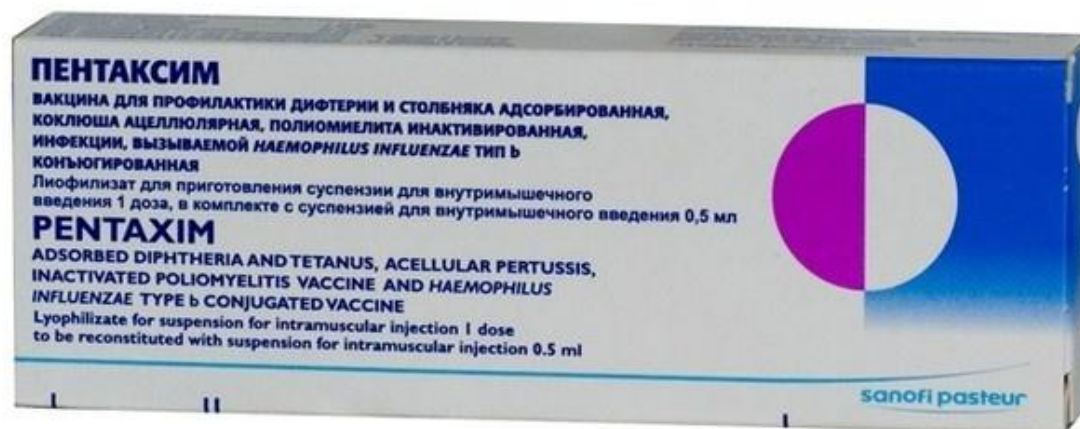
Тетракок - вакцина для комбинированной профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и полиомиелита у детей с 2-мес. до 6 лет;

1 доза вакцины Тетракок (0,5 мл) содержит:

- очищенный дифтерийный анатоксин,
- очищенный столбнячный анатоксин
- Bordetella pertussis*,
- инактивированные вирусы полиомиелита 1,2,3 типов,
- гидроокись алюминия, формальдегид, фенолэтанол.



**Пентаксим®** содержит антигены дифтерийного и столбнячного анатоксина, компоненты клеточной стенки возбудителя коклюша, инактивированный вирус полиомиелита 1,2,3 типов и капсульные полисахариды гемофильной палочки тип b. Разовая доза составляет 0,5 мл. Профилактика у детей от 3-х месяцев до 3 лет 11 месяцев 29 дней.





**Инфанрикс ИПВ - ацеллюлярная  
вакцина для профилактики:**

**Дифтерии, коклюша, столбняка,  
полиомиелита**

**Состав: ДТ, СТ, 3 Ag коклюшного  
микроба (КТ+ФГА+ПРТ),  
3 инактивированных вируса  
полиомиелита  
(тип 1, 2, 3)**

**Инфанрикс Пента - ацеллюлярная  
вакцина для профилактики:**

**Дифтерии, коклюша, столбняка,  
полиомиелита, гепатита В**

**Состав: ДТ, СТ, 3 Ag коклюша  
(КТ+ФГА+ПРТ), 3 инактивированных  
вируса полиомиелита (тип 1, 2, 3),  
очищенный HBsAg**

**Инфанрикс Гекса -ацеллюлярная вакцина  
для профилактики:**

**Дифтерии, коклюша, столбняка,  
полиомиелита, гепатита В, Нiв - инфекции**

**Состав: ДТ, СТ, 3 Ag коклюшного  
микроба (КТ+ФГА+ПРТ), 3  
инактивированных вируса  
полиомиелита (тип 1, 2, 3), очищенный  
HBsAg,  
конъюгат капсульного  
полисахарида Нiв**



# БОРДЕТЕЛЛЫ

РОД **Bordetella**

ВИДЫ

**B. pertussis**

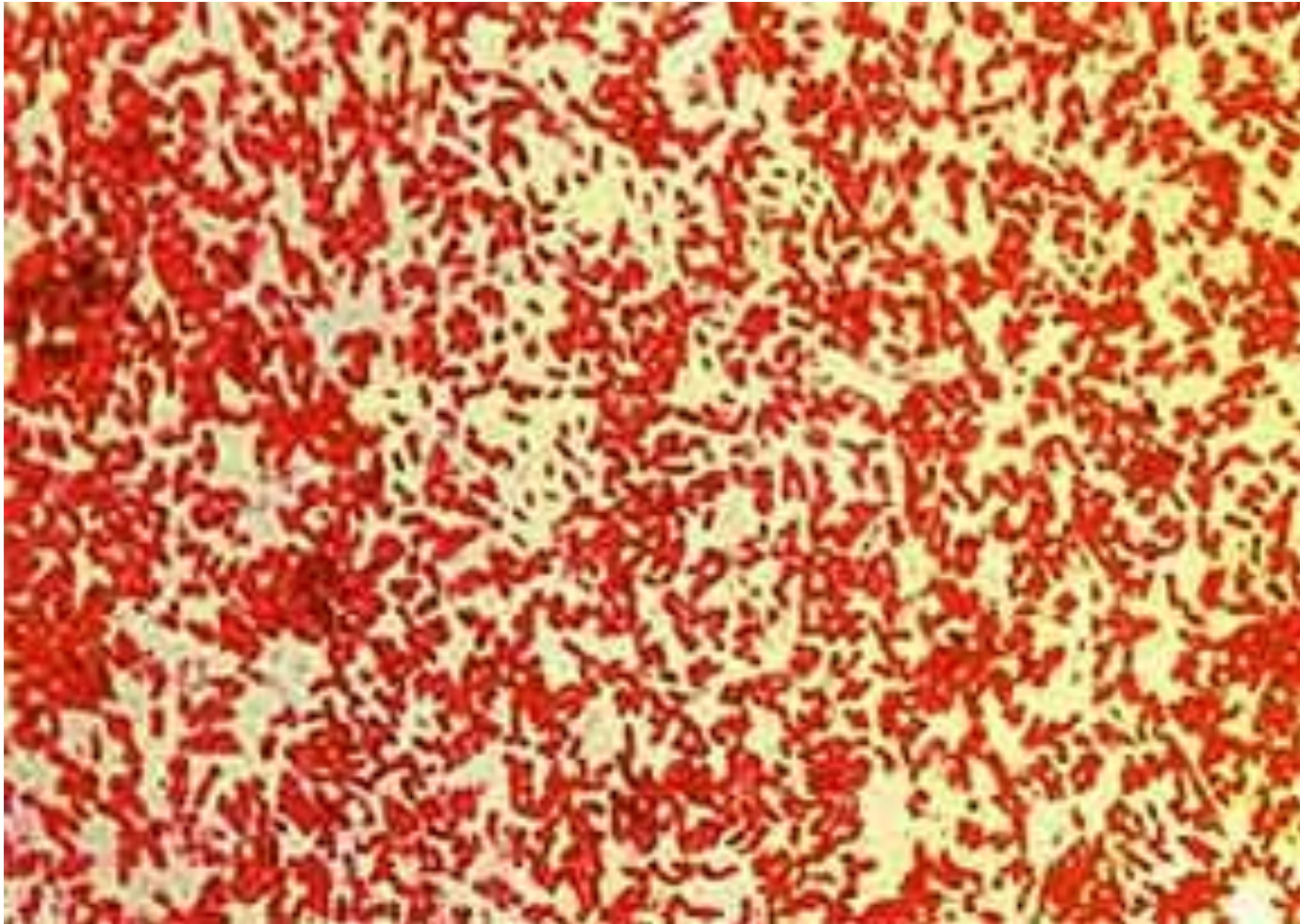
**B. parapertussis**

**B. bronchiseptica**

**B. avium**



Мазок из чистой культуры ***B. pertussis***,  
окраска по методу Грама



# Рост колоний ***B. pertussis*** на кровяном агаре

78



# ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ КОКЛЮШНОГО МИКРОБА сухая (БОРДЕТЕЛАГАР)

## НАЗНАЧЕНИЕ:

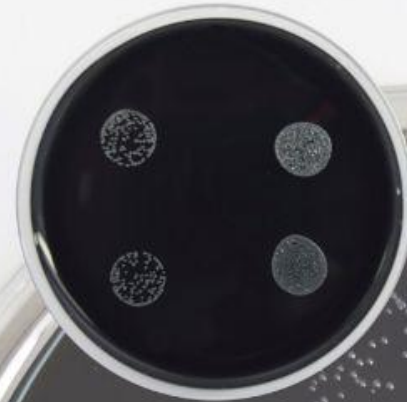
Для выделения коклюшного микроба из инфицированного материала от больных коклюшем и контактных лиц, а также для культивирования штаммов бордетелл. РУ № ФСР 2012/13688

## КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ:

Кислотный гидролизат казеина, стимулятор роста гемофильных микроорганизмов, панкреатический гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, крахмал растворимый, уголь активированный, натрия карбонат, комплекс микроэлементов, агар микробиологический.

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА:

Тест-штамм	Наблюдаемый эффект
<i>Bordetella pertussis</i> №№ 39, 143, 688 и 796	Гладкие круглые блестящие серовато-белые колонии с ровными краями



*Bordetella pertussis*



*Bordetella pertussis*

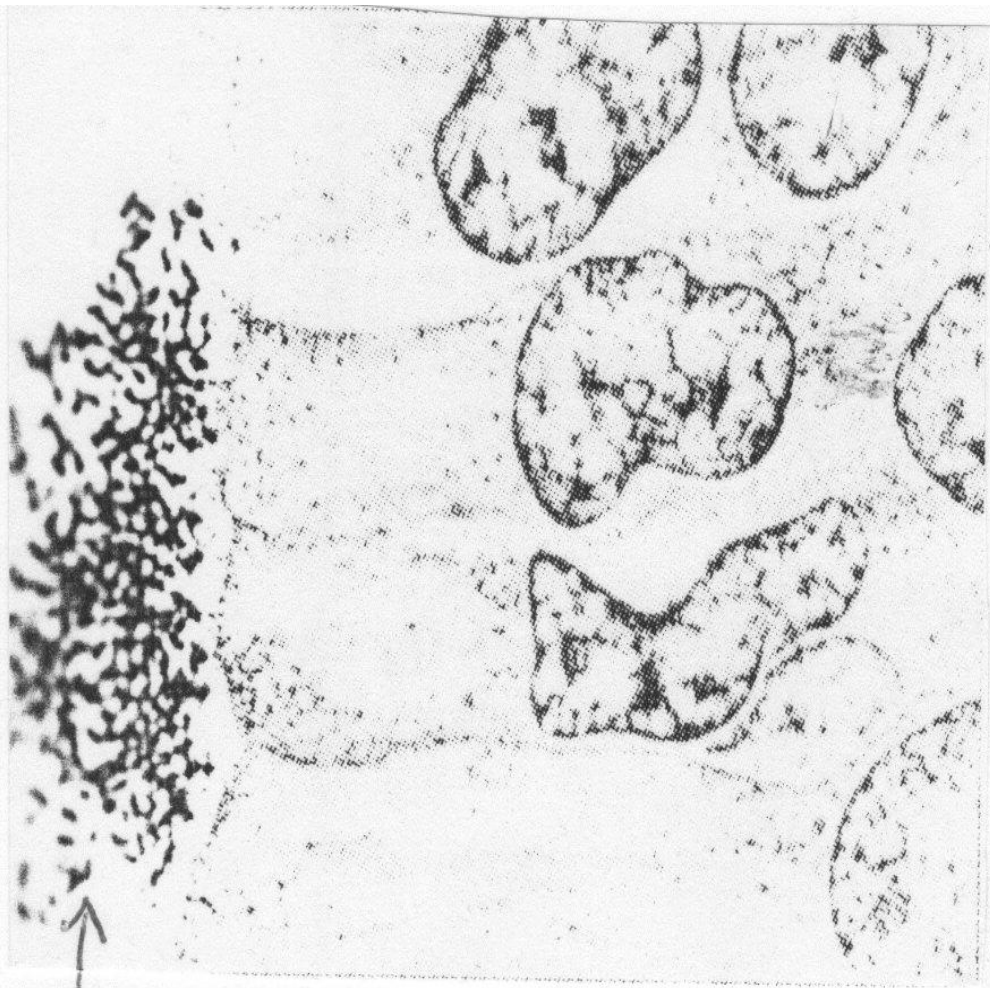


*Bordetella pertussis*

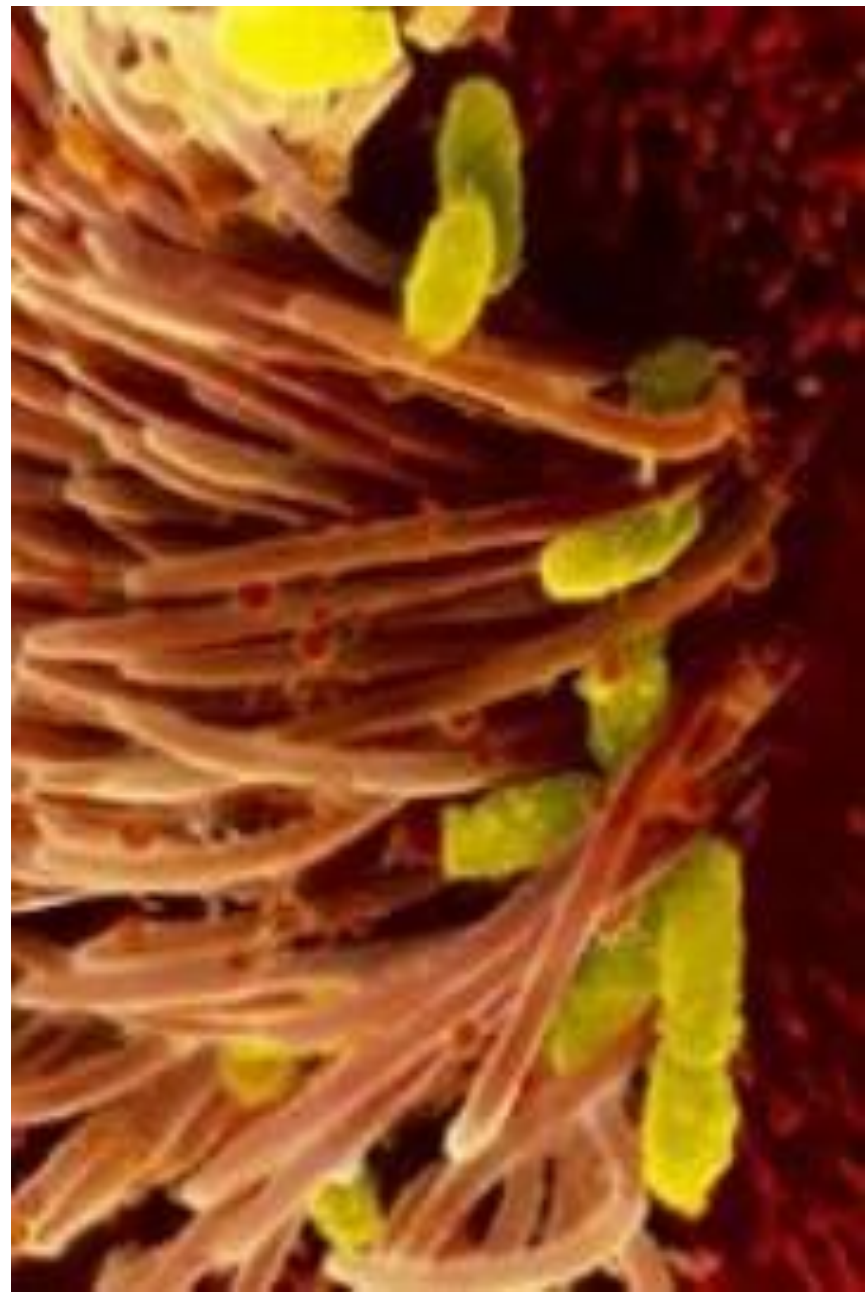
Таблица 1. Факторы вирулентности *B. pertussis*

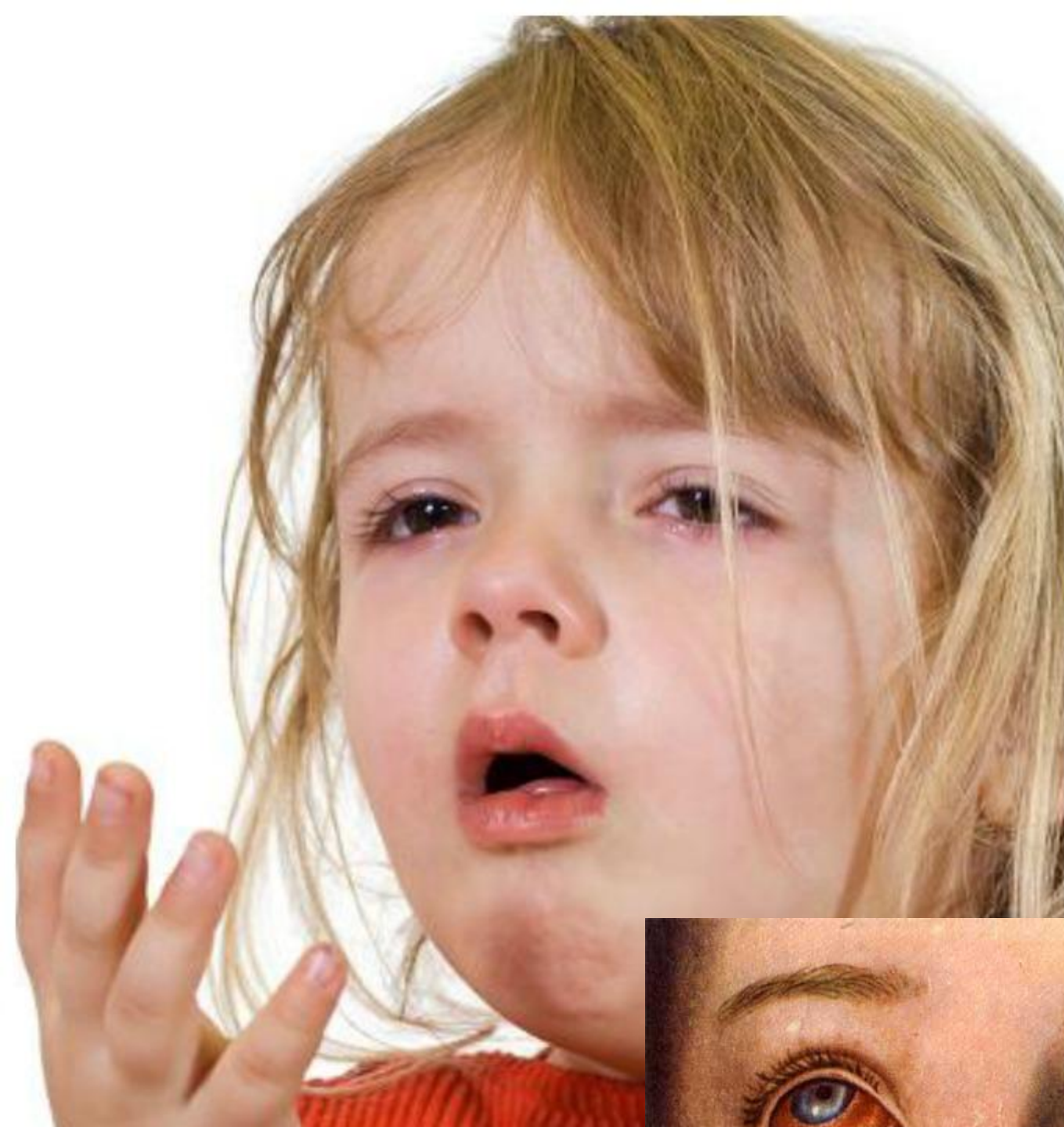
Фактор вирулентности	Механизм действия
Филаментозный гемагглютинин (FHA)	Способствует прикреплению к респираторному эпителию
Пертактин (PRN)	Способствует соединению с реснитчатыми респираторными клетками
Агглютиногены фимбрий (Fim)	Факторы адгезии
Фактор А резистентности бордетеллы к уничтожению (BrkA)	Резистентность к системе комплемента
Трахеальный колонизационный фактор (TCF)	Адгезин в трахее
Vag8	Белок наружной мембраны
Коклюшный токсин (PT)	Стимулирует лимфоцитоз
Аденилатциклазный токсин (ACT)	Действует как противовоспалительный и антифагоцитарный фактор во время инфекции
Трахеальный цитотоксин	Повреждение тканей дыхательных путей
Дермонекротический токсин	
Липополисахарид (LPS)	Эндотоксин



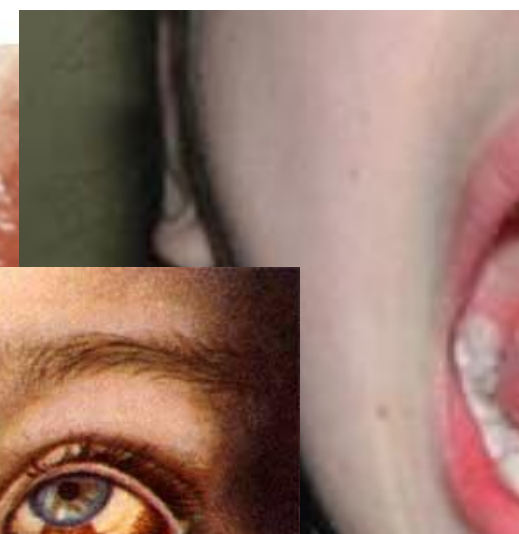


← Склеротичные кокающие палочки  
между ресничками клеток на  
поверхности трахеи

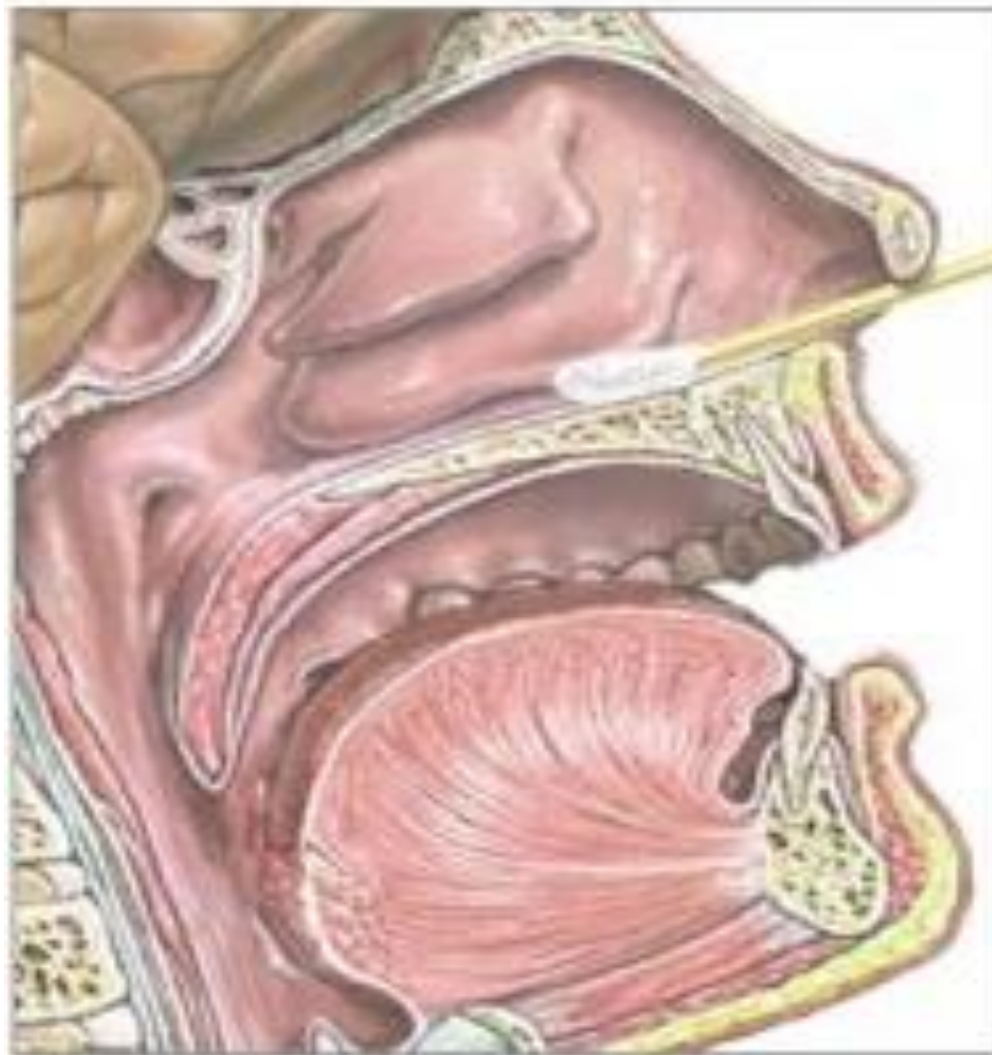




Спазматическ  
главный призна



# Забор материала от больного



A sterile swab is passed gently through the nostril and into the nasopharynx

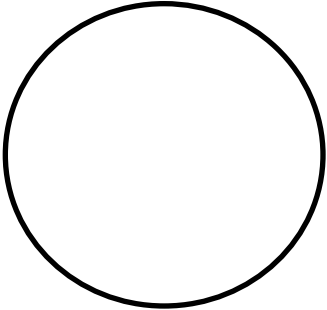
## Среда Казеиново-угольный агар (КУА)

**Борде — Жангу среда** кислотный гидролизат казеина глубокой степени расщепления крахмал растворимый уголь активированный дрожжевой диализат калий фосфорнокислый однозамещенный магний хлористый кальций хлористый медь сернокислая кислота глутаминовая цистеин агар микробиологический

**плотная питательная среда для культивирования гемоглинофильных бактерий, представляющая собой картофельно-глицериновый кровяной агар.**



# Протокол. Лабораторная диагностика коклюша

<b>Исследуемый материал</b>	<b>Что сделать</b>	<b>Результат</b>
Мазок-препарат из культуры <i>B. pertussis</i> , окрашенный по методу Грама	Изучить морфологию (демонстрация), зарисовать.	
Колонии <i>B. pertussis</i> на КУА	Изучить характер роста (демонстрация).	<hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>