

# Лабораторная диагностика холеры.

A microscopic image of a bacterium, likely Vibrio cholerae, showing a long, thin, wavy flagellum extending from one end of the cell. The cell body is oval-shaped and contains internal structures, possibly including a nucleus and other organelles. The background is a light, grainy texture.

## Дисбактериоз.

# ВОЗБУДИТЕЛИ ХОЛЕРЫ

- **СЕМЕЙСТВО**      **Vibrionaceae**
- **РОД**              **Vibrio**
- **ВИД**              **V. cholerae**
- **БИОВАРИ**        **V. cholerae asiaticae**  
**V. cholerae eltor**





# Классификация вибрионов (по Б.Хайбергу)

<b>Хемогруппа</b>	<b>Манноза</b>	<b>Сахароза</b>	<b>Арабиноза</b>
<b>1</b>	<b>К</b>	<b>К</b>	<b>-</b>
<b>2</b>	<b>-</b>	<b>К</b>	<b>-</b>
<b>3</b>	<b>К</b>	<b>К</b>	<b>К</b>
<b>4</b>	<b>-</b>	<b>К</b>	<b>К</b>
<b>5</b>	<b>К</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>6</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>7</b>	<b>К</b>	<b>-</b>	<b>К</b>
<b>8</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>К</b>

# 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)

# Биологические свойства холерных вибрионов

№	Признак	<i>V.asiaticae</i>	<i>V.eltor</i>	<i>V.cholerae</i> 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	Нитрозоиндоловая			

# ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

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

# 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



# Протокол. Лабораторная диагностика холеры

Дата	Исследуемый материал	Что сделать	Результат
<b>+6 часов</b>	<b>Рост на 1% пептонной воде</b>	<ul style="list-style-type: none"><li><b>• Характеристика роста</b></li><li><b>• Нативная бактериоскопия</b></li><li><b>• Бактериоскопия с окраской по Граму</b></li><li><b>• Пересев на чашку со щелочным питательным агаром</b></li></ul>	<ol style="list-style-type: none"><li><b>1) Описание</b></li><li><b>2) Оценка подвижности</b></li><li><b>3) Рисунок</b></li><li><b>4) Заключение</b></li></ol>

**+6 =  
12 час**

**Рост на чашке  
со щелочным  
питательным  
агаром**

- **Характеристика  
роста**
- **Нативная  
бактериоскопия**
- **Бактериоскопия с  
окраской по Граму**
- **Ориентировочная РА  
с О-І сывороткой**
- **Пересев на среды  
Гисса с сахарозой,  
маннозой, арабинозой**

**1)Описание**

**2)Оценка  
подвижности**

**3)Рисунок**

**4)Заключение**

# Развернутая реакция агглютинации с О-1 холерной сывороткой

<b>Разведения сыворотки</b>	<b>1:100</b>	<b>1:200</b>	<b>1:400</b>	<b>1:800</b>	<b>Контроль сыворотки</b>	<b>Контроль антигена</b>
<b>Холерная О-1 сыворотка, титр 1:800</b>	<b>1мл</b>	<b>1мл</b>	<b>1мл</b>	<b>1мл</b>	<b>1мл</b>	<b>Физ. р-р 1 мл</b>
<b>Взвесь культуры</b>	<b>0,1 мл</b>	<b>0,1 мл</b>	<b>0,1 мл</b>	<b>0,1 мл</b>	<b>-</b>	<b>0,1 мл</b>
<b>Учет</b>						

**6) Развернутая РА с  
О-1 сывороткой**

**7) Развернутая РА с  
сыворотками Инаба и Огава**

**8) Посев для определения  
биовара:**

**-на среду с полимиксином**

**-с бактериофагом eltor II и  
классическим холерным С**

**9) Пересев на скошенный  
щелочной агар**

**6) Учет**

**7) Учет**

# Развернутая реакция агглютинации с типовыми сыворотками

Разведения сыворотки	1:50	1:100	1:500	1:1000	1:2000	Контроль сыворотки	Контроль антигена
<b>Холерная сыворотка Огава, титр 1:2000</b>	1мл	1мл	1мл	1мл	1мл	1мл	Физ.р-р 1мл
<b>Взвесь культуры</b>	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	-	2 капли
<b>Учет</b>							

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

**+12=  
24 часа**

**Рост  
культуры  
на средах  
«пестрого  
ряда»**

- Характеристика биохимических свойств**
- Оценка чувствительности к бактериофагам и полимиксину В**
- Заключение по работе**

**• Заключение**

**2) Рисунок**

**3)  
Заключение**

## 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:

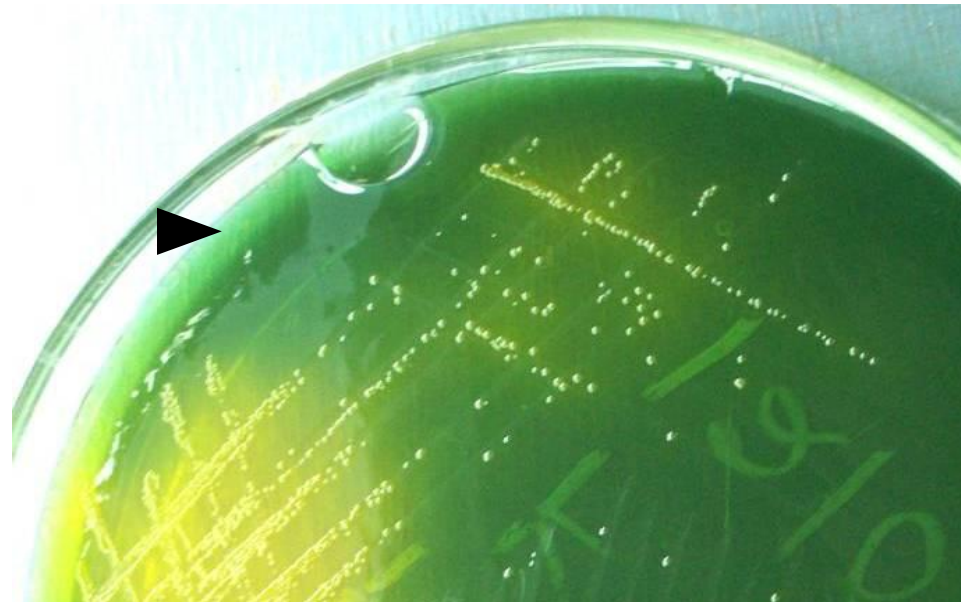
-СЭДХ

-TCBS 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





# МАТЕРИАЛ

- ЩА,
- Элективная среда

1-я пептонная вода

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

- ЩА,
- Элективная среда

2-я пептонная вода

ЩА

- Отбор подозрительных колоний,
- РА

- Полиуглеводные среды
- Скошенный ЩА

РА

В лабораторию  
ООИ  
В эпидситуации –  
на месте  
по сокращенной  
схеме

# Сокращенная схема идентификации чистой культуры

Бактериоскопия: по Граму, подвижность  
Оксидазный тест  
Окисление/ферментация глюкозы в среде Хью-Лейфсона  
Ферментация лизина, аргинина, орнитина,  
маннита, инозита, лактозы, глюкозы, сахарозы  
МФА с O1, O139  
РИВ  
Рост на полиуглеводных средах  
РА с O1, PO, O139  
Чувствительность к бактериофагам  
Ориентировочная оценка эпидзначимости:  
-Гемолитическая активность по Грейгу  
-Фаги ctx+ , ctx-

## Полная схема идентификации в лаборатории ООИ

Определение биовара  
Определение антибиотикограммы  
Оценка эпидзначимости:  
-ПЦР гены ctx AB и tcp A  
-токсигенность (биологическим методом)

## Пероральные противохолерные вакцины:

**Вакцина WC/rBS — состоит из убитых целых клеток *V. Cholerae* O1 с очищенной рекомбинантной В-субъединицей холерного анатоксина (WC/rBS) —** предоставляет 85-90%-процентную защиту во всех возрастных группах в течение шести месяцев после приема двух доз с недельным перерывом.

**Модифицированная вакцина WC/rBS — не содержит рекомбинантной В-субъединицы.** Необходимо принимать две дозы этой вакцины с недельным перерывом. Вакцина лицензирована только во Вьетнаме.

**Вакцина CVD 103-HgR — состоит из аттенуированных живых оральных генетически модифицированных штаммов *V. Cholerae* O1 (CVD 103-HgR).** Однократная доза вакцины предоставляет защиту от *V. Cholerae* на высоком уровне (95 %). Через три месяца после приема вакцины защита от *V. Cholerae* El Tor на уровне 65%.

Содержание некоторых бактерий в фекалиях здоровых взрослых лиц (в колониеобразующих единицах на 1 г фекалий)

<b>Бифидобактерии</b>	$10^8-10^9$
Лактобактерии	$10^6-10^7$
Бактероиды	$10^7-10^9$
Эшерихии, лактозопозитивные	$10^5-10^7$
Эшерихии, лактозоотрицательные	$10^5-10^7$
Молочнокислый стрептококк	$10^5-10^7$

# Микробиологические критерии дисбактериоза

кишечника

Стадии дисбактериоза	Состав микрофлоры
1 степень	<p>1. Снижение общего количества анаэробной микрофлоры (бактероидов, бифидо- и лактобактерий) до <math>10^6</math>-<math>10^7</math> м.кл. в 1г. фекалий.</p> <p>2. Снижение общего количества кишечной палочки, уменьшение количества кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью (до <math>10^5</math> м.кл.)</p>
2 степень	<p>1. Снижение общего количества анаэробной флоры до <math>10^5</math> м.кл.</p> <p>2. Увеличение количества кишечной палочки. Уменьшение количества эшерихий с нормальной ферментативной активностью, увеличение лактозонегативных форм. Появление гемолитических форм.</p>

<p>3 степен ь</p>	<p>Снижение общего количества анаэробной микрофлоры до <math>10^3</math>-<math>10^4</math> м.кл./г.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Отсутствие эшерихий с нормальной ферментативной активностью. Повышение числа лактозонегативных и гемолитических форм.</li></ul> <p>Повышение уровня условно-патогенных энтеробактерий (протеи, клебсиеллы, цитробактер и др.), псевдомонад до <math>10^8</math> м.кл./г.</p> <p>Увеличение количества золотистых стафилококков, грибов рода <i>Candida</i> – до <math>10^5</math>-<math>10^8</math> м. кл./г.</p>
<p>4 степен ь</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Отсутствие основных представителей анаэробной флоры.</li><li>• Отсутствие эшерихий с нормальной ферментативной активностью. Подавляющее превосходство условно-патогенных энтеробактерий, псевдомонад, грибов рода <i>Candida</i>, золотистых</li></ul>