

# **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

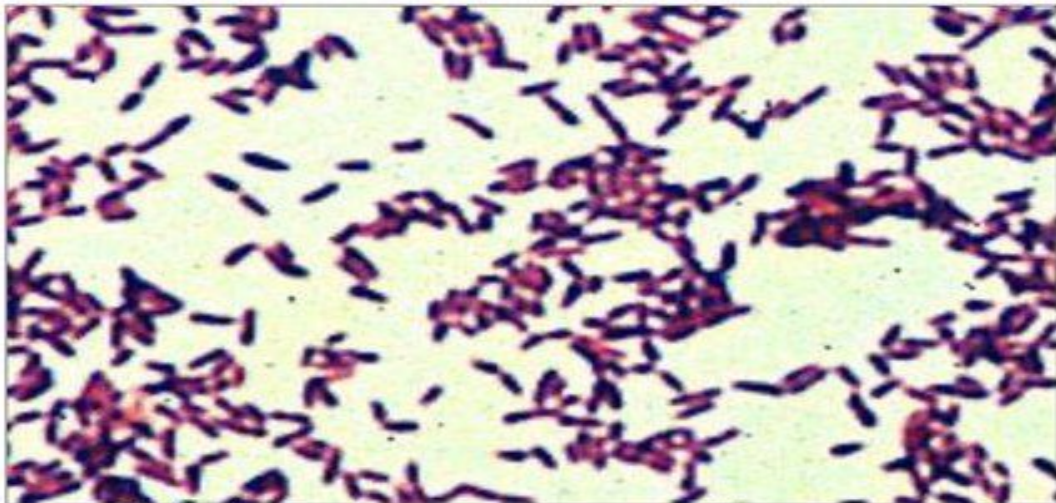
var. gravis

var. mitis

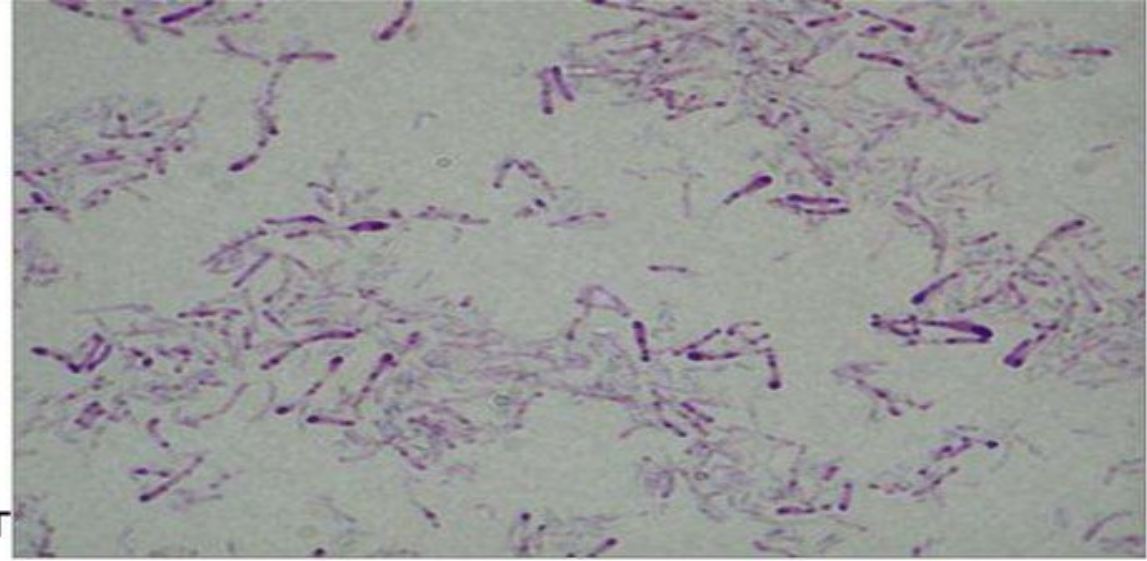
var. intermedius

# 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 клетке-мишени. А-субъединица проникает внутрь клетки-мишени и, являясь ферментом АДФ-рибозил-трансферазой, вызывает АДФ-рибозилирование белкового фактора элонгации EF-2, необходимого для построения полипептидных 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:

- 1. Бактериоскопический** (окраска мазка по Леффлеру и Нейссеру – предварительный)
- 2. 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



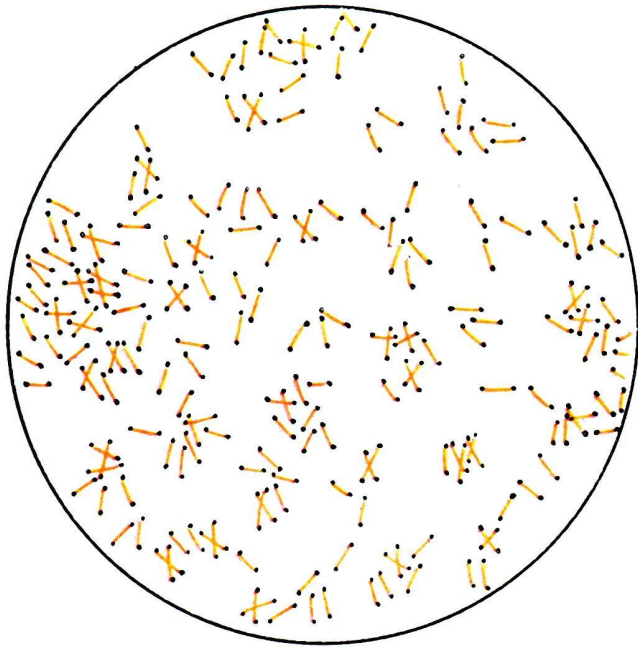
Биовар *gravis*

Биовар *mitis*



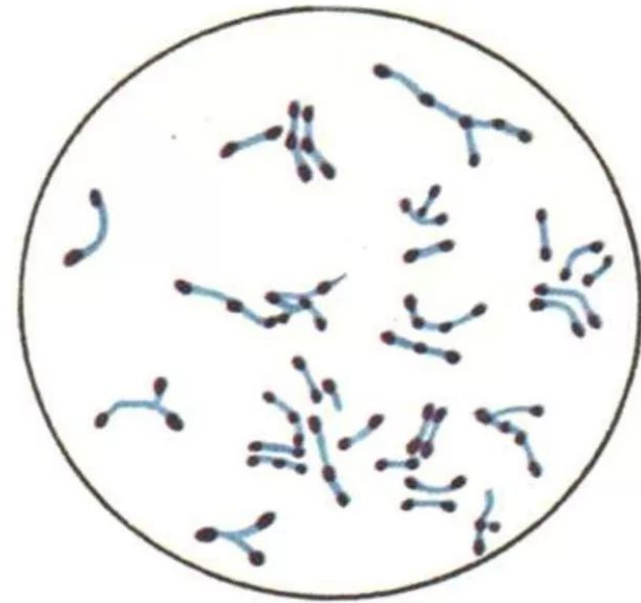
# Микроскопическое исследование мазка

## Окраска по Нейссеру

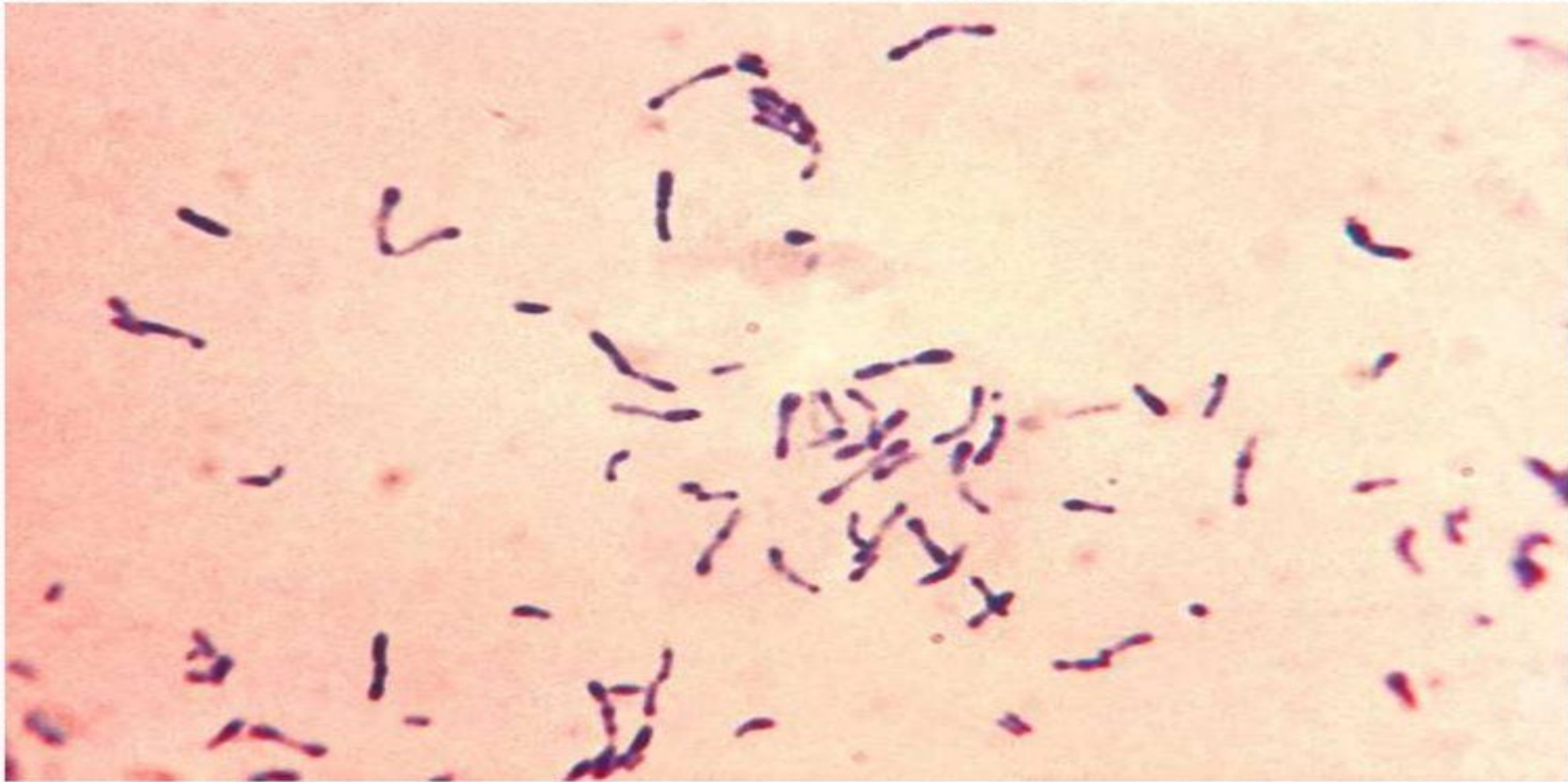


## Окраска по Лефлеру

*Corynebacterium diphtheriae*



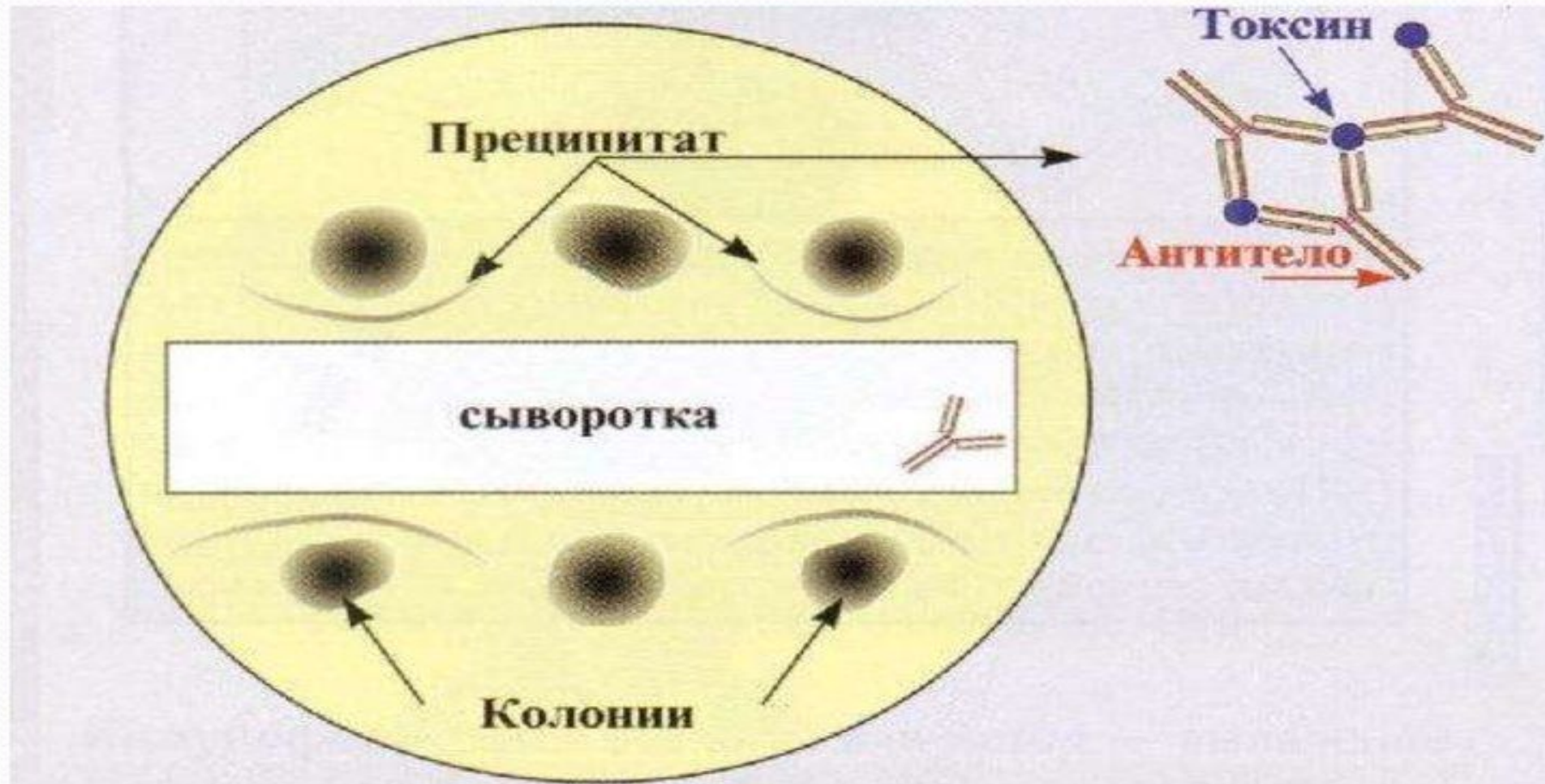
# Corynebacterium diphtheriae

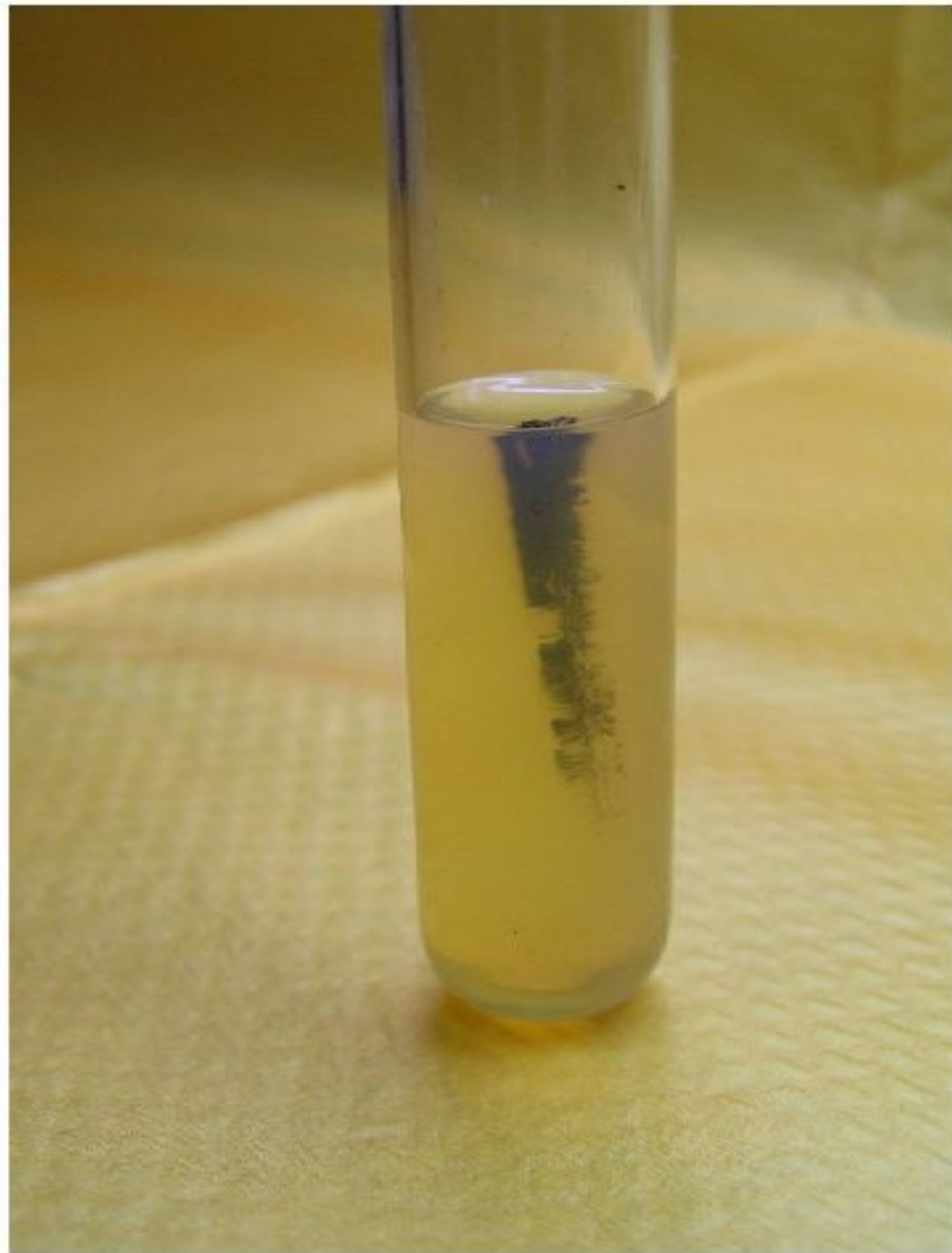


В основе метода определения токсигенности коринебактерий дифтерии (тест Элека) лежит процесс встречной иммунодиффузии токсина и антитоксических антител в плотной питательной среде. В местах оптимального количественного соотношения между токсином, продуцируемым коринебактериями, и антитоксином, нанесенным 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  
взаимодействуя 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 иммунитета 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, апиrogenность, 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.



# Дифтерия: лечение

- 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 анатоксин  
*-вакцина для профилактики дифтерии и столбняка с уменьшенным содержанием антигенов*
- АД-М анатоксин  
*вакцина для профилактики дифтерии с уменьшенным содержанием антигенов*
- Иммовакс Д.Т. Адюльт  
*вакцина для профилактики дифтерии и столбняка, аналог АДС-М (Aventis Pasteur, Франция)*
- **ДТ Вакс**  
*вакцина для профилактики дифтерии и столбняка, аналог АДС*

(Aventis Pasteur, Франция)

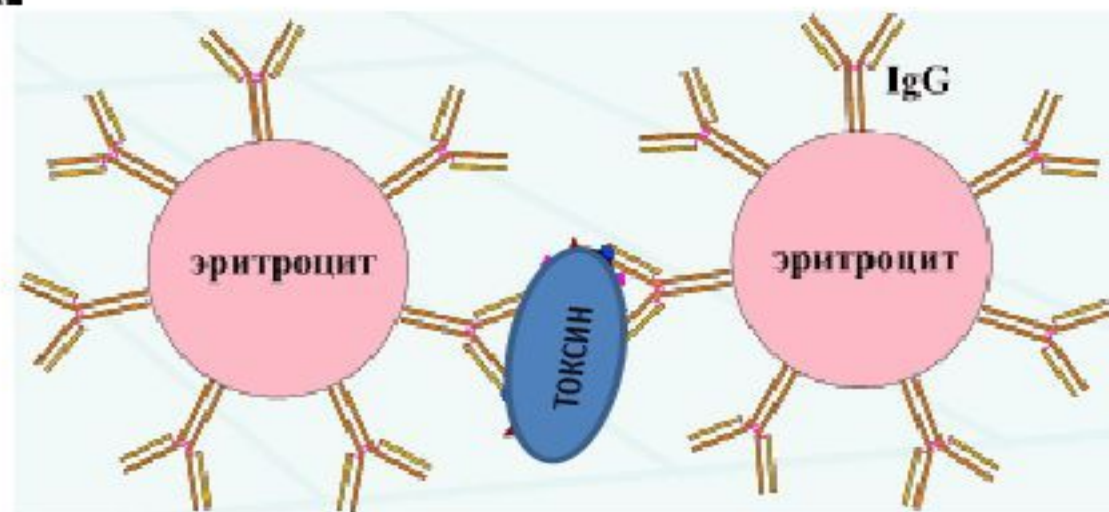


# РНГА (РОПГА) для выявления дифтерийного токсина

**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**

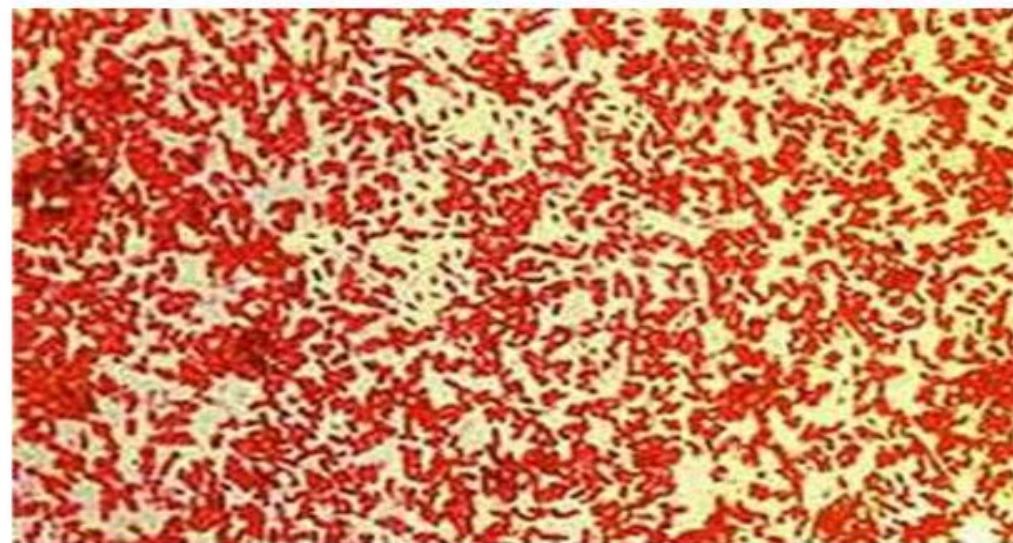
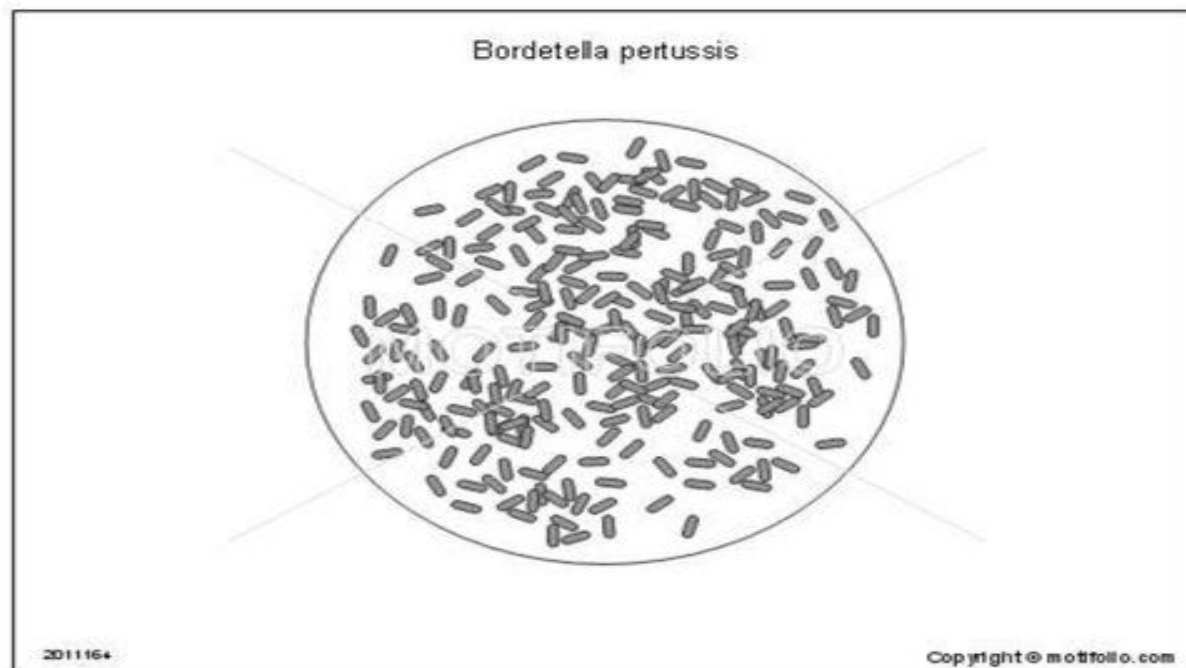
**Через 2,5 - 3,5 часа производят учет результатов реакции.  
Допускается - через 18 - 24 часа.**





# 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

Род **Bordetella**

Виды, патогенные для человека:

**B. bronchiseptica** - бронхисептикоз

**B. hinzii** – оппорт. инфекции

**B. holmesii** – оппорт.инфекции

**B. parapertussis** - паракоклюш

**B. pertussis**- коклюш

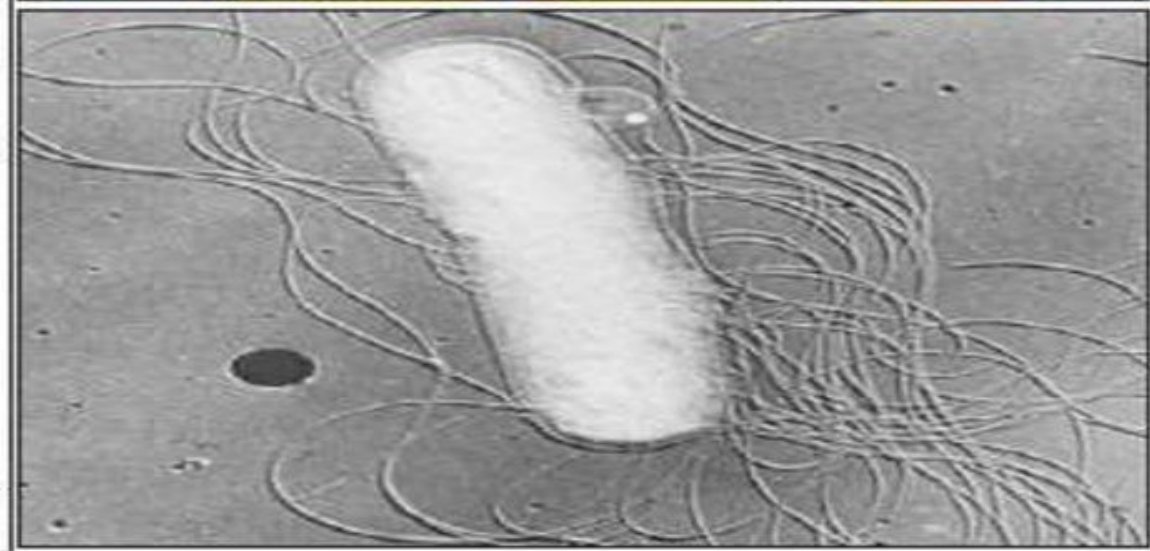


Рис. 1. Бациллы *B. pertussis*  
(электронная микроскопия)

# 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 реснитчатому 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) антигенов-агглютининов**.
- 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 *B. pertussis* – 1-ый АГ.
- Видовой для *B. parapertussis* – 14-ый АГ.
- Видовой для *B. bronchiseptica* – 12-ый АГ



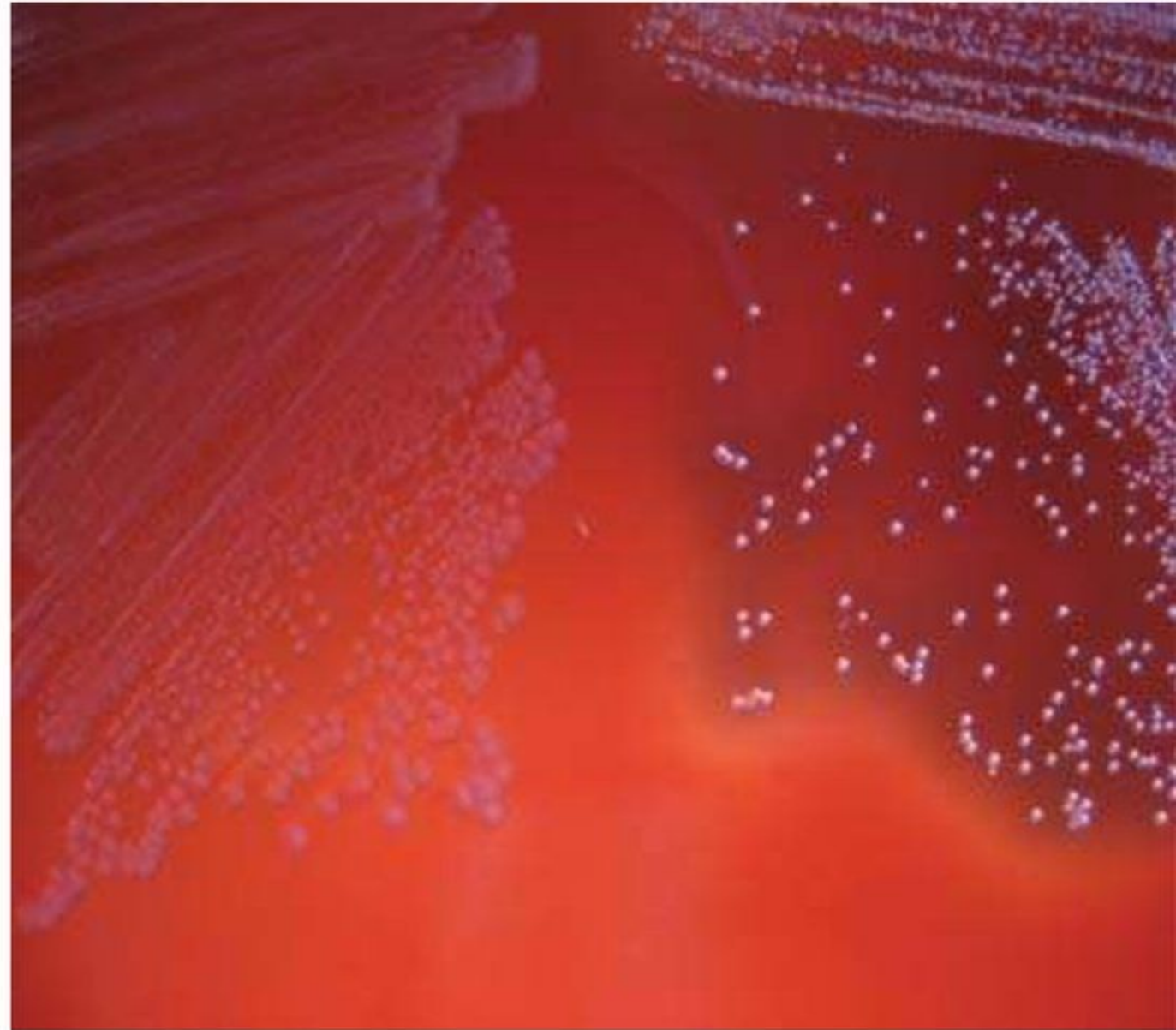
# Лабораторная диагностика

- **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 флуоресцентной сывороткой (позволяет получить ответ через 4-5 часов после взятия материала).
- **Серологические методы** (реакция агглютинации, непрямой гемагглютинации, связывания комплемента) используют как вспомогательные при выявлении атипичных форм, а также для ретроспективной диагностики, поскольку антитела к возбудителю появляются не ранее третьей недели заболевания.



# Культуральные свойства

- Оптимальная  $t$  культивирования  $37^{\circ}\text{C}$  при  $\text{pH}$  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 **I 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  
(картофельно-  
глицериновый агар  
с кровью)



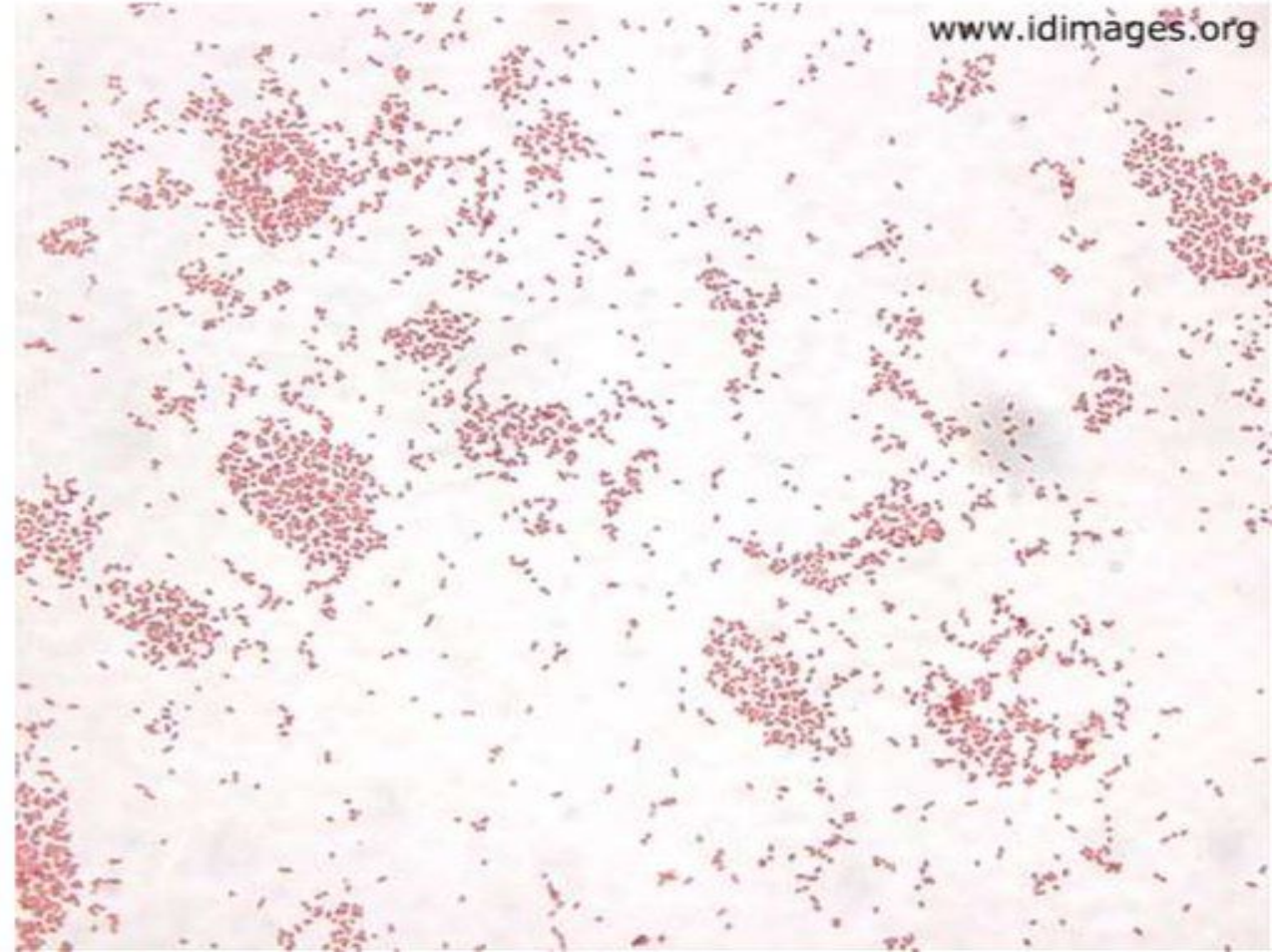
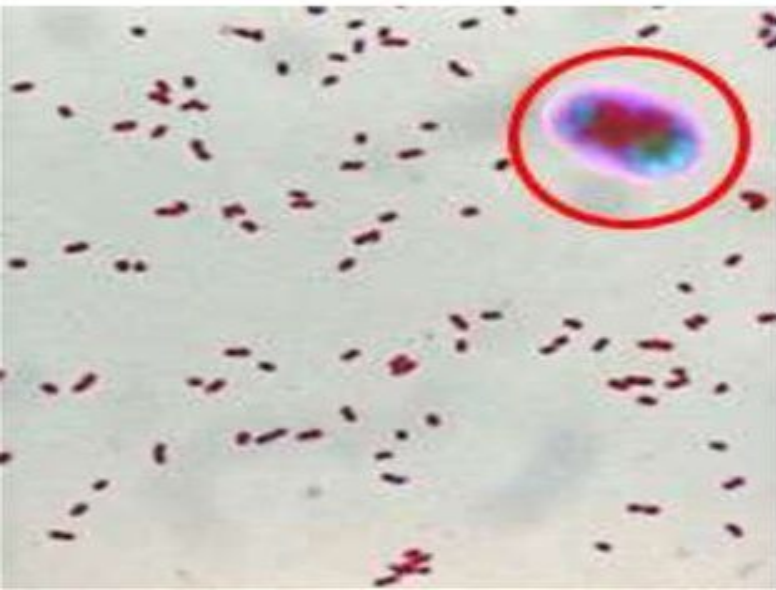
Среда КУА  
(казеиново-  
угольный агар)



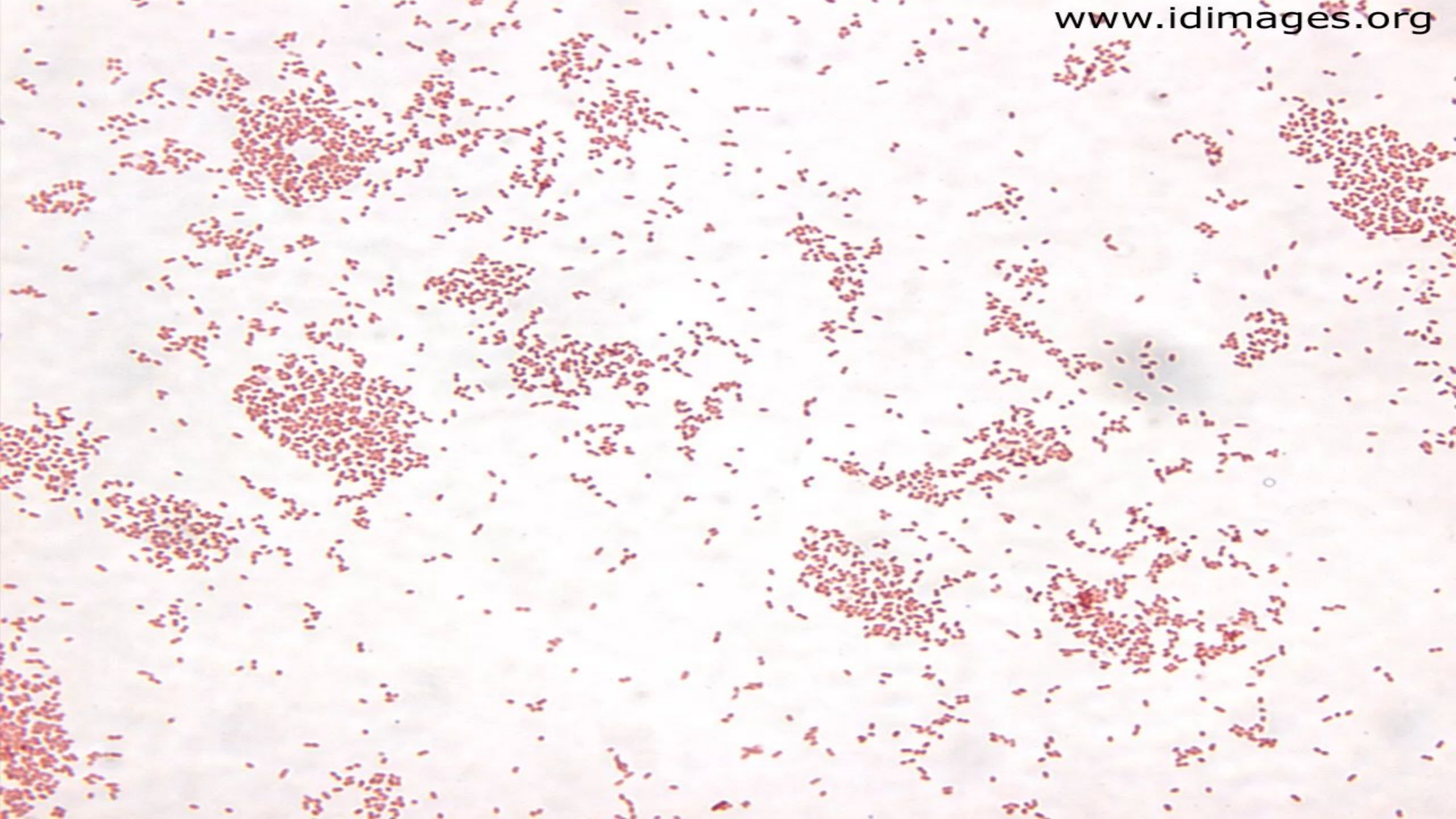


# Морфология

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. Паракокклюшная палочка более крупная.









## **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.