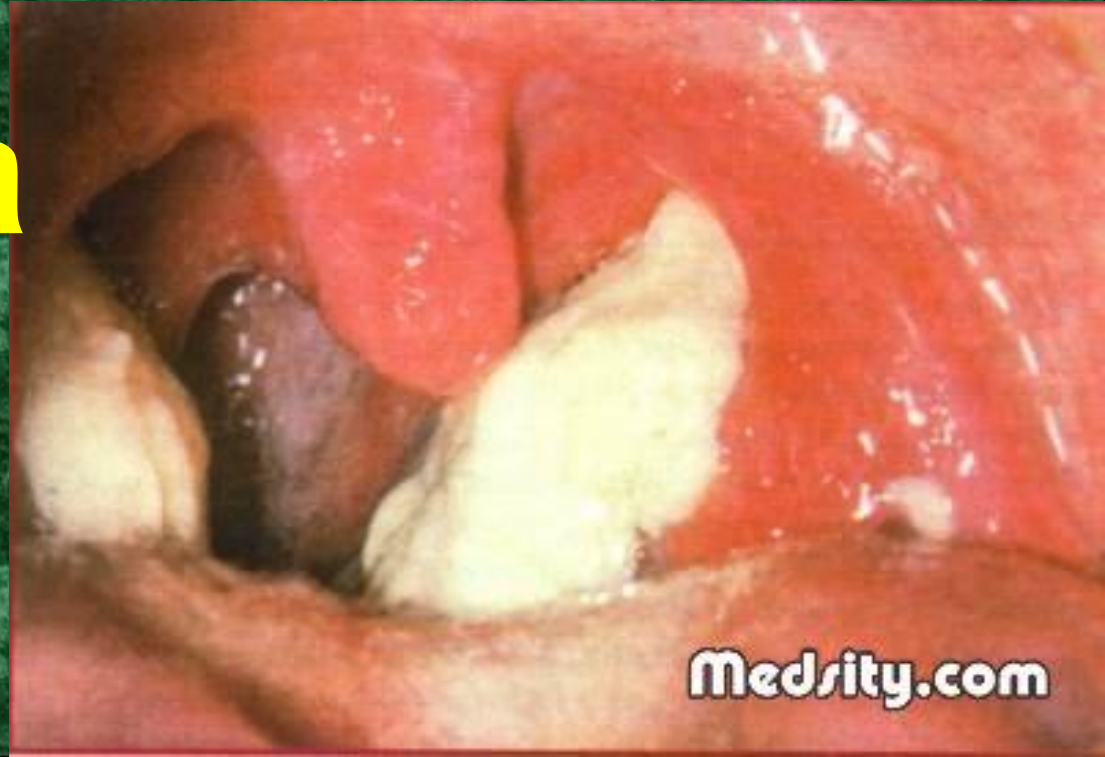


Лабораторная диагностика дифтерии и коклюша



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:

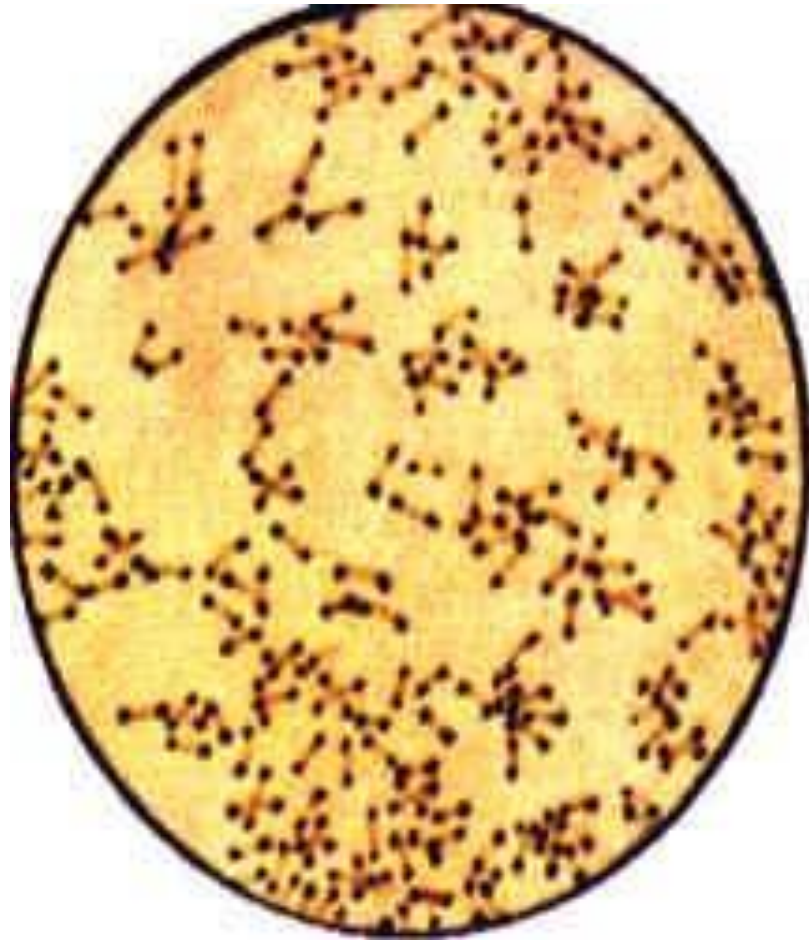
gravis

mitis

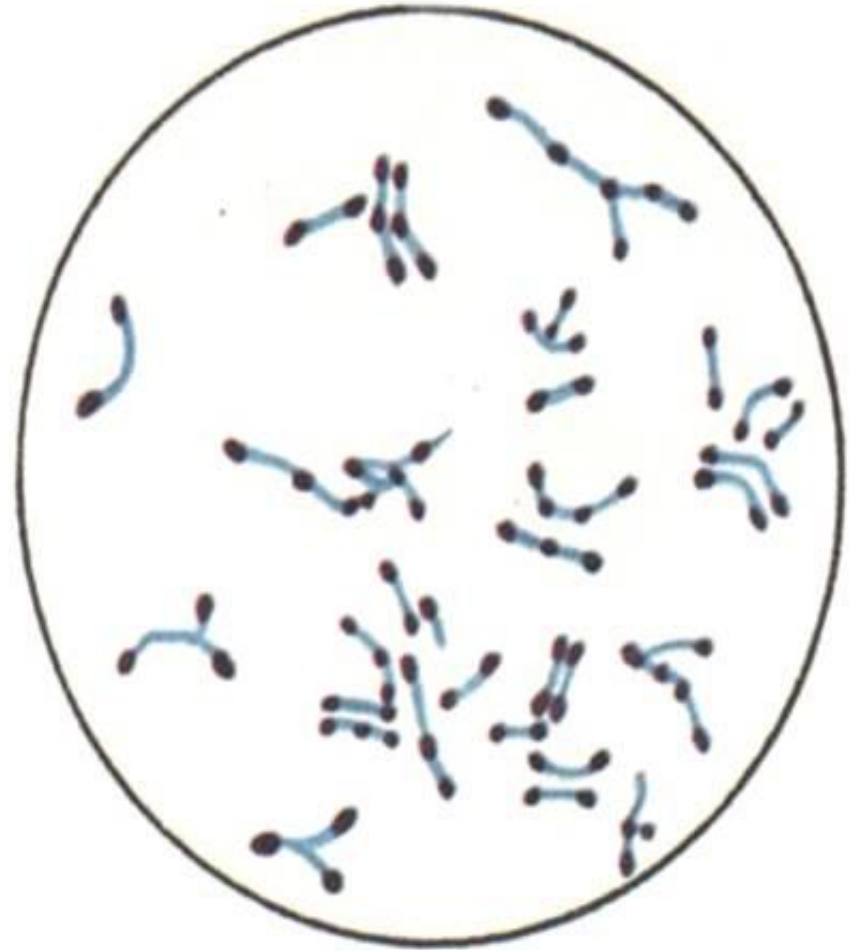
intermedius

МАЗОК ИЗ КУЛЬТУРЫ *S. diphtheriae*

ОКРАСКА ПО НЕЙССЕРУ



ОКРАСКА ПО ЛЕФФЛЕРУ



СРЕДЫ ДЛЯ ПЕРВИЧНОГО ПОСЕВА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

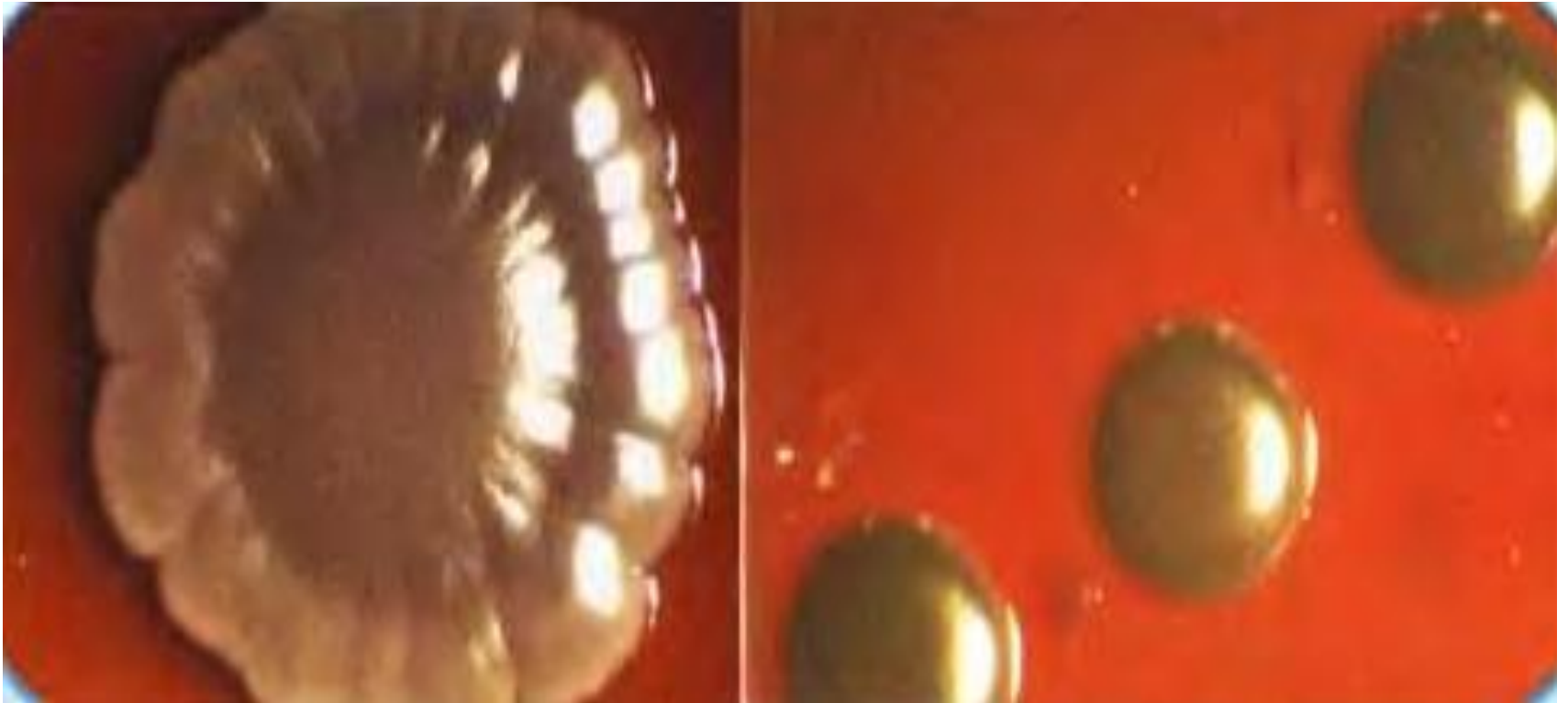
Среда Клауберга II

- 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*

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'-дизэфир-трегалозы)	Нарушает фагоцитоз
Гиалуронидаза	Нарушают проницаемость ткани
Нейраминидаза	

Токсигенная культура

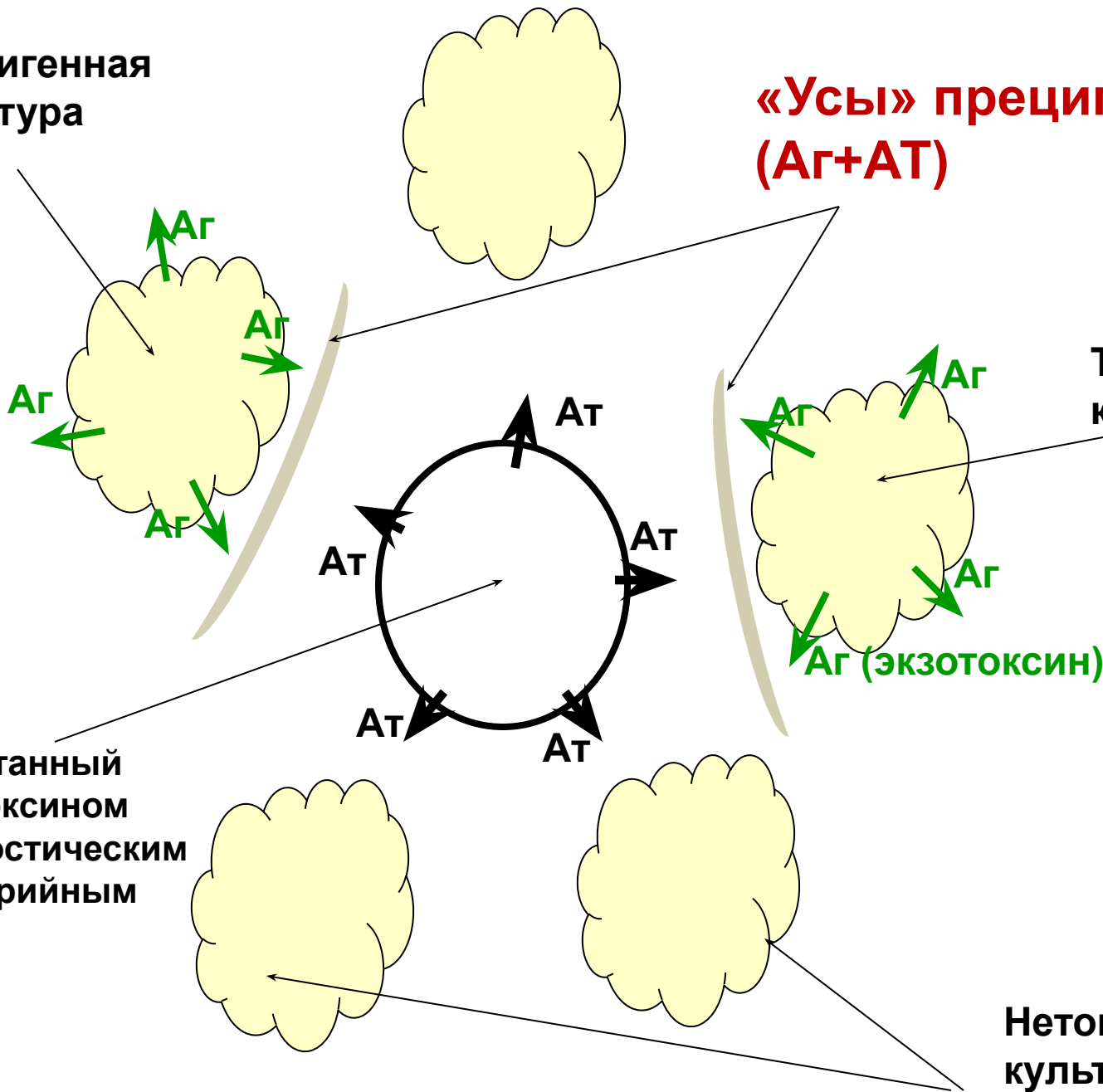
«Усы» преципитации (Ag+AT)

Токсигенная культура

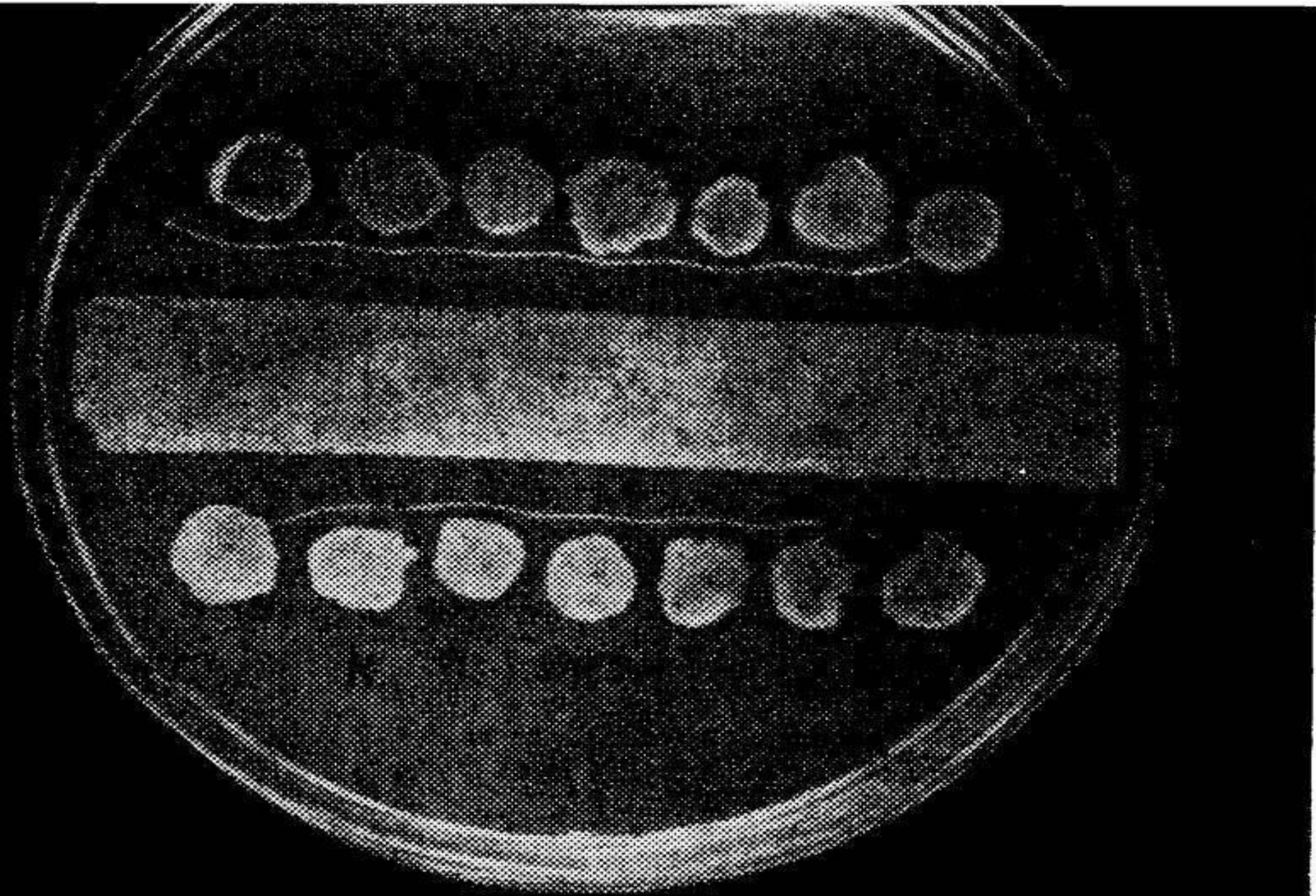
Ag (экзотоксин)

Диск, пропитанный антитоксином диагностическим дифтерийным

Нетоксигенные культуры



Проба на токсигенность: реакция преципитации в геле

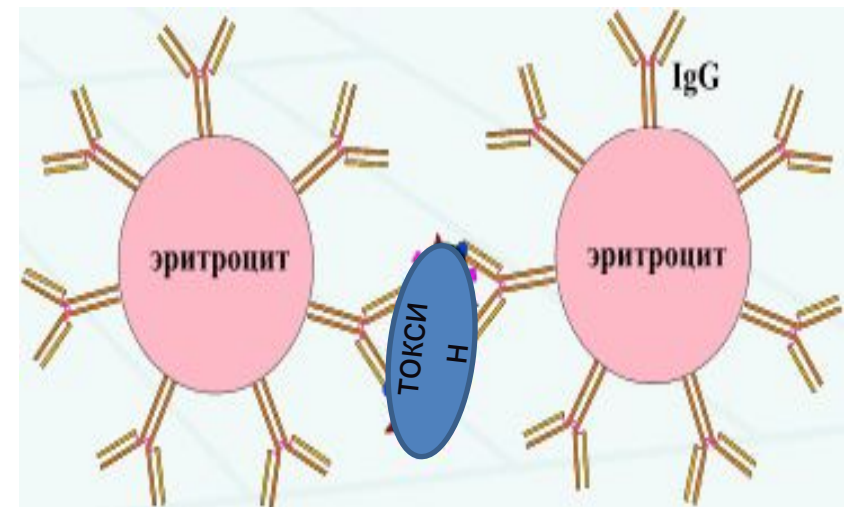


РНГА (РОПГА) для выявления дифтерийного токсина

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 NO_3 в NO_2 определяют культивированием в МПБ 24 часа при 37°C , содержащем 1% раствор KNO_3 . Для определения нитритов в среду добавляют несколько капель реактива Грисса. Этот реактив состоит из сульфаниловой кислоты и α -нафтиламина. При взаимодействии реактива Грисса с нитритами образуется азокраситель, и при положительном результате наблюдают появление красного окрашивания.



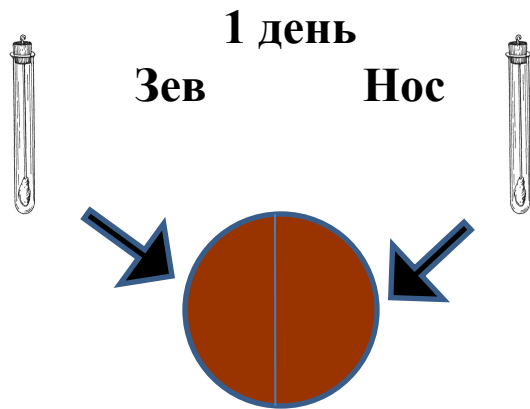
Вид	Разложение					Редукция нитратов
	цистина	глюкозы	сахарозы	крахмала	мочевины	
<i>C. diphtheriae gravis</i>	+	K	-	K	-	+
<i>C. diphtheriae mitis</i>	+	K	-	-	-	+
<i>C. pseudo-diphtheriticum (C. hofmani)</i>	-	-	-	-	+	+

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

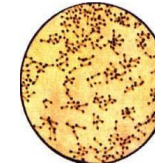
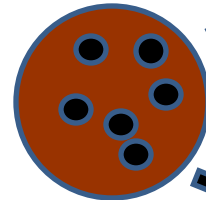
**Исследуемый материал
(отделяемое слизистой
зева, носа и
из места атипичной
локализации)**



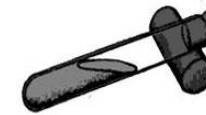
Тампоны должны быть доставлены в лабораторию не позднее **3**-х часов с момента взятия материала.



24 часа
2 день



Постановка проб на:
токсигенность, цистиназу



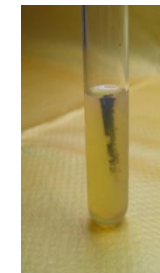
48 часов / 3 день



Посев на:
сахарозу
глюкозу
крахмал
мочевину

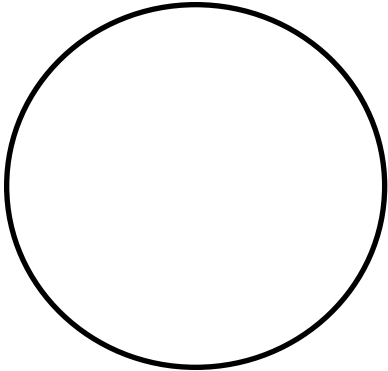
Учет

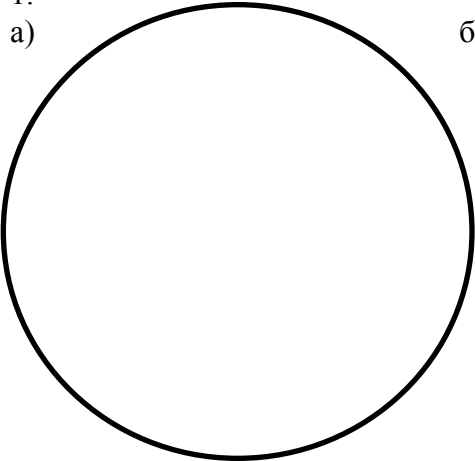
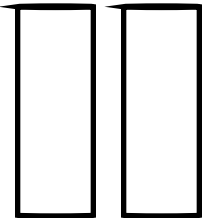
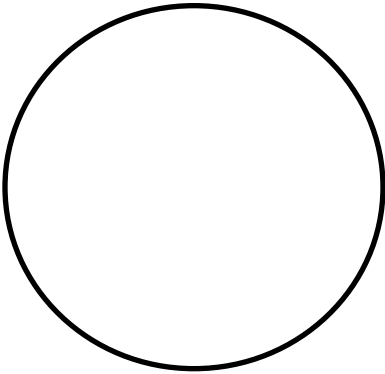
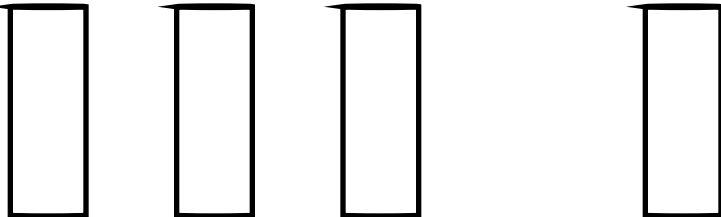
72 часа / 4 день



Учет свойств
Определение биохимического варианта

Протокол. Лабораторная диагностика дифтерии

День исследования	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) Постановка проб на: - токсигенность, - цистиназу 4) Пересев на скошенный сывороточный агар.	1) _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ 2) 

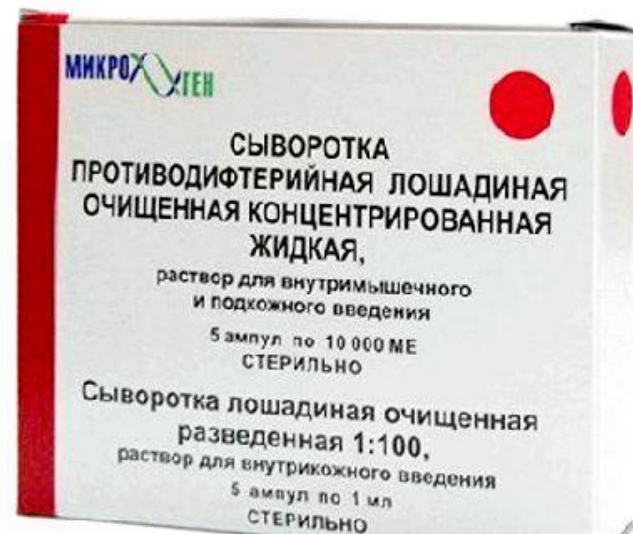
<p>3 день</p>	<p>1. Инкубированные пробы на а) токсигенность и б) цистиназу</p> <p>2) Рост чистой культуры на скошенном сывороточном агаре</p>	<p>1) Учесть результаты проб, зарисовать</p> <p>2) Описание роста.</p> <p>3) Приготовить мазок-препарат, окрасить по Нейссеру, зарисовать</p> <p>4) Посев на среды Гисса с сахарозой, глюкозой, крахмалом, тест с мочевиной.</p>	<p>1. а)  б) </p> <p>«-» «+»</p> <p>2. Рост в виде «шагреневой кожи»</p> <p>3. </p>
<p>4 день</p>	<p>Инкубированные посеы на средах Гисса с сахарозой, глюкозой, крахмалом, тест с мочевиной.</p>	<p>Учесть биохимические свойства</p>	<p></p> <p>Сахароза Глюкоза Крахмал Мочевина</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

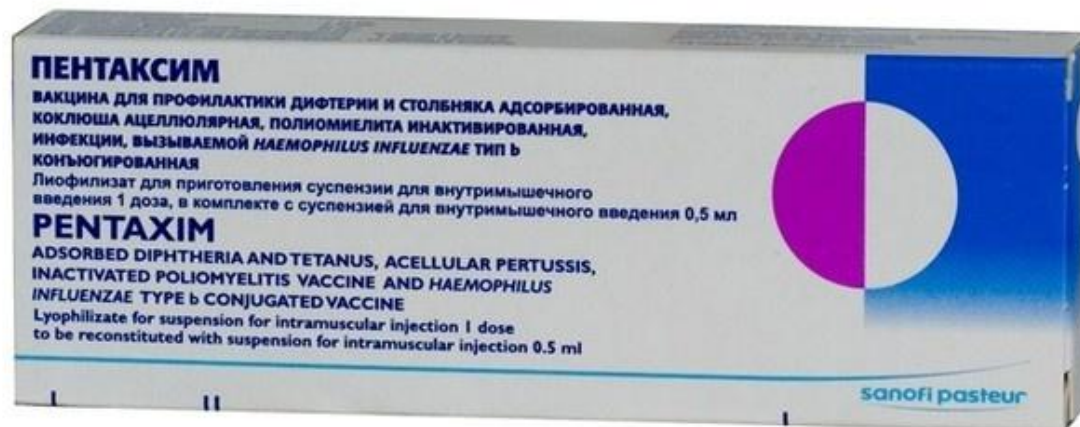
Тетракок - вакцина для комбинированной профилактики дифтерии, столбняка, коклюша и полиомиелита у детей с 2-мес. до 6 лет;

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 Аг 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

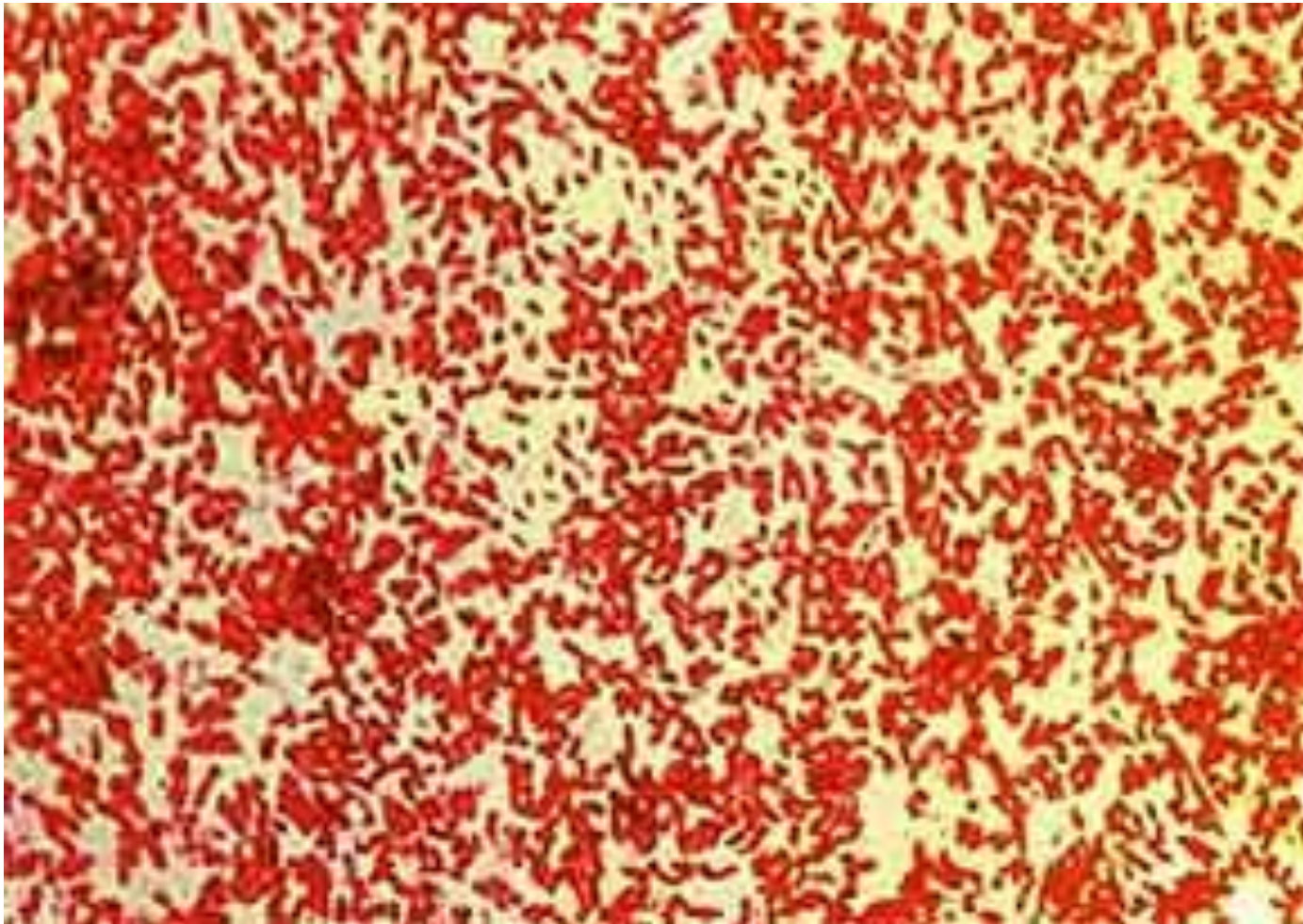
B. parapertussis

B. bronchiseptica

B. avium



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



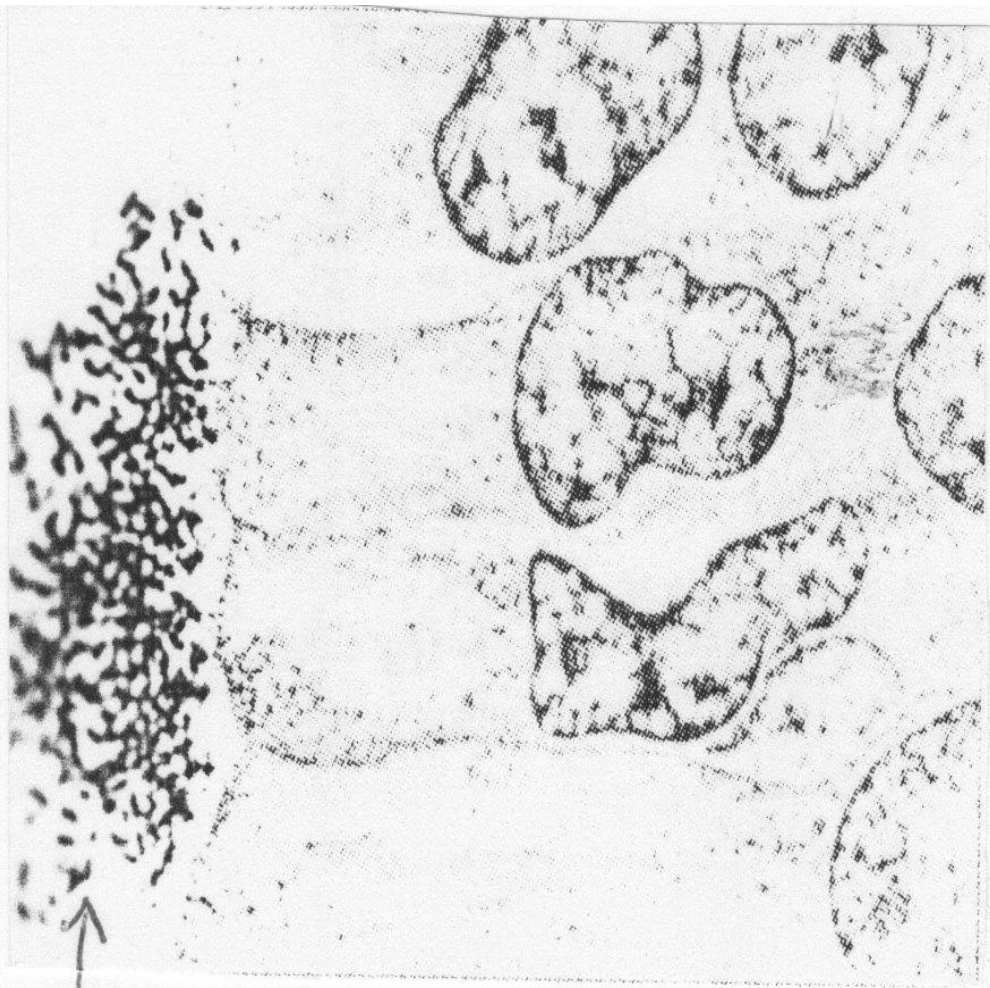
Рост колоний ***B. pertussis*** на кровяном агаре

78

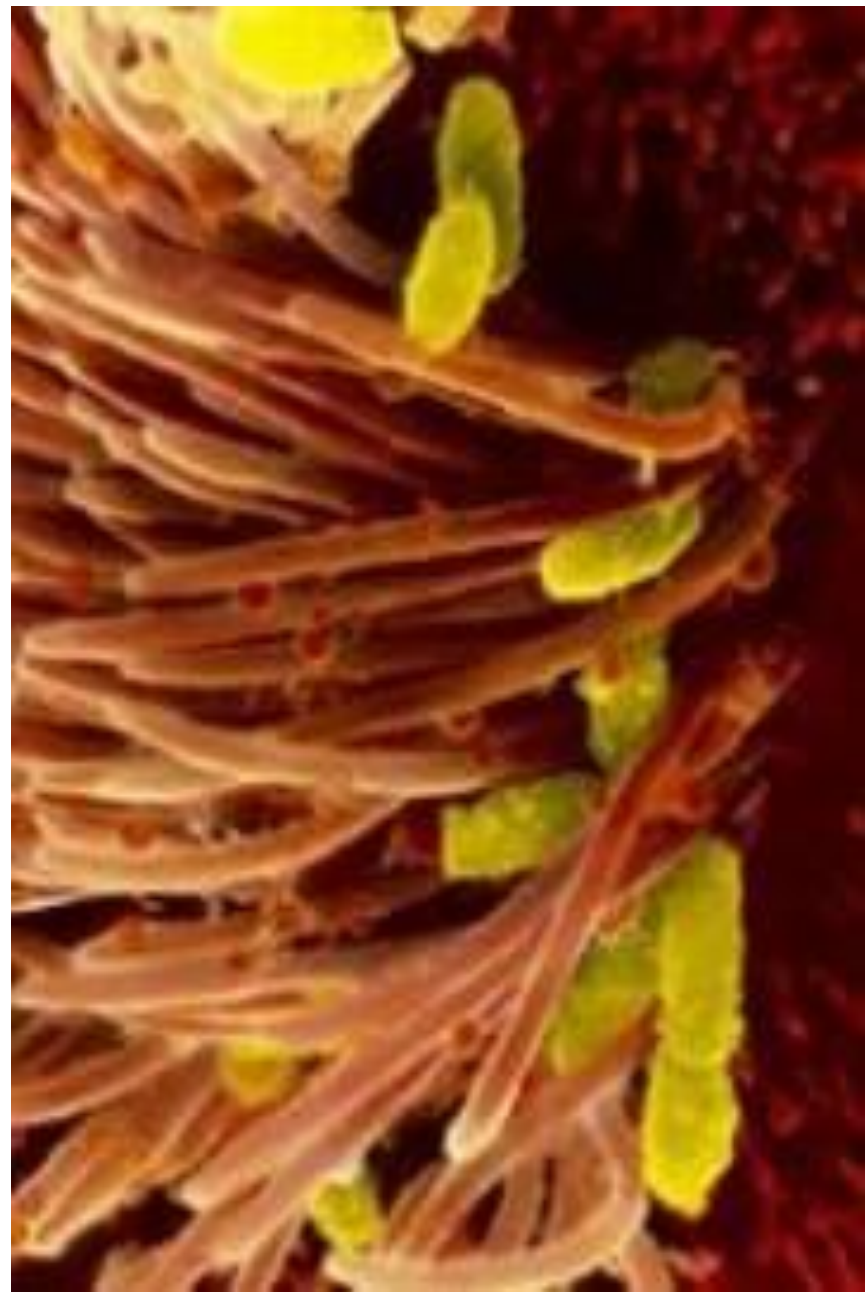


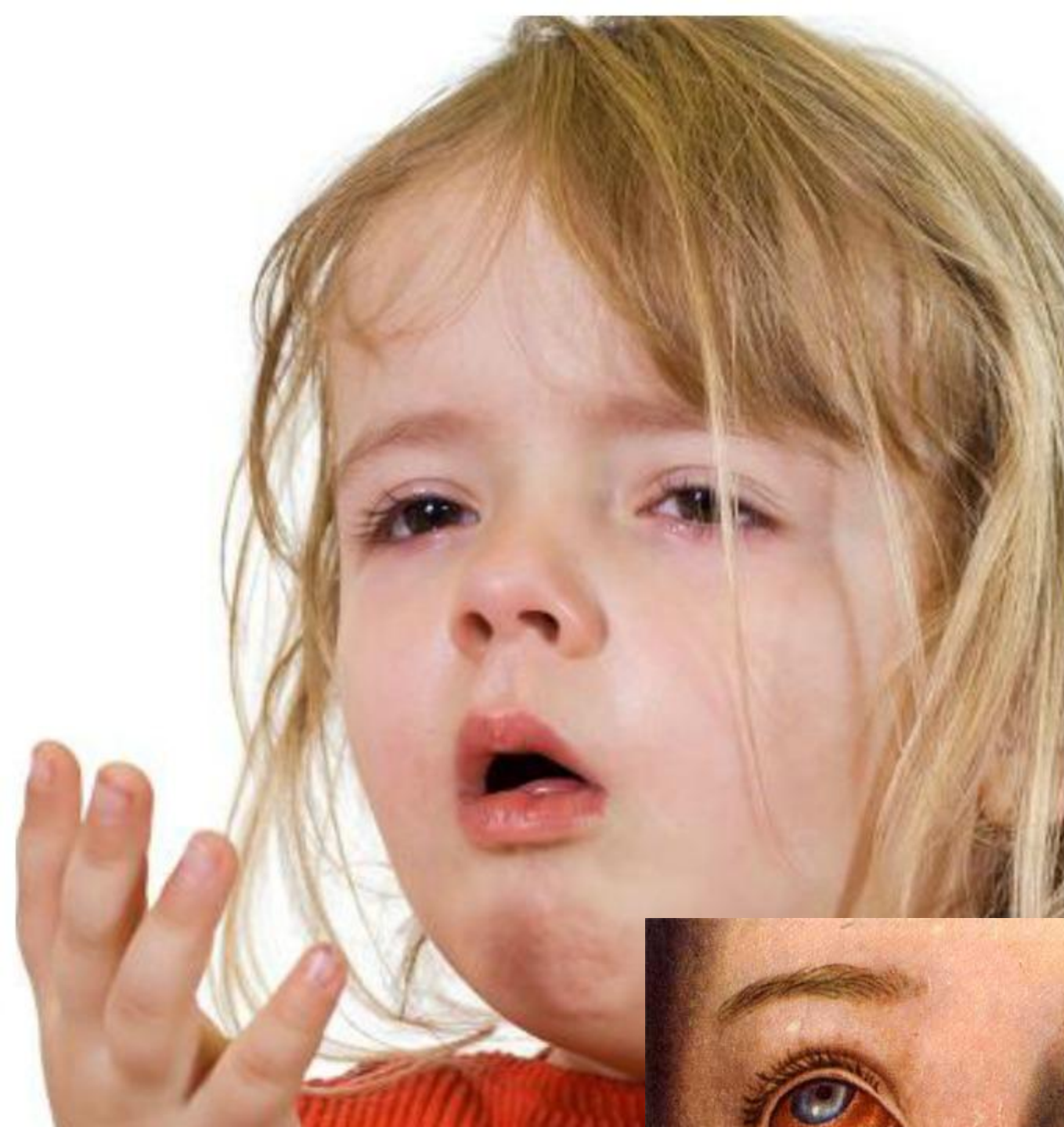
Таблица 1. Факторы вирулентности *B. pertussis*

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 (АСТ)	Действует как противовоспалительный и антифагоцитарный фактор во время инфекции
Трахеальный цитотоксин	Повреждение тканей дыхательных путей
Дермонекротический токсин	
Липополисахарид (LPS)	Эндотоксин

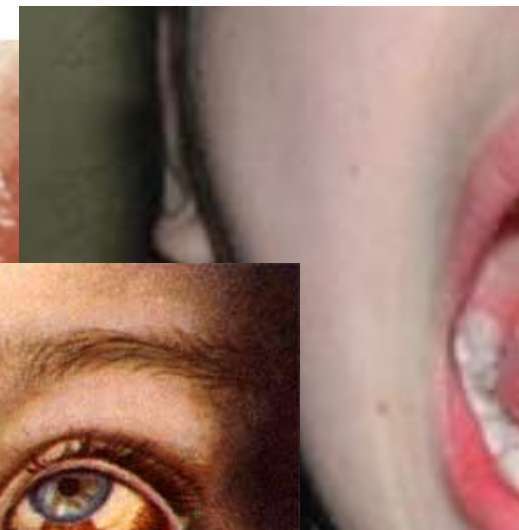


← Склеротичные окрашивающиеся папиллы между ресничками клеток на поверхности трахеи

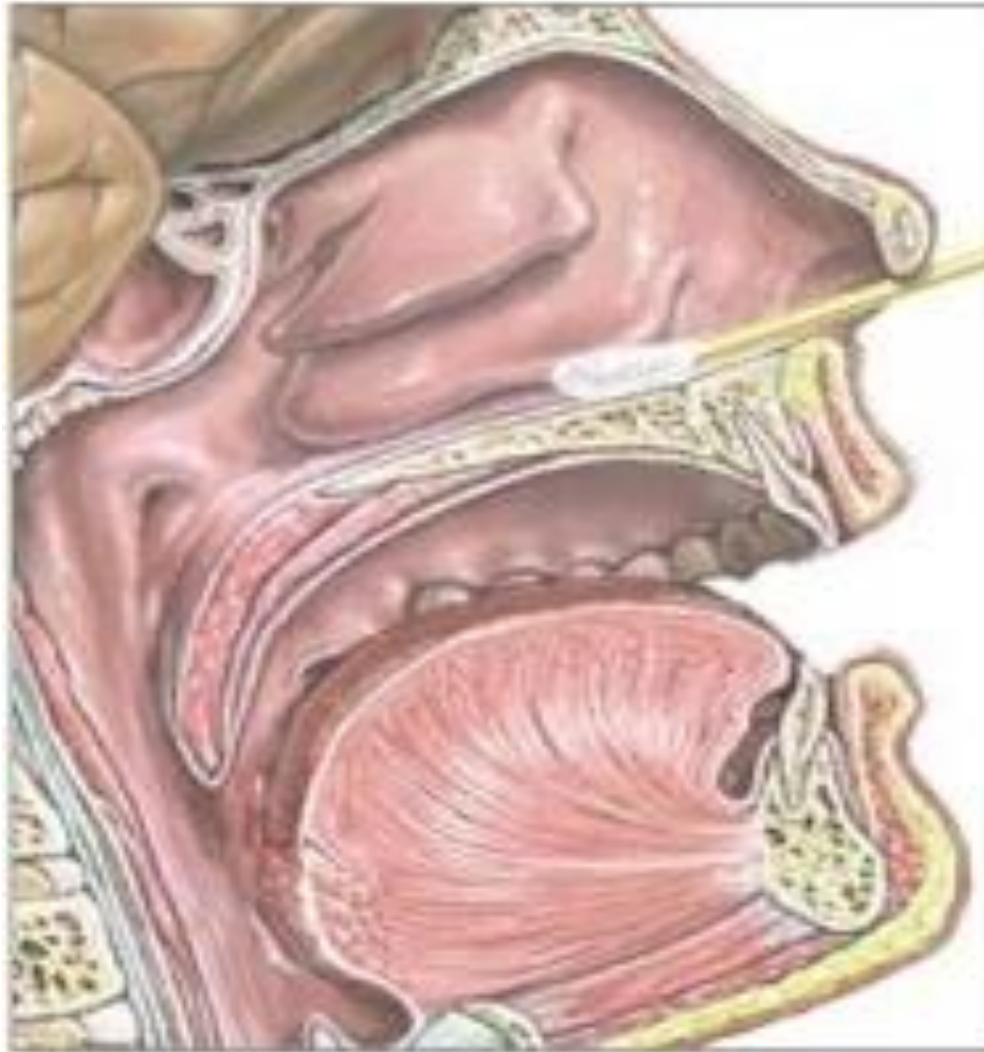




Спазматическ
главный призна



Забор материала от больного



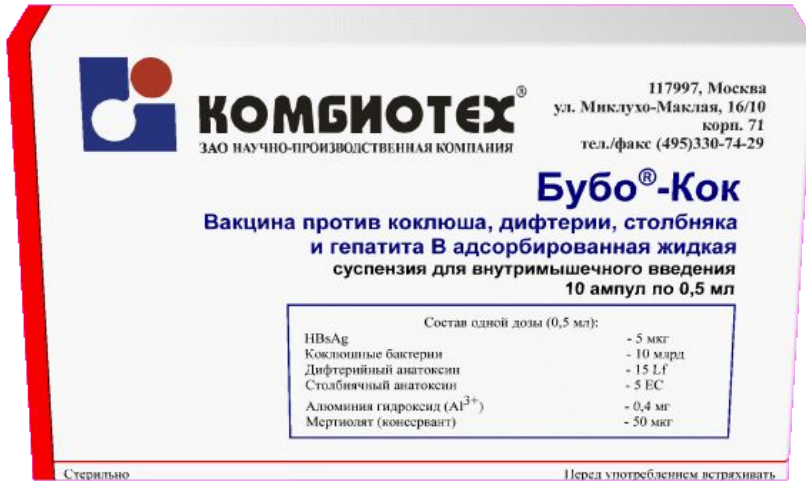
A sterile swab is passed gently through the nostril and into the nasopharynx

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.

Вакцины, содержащие коклюшный компонент



КОМБИОТЕХ®
 ЗАО НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ

117997, Москва
 ул. Миклухо-Маклая, 16/10
 корп. 71
 тел./факс (495)330-74-29

Бубо®-Кок
 Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка
 и гепатита В адсорбированная жидкая
 суспензия для внутримышечного введения
 10 ампул по 0,5 мл

Состав одной дозы (0,5 мл):	
HBsAg	- 5 мкг
Коклюшные бактерии	- 10 млрд
Дифтерийный анатоксин	- 15 ЛГ
Столбнячный анатоксин	- 5 ЕС
Алюминия гидроксид (Al ³⁺)	- 0,4 мг
Мертиолят (консервант)	- 50 мкг

Стерильно

Перед употреблением встряхивать



ОАО "БИОМЕД" им. И. И. МЕНДЕЛЬЕВА
 143422 Московская обл., Красногорский р-он,
 с.Петрово-Дальнее Тел. (095) 418-65-45
 факс (095) 418-60-66

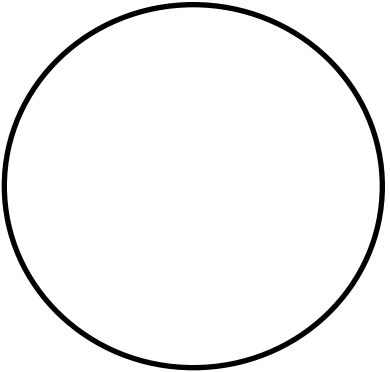
**ВАКЦИНА
 КОКЛЮШНО-ДИФТЕРИЙНО-
 СТОЛБНЯЧНАЯ АДСОРБИРОВАННАЯ
 ЖИДКАЯ (АКДС – вакцина)**

10 ампул по 1 мл
 Разовая доза 0,5 мл

ВНУТРИМЫШЕЧНО
 Перед употреблением встряхивать!



Протокол. Лабораторная диагностика коклюша

Исследуемый материал	Что необходимо сделать	Результат
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/>