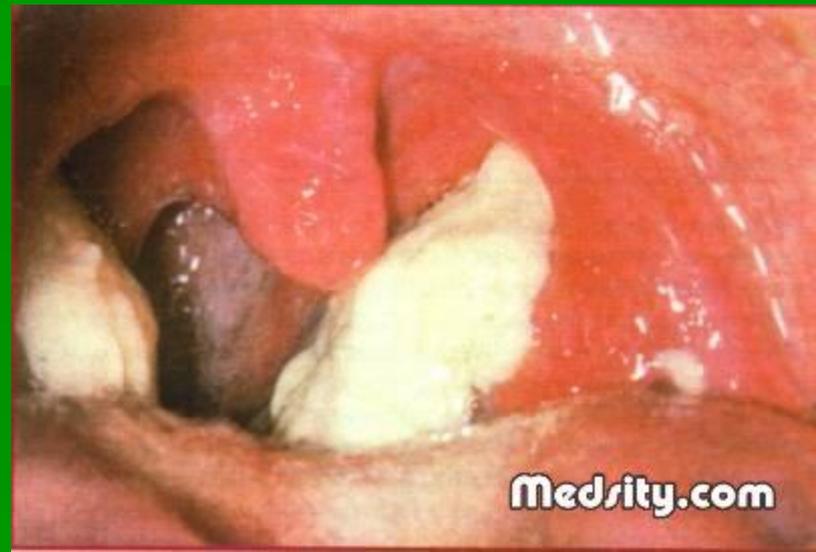


Лабораторная диагностика дифтерии



КЛАССИФИКАЦИЯ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

ПОРЯДОК Actinomycetales

СЕМЕЙСТВО Corynebacteriaceae

РОД Corynebacterium

ВИДЫ

ВОЗБУДИТЕЛЬ ДИФТЕРИИ

C. diphtheriae

ПОТЕНЦИАЛЬНО ТОКСИГЕННЫЕ

C. ulcerans

C. pseudotuberculosis

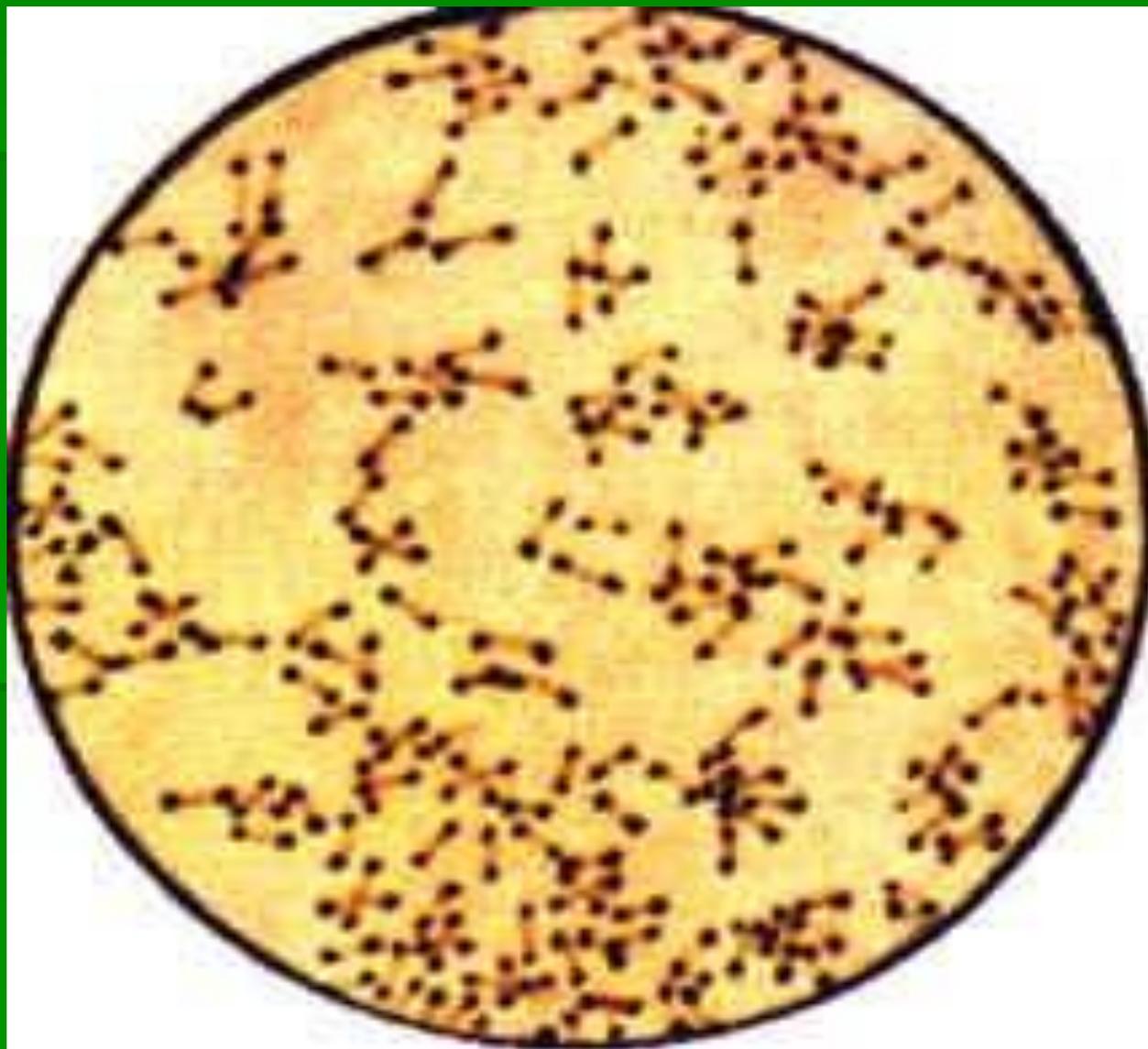
БИОВАРИ:

gravis

mitis

intermedius

МАЗОК ИЗ КУЛЬТУРЫ *C. diphtheriae* , ОКРАСКА ПО НЕЙССЕРУ



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*

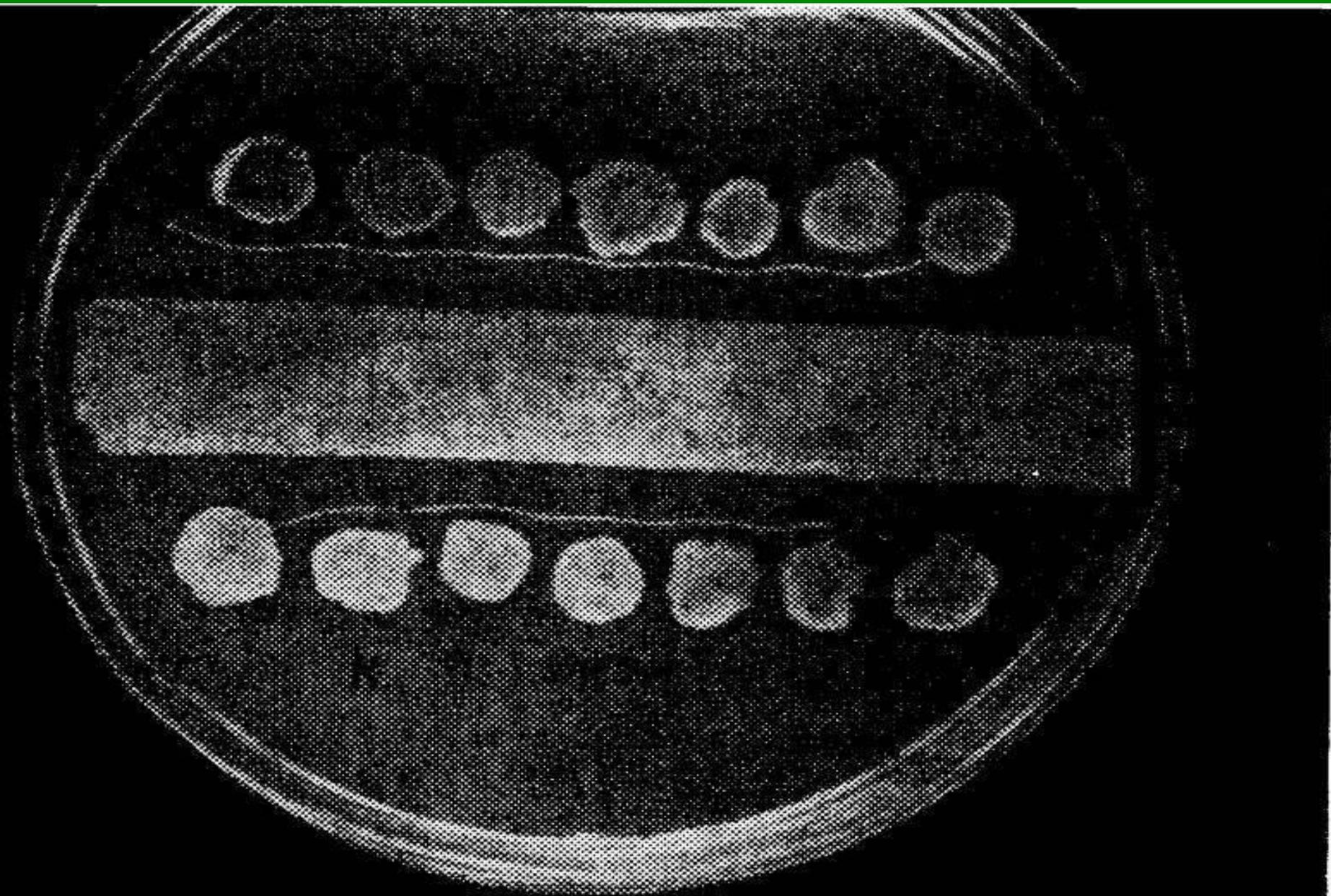


Биовар *mitis*

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

Проба на токсигенность: реакция преципитации в геле

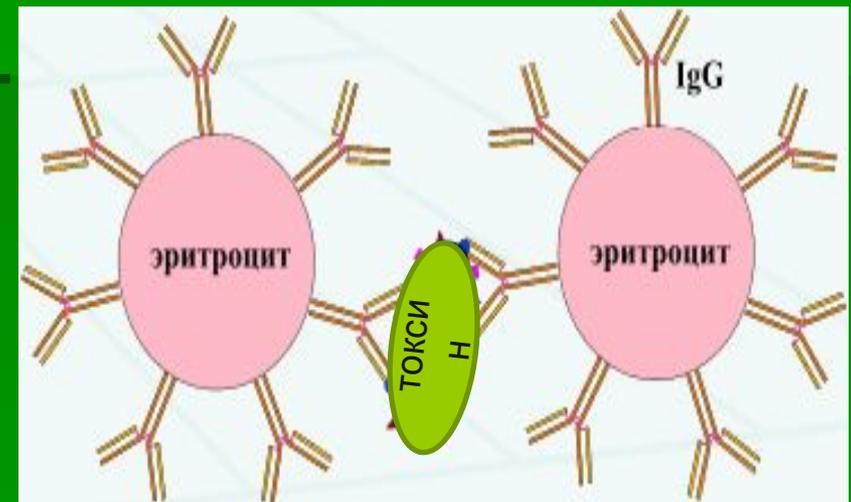


РНГА (РОПГА) для выявления дифтерийного токсина

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 САХАРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Проводят на средах Гисса с углеводами - сахарозой, глюкозой, растворимым крахмалом.

Учет через **24 (48 часов)** инкубации при **37° С.**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТРЕДУКТАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Проводят на нитратном бульоне,
инкубируют **24** часа при **37° С.**

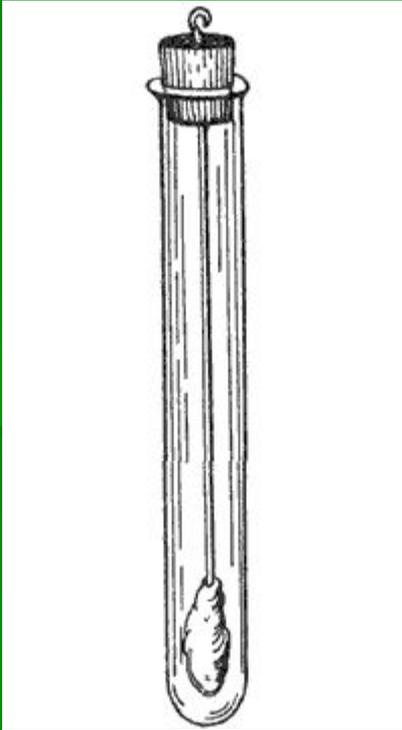
Затем добавляют **2 - 3** капли реактива на нитриты (Грисса или Касаткина

При положительной реакции среда окрашивается в красный цвет.

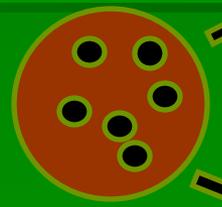
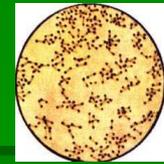
Вид	Токси- генность	Разложение					Редукция нитратов
		цистина	глюкозы	сахарозы	крахмала	мочевины	
C. diphtheriae <i>gravis</i>	+/-	+	K	-	K	-	+
C. diphtheriae <i>mitis</i>	+/-	+	K	-	-	-	+
C. ulcerans	+/-	+	K	-	K	+	-
C. pseudo- tuberculosis (C. ovis)	+/-	+	K	-	-	+	- (+)
C. pseudo- diphtheriticum (C. hofmani)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

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

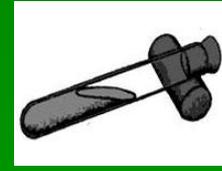
Исследуемый материал
(отделяемое слизистой
зева, носа и
из места атипичной
локализации



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



Пробы на:
токсигенность, цистиназу



48 часов / 3 день

Посев на:
сахарозу
глюкозу
крахмал
мочевину



96 часов
5 день

72 часа
4 день

Учет свойств
Определение биохимического варианта

Повторные параллельные исследования колоний, пробы на токсигенность, цистиназу

72 часа
4 день

исследования биохимических свойств

1 день

Посев тампонами от одного пациента - на одну чашку с КТА, 1/2 поверхности - из ротоглотки, 1/2 - из носа
(из мест атипичной локализации на дополнительные чашки)

2 день

Рост колоний на чашках с КТА (24 часа)

Изучение колоний, бактериоскопия, пробы на:

- токсигенность,
- цистиназу
- посев на скошенный сывороточный агар.

При множественном росте для выдачи предварительного ответа смешивают до 5 однотипных колоний и ставят дополнительные пробы на:

- цистиназу,
- уреазу (по Заксе)
- посев в жидкую среду и выявление дифтерийного токсина в РНГА.

Чашки оставляют до 48 часов.

3 день

1) Учет результатов проб на токсигенность и цистиназу

При положительных результатах выдают документированный ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии.

2) Изучение роста чистой культуры на скошенном сывороточном агаре

Посев на среды с сахарозой, глюкозой, крахмалом, мочевиной.

3) Учет результатов проб при первичном множественном росте

При положительных РНГА, пробе Пизу, отрицательной уреазной пробе, выдают предварительный ответ о выделении возбудителя дифтерии.

4) Повторно для чашек через 48 часов: изучение колоний, бактериоскопия

постановка проб на токсигенность, цистиназу и отсев колоний на скошенный сывороточный агар

5) При отсутствии роста дифтерийных бактерий - выдача отрицательного бактериологического ответа.

4 день

1. **Повторный учет свойств культуры на токсигенность и цистиназу (от 48 часовых колоний), выдача документированного ответа о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии.**
2. **Характеристика роста чистой культуры (от 48 часовых колоний)**
Посев на среды с сахарозой, глюкозой крахмалом, мочевиной.
3. **Учет биохимических свойств (от культуры 24 часовых колоний)**
4. **Выдача бактериологического ответа о выделении нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта и дополнительного ответа о биохимических свойствах токсигенных коринебактерий дифтерии, выделенных ранее.**

5 день

- Учет биохимических свойств (от культуры 48 часовых колоний)**
Выдача бактериологического ответа о выделении (через 48 часов инкубации первичного посева) токсигенных или нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта.

Протокол. Лабораторная диагностика дифтерии

исследования День	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)	Изучение колоний, бактериоскопия, пробы на: - токсигенность, - цистиназу - посев на скошенный сывороточный агар.	Описание рисунок

3 день	<p>1) Пробы на токсигенность и цистиназу</p> <p>2) Рост чистой культуры на скошенном сывороточном агаре</p>	<p>1) Учет результатов проб</p> <p>Выдача ответа о выделении токсигенных (нетоксигенных) коринебактерий дифтерии</p>	<p>1) Заключение, рисунки</p> <p>2) Описание</p>
		<p>2) Описание роста. Посев на среды с сахарозой, глюкозой, крахмалом, мочевиной.</p>	

4

день

**Биохимические свойства
(от культуры
24 часовых
колоний)**

Учет биохимических свойств

**3) Описание,
рисунок,
заключение**

**Выдача бактериологического
ответа о выделении
нетоксигенных
коринебактерий дифтерии с
указанием биохимического
варианта**

**и дополнительного ответа о
биохимических свойствах
токсигенных
коринебактерий дифтерии,
выделенных ранее.**

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
- Тетракок (коклюш, дифтерия, столбняк, полиомиелит)
- Д.Т. Вакс (дифтерия, столбняк)
- БУБО-Кок (дифтерия, столбняк, коклюш, гепатит В)