Занятие 3

Тема: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ДИФТЕРИИ, КОЛЮША И ПАРАКОКЛЮША

Цель: Изучить микробиологическую характеристику возбудителя дифтерии, коклюша и паракоклюша.

Вопросы, разбираемые на занятии:

1. Микробиологическая характеристика возбудителей дифтерии, коклюша и паракоклюша 2 Методы лабораторной диагностики дифтерии, коклюша и паракоклюша

семейство:Corynebacteriaceae

род:Corynebacterium

вид:C.diphtheria

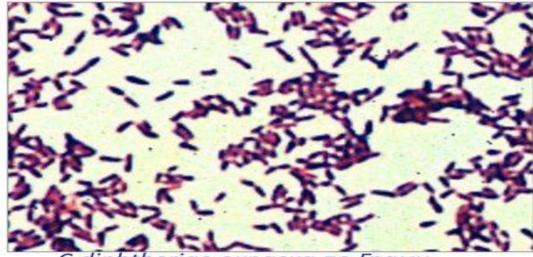
var. gravis

var. mitis

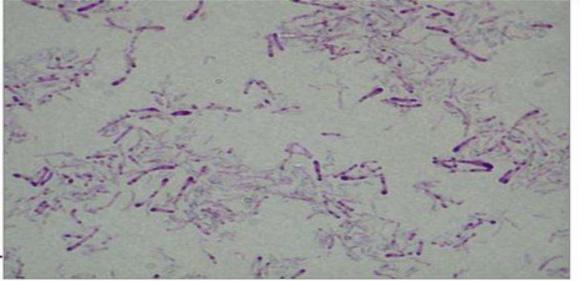
var. intermedius

Морфология

- -Грамположительные палочки с утолщениями на концах,
- располагаются в виде V
- неподвижны
- многослойная клеточная стенка содержит миколовую кислоту, корд-фактор
- при окраске по Леффлеру и Нейссеру выявляются включения волютина на полюсах клетки



C.diphtheriae окраска по Граму



C.diphtheriae окраска по Леффлеру



C.diphtheriae окраска по Нейссеру

Источником инфекции является человек — больной, выздоравливающий или здоровый бактерионоситель. Заражение происходит воздушно-капельным, воздушно-пылевым путем, через различные предметы, бывшие в употреблении у больных или здоровых бактерионосителей: книги, игрушки, посуда. В случае инфицирования продуктов питания возможен алиментарный путь инфицирования.

Классификация дифтерии

- Дифтерия ротоглотки: 1. локализованная (пленчатая, островчатая, катаральная).
- 2.Распространенная
- 3.Токсическая (Субтоксическая, токсическая, Гипертоксическая, геморрагическая, гангренозная)
- Дифтерия гортани: 1. Локализованный круп;
 2. Распространенный круп
- Дифтерия носа: 1.Катарально-язвенная форма,
 2.Пленчатая форма
- Дифтерия редких локализаций (глаз, уха, кожи, половых органов, ран)

Основной фактор вирулентности возбудителя дифтерии – токсин (гистотоксин). Ферменты вирулентности - гиалуронидаза, нейраминидаза

Механизм действия дифтерийного экзотоксина Дифтерийный экзотоксин является полипептидом, состоящим из А и В субъединиц. В-субъединица прикрепляется к ганглиозидным рецепторам на клеткемишени. А-субъединица проникает внутрь клетки-мишени и, являясь ферментом АДФ-рибозил-трансферазой, вызывает АДФ-рибозилирование белкового фактора элонгации EF-2, необходимого для построения полипентидных цепей на рибосомах, что приводит к подавлению синтеза белка на стадии элонгации и гибели клеток в результате некроза.

Клинические формы дифтерийной инфекции

Дифтерия ротоглотки:

- локализованные формы: катаральная, островковая, пленчатая
- -токсические формы: субтоксическая, токсическая I-III степеней, гипертоксическая

Дифтерия дыхательных путей:

- дифтерия гортани (локализованный круп)
- -дифтерия гортани, трахеи (распространенный круп)
- -дифтерия гортани, трахеи, бронхов (нисходящий круп)

Дифтерия носа:

- -катарально-язвенная
- -пленчатая

Дифтерия редких локализаций:

- дифтерия слизистой оболочки рта
- дифтерия пищевода
- дифтерия половых органов
- дифтерия кожи (раны)

Комбинированные формы дифтерии. Дифтерийное бактерионосительство.

Клинические проявления дифтерии

- Стертое начало (трудно определить момент начала заболевания)
- Субфебрильная температура
- Бледность кожных покровов
- Выраженная слабость
- Отек мягких тканей («бычья шея»)
- Боль в горле, затруднение глотания
- Увеличение небных миндалин
- Гиперемия и отек слизистой глотки
- Пленчатый налет (серо-белый), покрывающий небные миндалины, иногда распространяющийся на небные дужки, мягкое небо, боковые стенки глотки, гортань
- Увеличение шейных лимфоузлов

Кроме зева, дифтерия может поражать слизистые носа, глаз, раневые поверхности. Токсигенные Corynebacterium diphtheria выделяют токсин, который вызывает отек и некроз слизистых, поражает миокард, периферические нервы (особенно часто языкоглоточный и блуждающий с развитием паралича мягкого неба), почки

Лабораторная диагностика дифтерии

Клинический материал: мазок из зева, слизь из носоглотки и др.

Методы:

- Бактериоскопический (окраска мазка по Леффлеру и Нейссеру – предварительный)
- Бактериологический (культуральный) основной
- 3. Серологический (ИФА, латексагглютинация, реакция нейтрализации антител, РНГА) для обнаружения антител и/или токсина в сыворотке крови.
- 4. Проба Шика реакция нейтрализации токсина in vivo

Культуральные свойства

- □Факультативные анаэробы
- □Растут на средах с кровью и сывороткой,
- □на кровяном теллуритовом агаре образуют колонии двух типов
- □По характеру колоний, биохимическим свойствам и способности продуцировать гемолизин выделяют три биовара: gravis, mitis, intermedius



Кровяно-теллуритовый агар (КТА) или Среда Клауберга II

gravis



mitis

Колонии C. diphtheriae на среде Клауберга

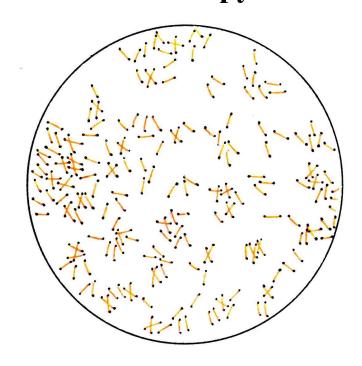


Биовар gravis

Биовар mitis

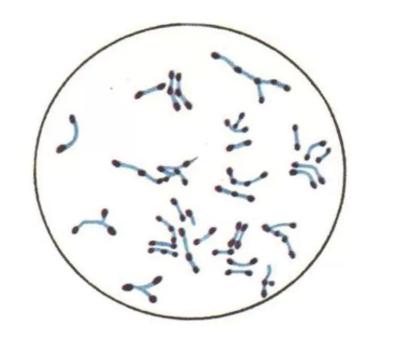
Микроскопическое исследование мазка

Окраска по Нейссеру



Окраска по Лефлеру

Corynebacterium diphtheriae

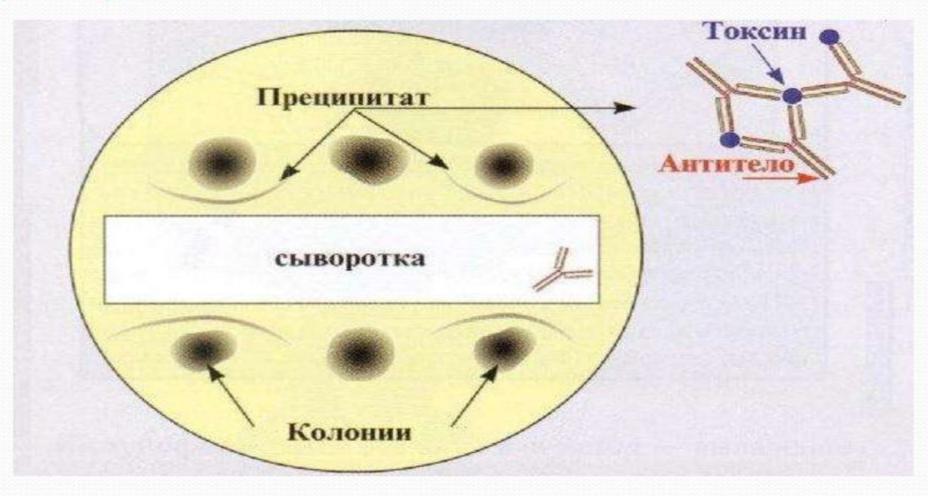


Corynebacterium diphtheriae



В основе метода определения токсигенности коринебактерий дифтерии (тест Элека) лежит процесс встречной иммунодиффузии токсина и антитоксических антител в плотной питательной среде. В местах оптимального количественного соотношения между токсином, продуцируемым коринебактериями, и антитоксином, нанесенным на фильтровальную бумагу, происходит их взаимодействие с образованием преципитата в виде белой линии или "усов".

Определение токсигенности дифтерийной палочки





Положительная проба Пизу на наличие цистиназы

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

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

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

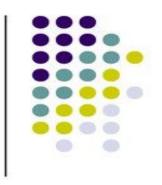


Проба Шика проводится для оценки состояния антитоксического иммунитета; внутрикожно вводят минимальное количество токсина:

- При наличии антител против дифтерийного токсина видимых изменений не будет
- При отсутствии антитоксического имммунитета наблюдается воспалительная реакция

Антитоксические сыворотки получают иммунизацией лошадей возрастающими дозами анатоксинов, а затем и соответствующими токсинами. Сыворотки подвергают очистке и концентрации методом «Диаферм-3», контролю на безвредность, апирогенность, затем титруют т. е. определяют содержание антитоксинов в 1 мл препарата. Специфическая активность сывороток или количество антител измеряется с помощью специальных методов, основанных на способности сывороток in vitro и in vivo нейтрализовать соответствующие токсины и выражается в международных антитоксических единицах (МЕ), принятых ВОЗ. За 1 МЕ принимается то минимальное количество сыворотки, которое способно нейтрализовать определенную дозу токсина, выражающуюся в стандартных единицах.





- Основной метод введение антитоксической противодифтерийной сыворотки (ПДС). Эффективна лишь в тех случаях, когда она вводится в первые часы болезни. Введение ПДС при токсических формах дифтерии даже в первые дни болезни не исключает возможности развития осложнений.
- Доза сыворотки зависит от формы дифтерии (при локализованной 10—20 тыс. МЕ однократно, при токсической до 150 тыс. МЕ однократно).
- При тяжелых формах дифтерии целесообразно двух трехкратное проведение плазмафереза.
- Одновременно с введением ПДС назначаются антибактериальные препараты (курс пять семь дней). Кроме того, с целью дезинтоксикации и коррекции гемодинамических нарушений назначают альбумин, плазму, реополиглюкин, глюкозо-калиевую смесь с инсулином, полийонные растворы, кортикостероиды. В случае нарастания дыхательной недостаточности требуется трахеостомия.

Специфическая профилактика

Действующее начало всех вакцин — дифтерийный анатоксин (дифтерийный гистотоксин, утративший токсичность, но сохранивший антигенные свойства в результате обработки формалином при 37-40С в течение 3 недель:

- АД адсорбированный дифтерийный анатоксин
- АДС адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин
- АДС-М внатоксин

 -гакцина для профилактики дифтерии и столбняка с уменьшенным содержанием антигенов
- АД-М внатоксин
 вакцина для профилактики дифтерии с уменьшенным содержанием антигенов
- Имовакс Д.Т. Адюльт
 вакцина для профилактики дифтерии и столбняка, аналог АДС-М (Aventis Pasteur, Франция)
- ДТ Векс
 вакцина для профилактики дифтерии и столбняка, аналог АДС

(Aventis Pasteur, Франция)



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

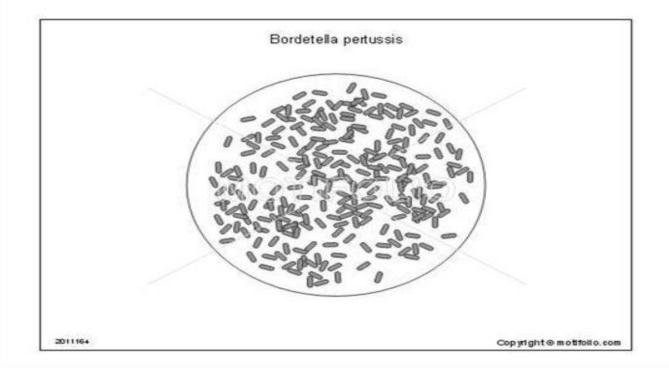
Через 2,5 - 3,5 часа производят учет результатов реакции. Допускается - через 18 - 24 часа.

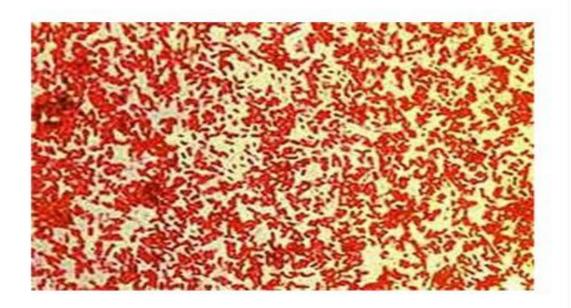
эритроцит

эритроцит

Таксономия

Возбудители коклюша и паракоклюша относятся к отделу Gracilicutes, семейству Alcaligenaceae, роду Bordetella, вид Bordetella pertussis (палочка Борде-Жангу, возбудитель коклюша) и вид Bordetella parapertussis (возбудитель паракоклюша).





Возбудитель – Bordetella pertussis - впервые был обнаружен в 1900 г. в мазках из мокроты ребенка и затем выделен в чистой культуре в 1906 г. Ж. Борде и О. Жангу. Впоследствии возбудитель получил название палочка Борде-Жангу.

Таксономическое положение

Ро∂ <u>Bordetella</u>

Виды, патогенные для человека:

- B. bronchiseptica бронхисептикоз
- **B. hinzii** оппорт. инфекции
- B. holmesii оппорт.инфекции
- **B. parapertussis** паракоклюш
- B. pertussis- коклюш

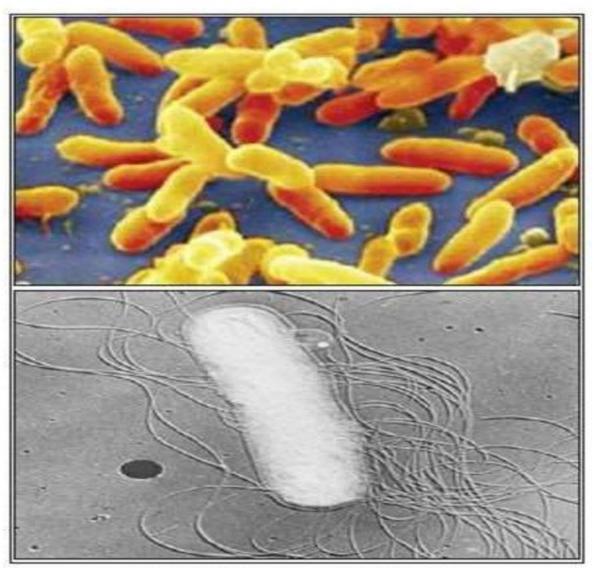


Рис. 1. Бациллы В. pertussis (электронная микроскопия)

Эпидемиология

- В естественных условиях к коклюшу восприимчив только человек.
- Источник инфекции при коклюше и паракоклюше больной человек типичной или стертой формой, особенно в период до появления спазматического кашля или бактерионоситель.
- Путь передачи возбудителя воздушно-капельный. Бордетеллы обладают специфическим тропизмом к реснитичатому эпителию респираторного тракта хозяина. К инфекции восприимчивы люди всех возрастов, но более всего дети от 1 года до 10 лет.
- Наиболее тяжело коклюш протекает у детей первого года жизни.

Факторы патогенности

Коклюшный токсин — термостабильный белок, состоящий из 2-х субъединиц А и В, стимулирует лимфоцитоз, оказывает нейротоксическое действие

Термостабильный эндотоксин (липополисахарид) стимулирует воспаление.

Аденилатциклаза — полипептид, который повышает концентрацию цАМФ в различных клетках, включая макрофаги и нейтрофилы, что подавляет их активность. Также обладает гемагглютинирующим действием.

Филаментозный гемагглютинин является одним из компонентов наружной оболочки бактериальной клетки. Способствует прикреплению микроорганизмов к эпителиальным клеткам дыхательных путей.

Антигенная структура

- У бордетелл установлено существование 14 термолабильных капсульных (К) антигеновагглютининов.
- Они выявляются в реакции агглютинации.
- Их часто называют также "факторами" и обозначают арабскими цифрами.
- Для бордетелл характерны общие (родовые) и специфические (видовые) антигены.
- Общий антиген 7-ой.
- Видовой для В. pertussis 1-ый АГ.
- Видовой для *B. parapertussis 14*-ый АГ.
- ullet Видовой для $B.\ bronchiseptica-12-ый АГ$

Лабораторная диагностика

- Основной метод бактериологический. Для выделения чистой культуры в качестве материала используют слизь с задней стенки глотки, которую высевают на КУА или среду Борде-Жангу. Материал берут с помощью клювовидного (через рот) или прямого (через нос) тампона с задней стенки глотки. Посев также может быть сделан методом "кашлевых пластинок" (во время кашля ко рту больного на расстоянии 8-10 см подносят открытую чашку с питательной средой). Выросшую культуру идентифицируют по культуральным, биохимическим и антигенным свойствам.
- В качестве ускоренного применяют иммунофлуоресцентный метод РИФ с материалом из зева больного и флюоресцентной сывороткой (позволяет получить ответ через 4-5 часов после взятия материала).
- Серологические методы (реакция агглютинации, непрямой гемагглютинации, связывания комплемента) используют как при выявлении атипичных форм, а вспомогательные также для ретроспективной возбудителю диагностики, поскольку антитела к появляются не ранее третьей недели заболевания.

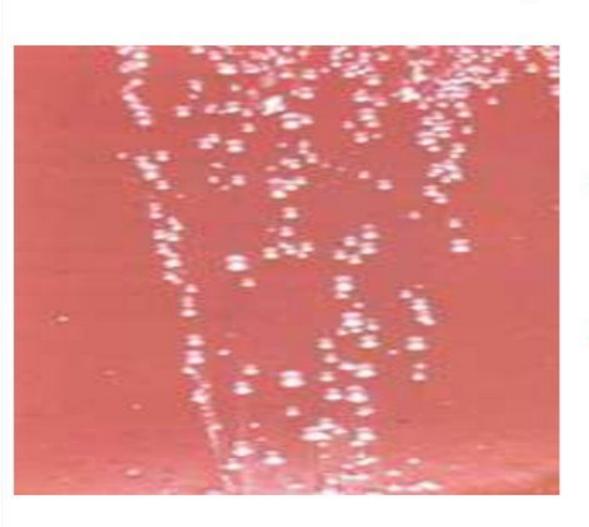
Культуральные свойства

- Оптимальная t культивирования
 37°C при pH 7,2.
 - Не растет на простых питательных средах,
 - культивируется на картофельно-глицериновом агаре и на полусинтетическом казеиново-угольном агаре без добавления крови.
- На кровяных средах образует зону гемолиза.
- Колонии мелкие, круглые, с ровными краями, блестящие напоминающие капельки ртути или зерна жемчуга.



Рост Bordetella pertussis на агаре Борде-Жангу

Колонии Bordetella pertussis на среде Борде—Жангу



Основные формы колоний

• гладкие (S) - так называемая І фаза (вирулентные культуры)

• шероховатые (R) –

фаза IV (авирулентные культуры)

S через промежуточные формы переходят в **R** с изменением культуральных и антигенных свойств, потерей вирулентности

Питательные среды для культивирования бордетелл

Среда Борде-Жангу (картофельноглицериновый агар с кровью)

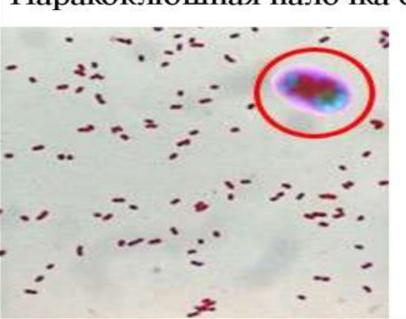


Среда КУА (казеиновоугольный агар)

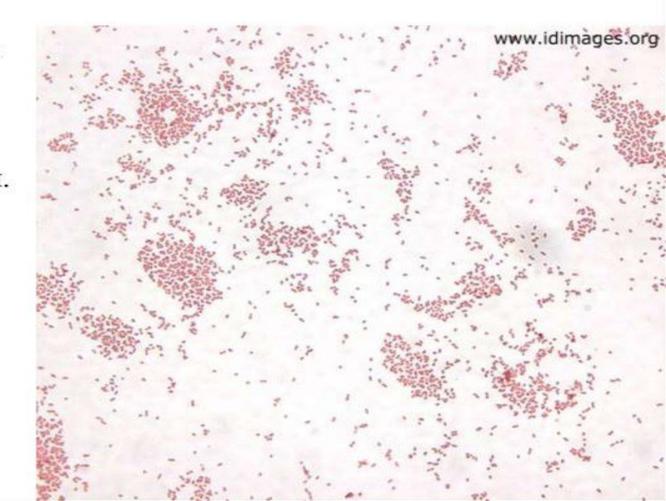


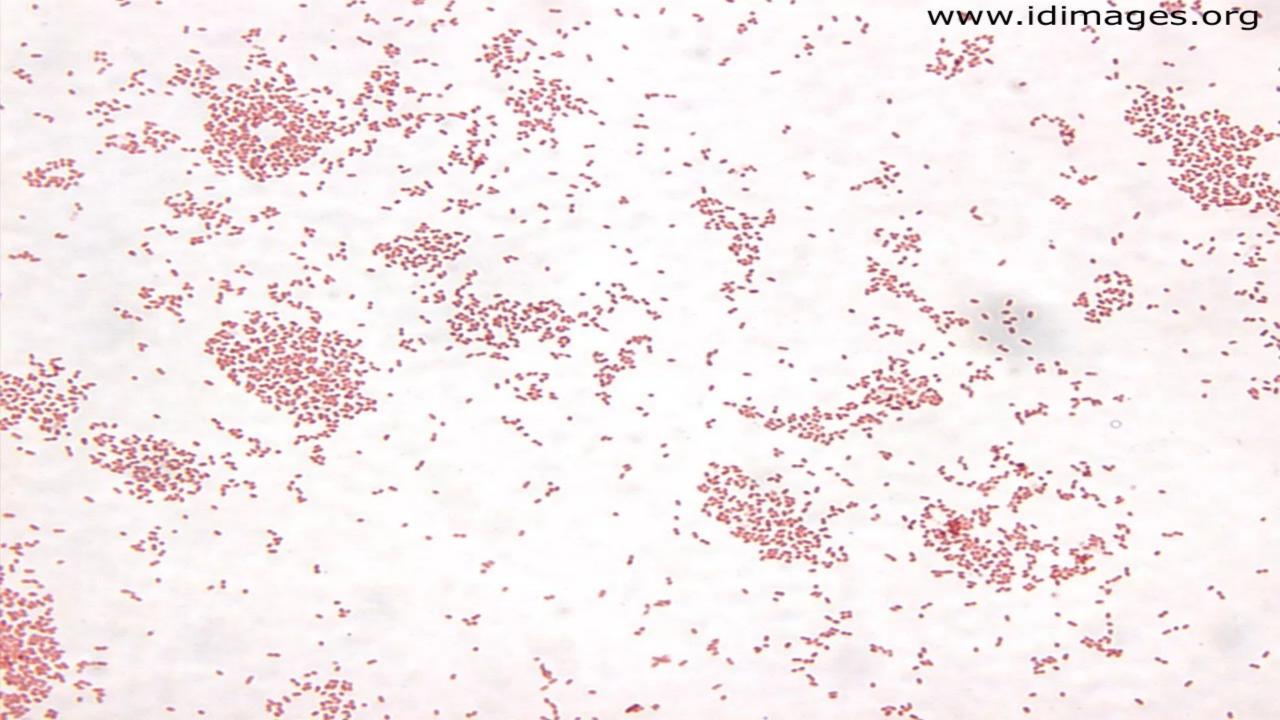
Figure 7. Como de Timovo de Il comunidad acerdadas con figures a la figure de la figure de Il comunidad de Il

Коклюшные палочки являются грамотрицательными. Окрашиваются по Граму в розовый или красный цвет. Бордетелла неподвижна, по размеру напоминает короткую палочку коковидной формы, концы закруглены, длина составляет 0,5 — 2 мкм, не образуют спор, в мазках располагаются отдельно, реже — попарно, образуют капсулу, обеспечивающую защиту микроба от фагоцитоза. Паракоклюшная палочка более крупная.



Морфология





Специфическая профилактика коклюша.

В России в рамках национального календаря прививок применяют вакцину АКДС, содержащую взвесь убитых коклюшных микробов, дифтерийный и столбнячный анатоксины, способствующие выработке антибактериального иммунитета к коклюшу, антитоксического иммунитета к дифтерии и столбняку.

Вакцинацию начинают в 3 месяца.

Вакцинация включает 3 прививки с интервалом в 1,5 месяца (3- 4,5- 6 месяцев),

ревакцинация однократно в 18 месяцев.