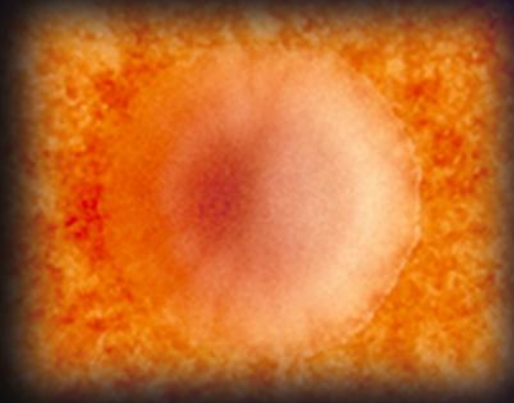


ДИФТЕРИЯ

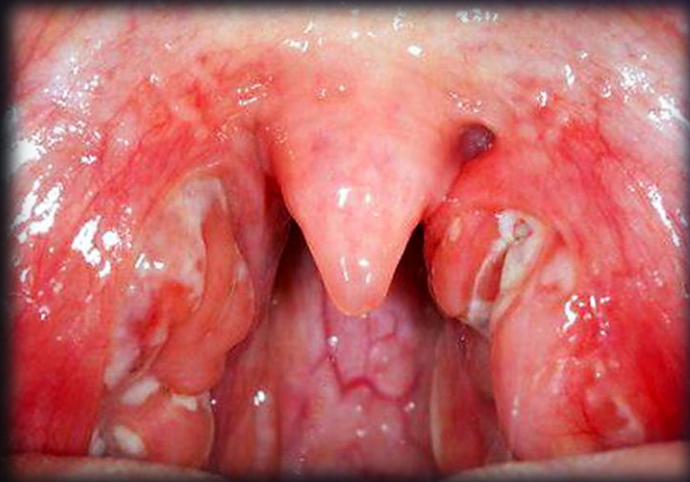


Клинически значимые **коринебактерии**

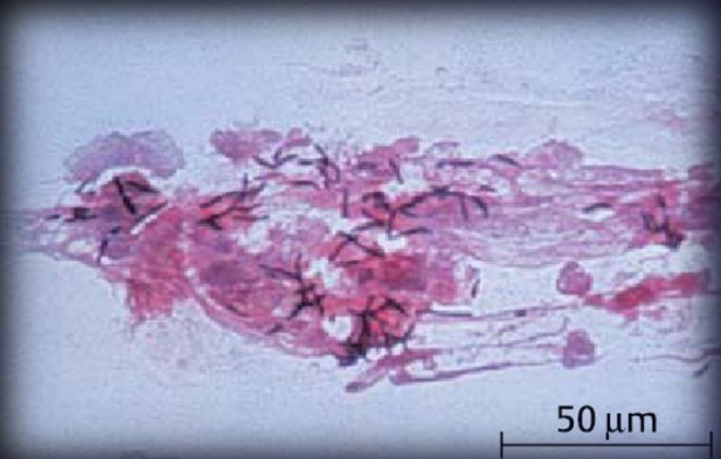


Виды рода <i>Corynebacterium</i>	Болезнь
<u><i>C. diphtheriae</i></u>	<u>Дифтерия</u> – только токсигенные штаммы!
<i>C. ulcerans</i>	Ангина у иммунодефицитных лиц
<i>C. Jeikeium</i> (группа JK)	Септицемия, инфекции мягких тканей
<i>C. urealyticum</i> (группа D2)	Инфекции мочевого тракта (пиелонефрит, цистит и др. оппортунистические инфекции)
<i>C. minutissimum</i>	Эритразма, оппортунистические инфекции
<i>C. xerosis</i>	Оппортунистические инфекции - <u>сапрофит</u>
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	Эндокардит, оппортунистические инфекции
<i>C. striatum</i>	Оппортунистические инфекции

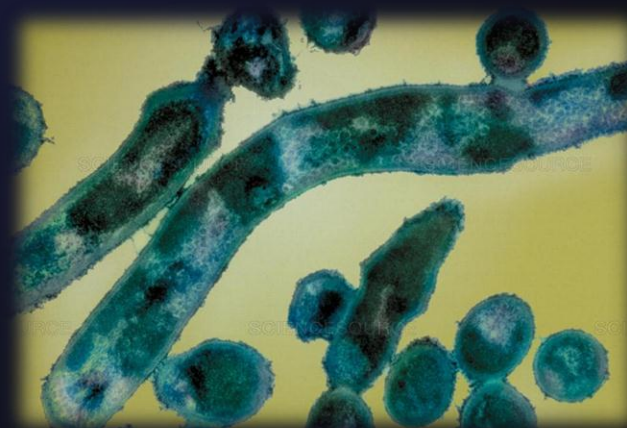
Дифтерия – острая, антропонозная, воздушно-капельная, токсинемиическая инфекция, характеризуется поражением слизистых оболочек ротоглотки и верхних дыхательных путей, а также слизистых оболочек половых органов, глаза с образованием плотно спаянных с подлежащими тканями фибриновых плёнок на фоне симптомов специфической интоксикации макроорганизма.



C. diphtheriae. Отделяемое
носоглотки. Окраска по Граму

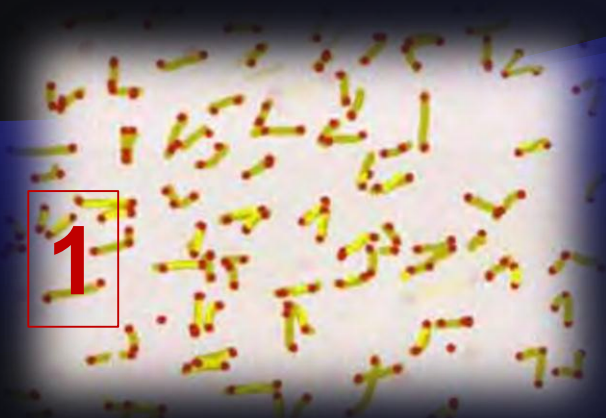


Возбудитель дифтерии.
Окраска по Нейссеру

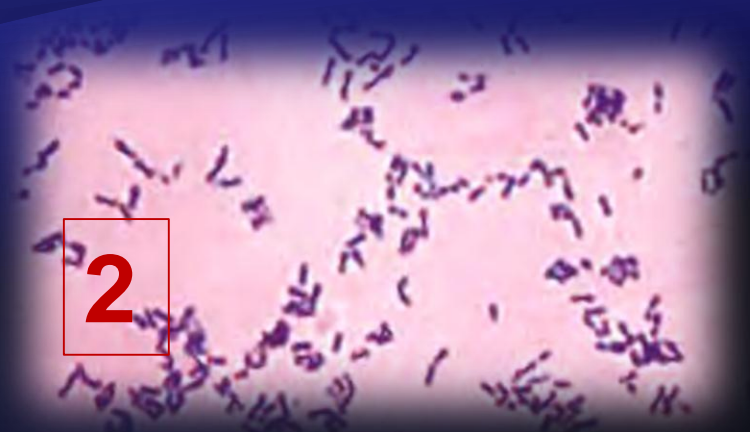


Мазки из чистой культуры *C. diphtheriae*. Окр. по Нейссеру (1) и щелочной синькой Леффлера (2)

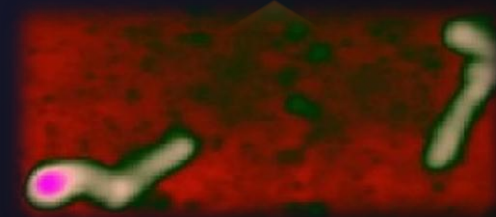
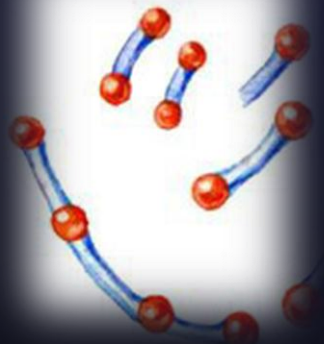
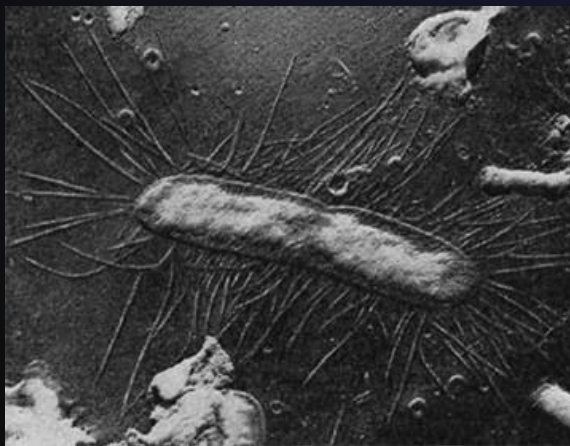
1



2

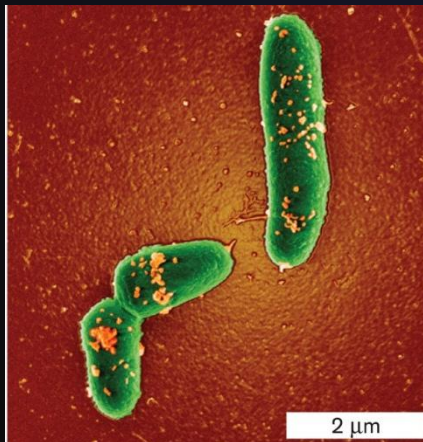


При люминесцентной микроскопии зёрна окрашиваются **корифосфином** в оранжево-красный цвет, тела бактерий – в желто-зеленый цвет.



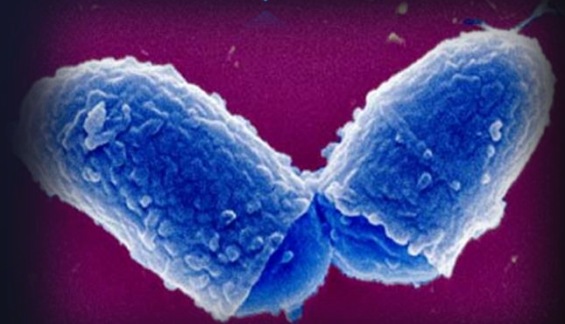
- Дифтерийная палочка не обладает кислотоустойчивостью, неподвижна, спор и капсул не образует;
- на поверхности имеет *фимбрии*, облегчающие адгезию к эпителию слизистой оболочки;
- имеет *микрокапсулу* с входящим в её состав корд-фактором;
- клеточная стенка содержит много липидов, в том числе некислотоустойчивые миколовые кислоты.

Форма клеток в виде булавы (из-за зерен волютина)



2020

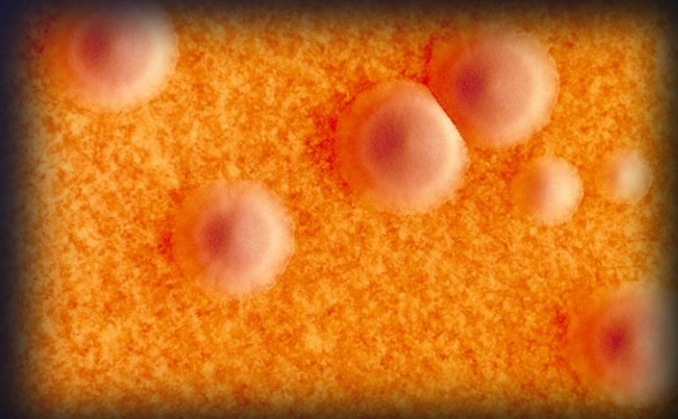
Наномикроскопия.
Клетка *C. diphtheriae* после деления



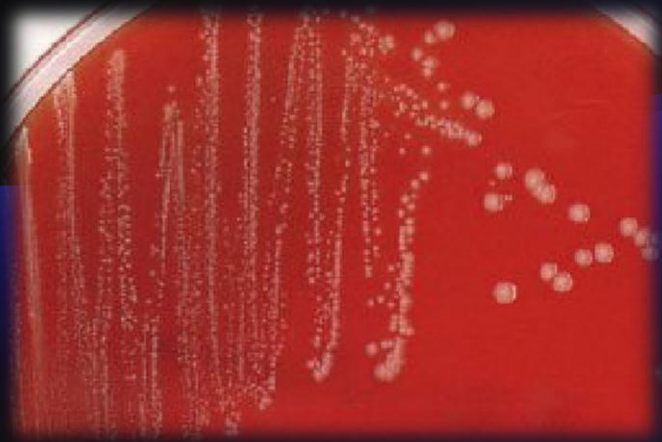
д.м.н. Таран Татьяна Викторовна

Культуральные свойства

- Дифтерийные палочки – факультативные анаэробы, хорошо размножаются при свободном доступе кислорода. К питательным средам **требовательны**.
- Рост на скошенном сывороточном агаре сравнивают с шагреновой кожей – колонии не сливаются.
- В отличие от коринеформных бактерий, возбудитель дифтерии, относясь к факультативным анаэробам, растет и в глубине столбика сахарного агара. Коринеформные бактерии образуют поверхностный налёт, т.к. у них более выражены аэробные свойства.



Колонии *C. diphtheriae* на 5 % кровяном агаре и на теллуритовой среде (серо-чёрные)



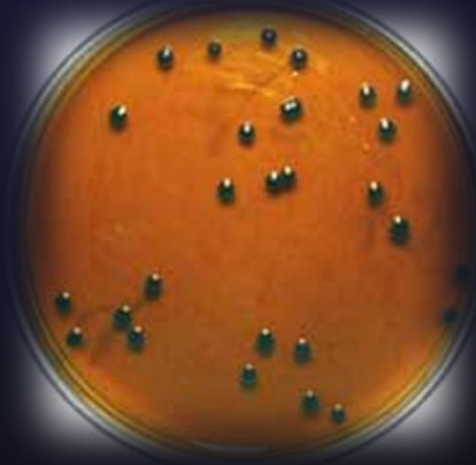
Колонии *C. diphtheriae* на кровяном агаре



Возбудитель дифтерии устойчив к высоким концентрациям **теллурита** калия или натрия, ингибирующим рост сопутствующей микрофлоры.

На поверхности плотных сред с теллуритом калия дифтерийные палочки образуют **темно-серые или черные колонии** (гравис или митис), что служит основой для подразделения этого вида бактерий на биовары.

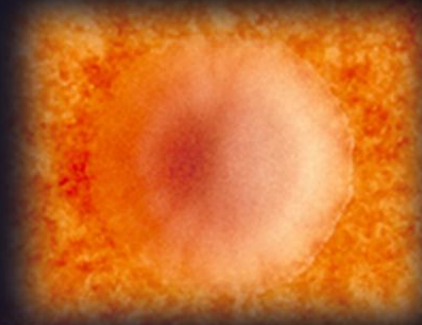
- По морфологии клеток, структуре колоний и некоторым ферментативным признакам возбудитель дифтерии разделяют на три культурально биохимических варианта (биовары) - **gravis**, **mitis**, **intermedius** :
- Обязательным и стабильным признаком является **тест на крахмал**. По этому показателю все возбудители дифтерии делятся на два биовара: **gravis** (грубый) и **mitis** (тонкий).
- Все штаммы, не ферментирующие крахмал, относятся к биовару **mitis**.
- На бульоне штаммы биовара **gravis** образуют крошащуюся плёнку, частично осаждающуюся на дно; биовар **mitis** характеризуется диффузным ростом; штаммы биовара **intermedius** растут в виде зернистой муки.



Биовар **gravis** ферментирует глюкозу, мальтозу, крахмал и гликоген.

На кровяных теллуритовых средах биовар **gravis** образует сухие матовые размером 2-3 мм (крупные) плоские серовато-черные колонии, приподнятые в центре. Периферия колоний светлая с радиальной исчерченностью и изрезанным, волнистым краем (R-форма колоний). Эти колонии напоминают цветок **маргаритку**.

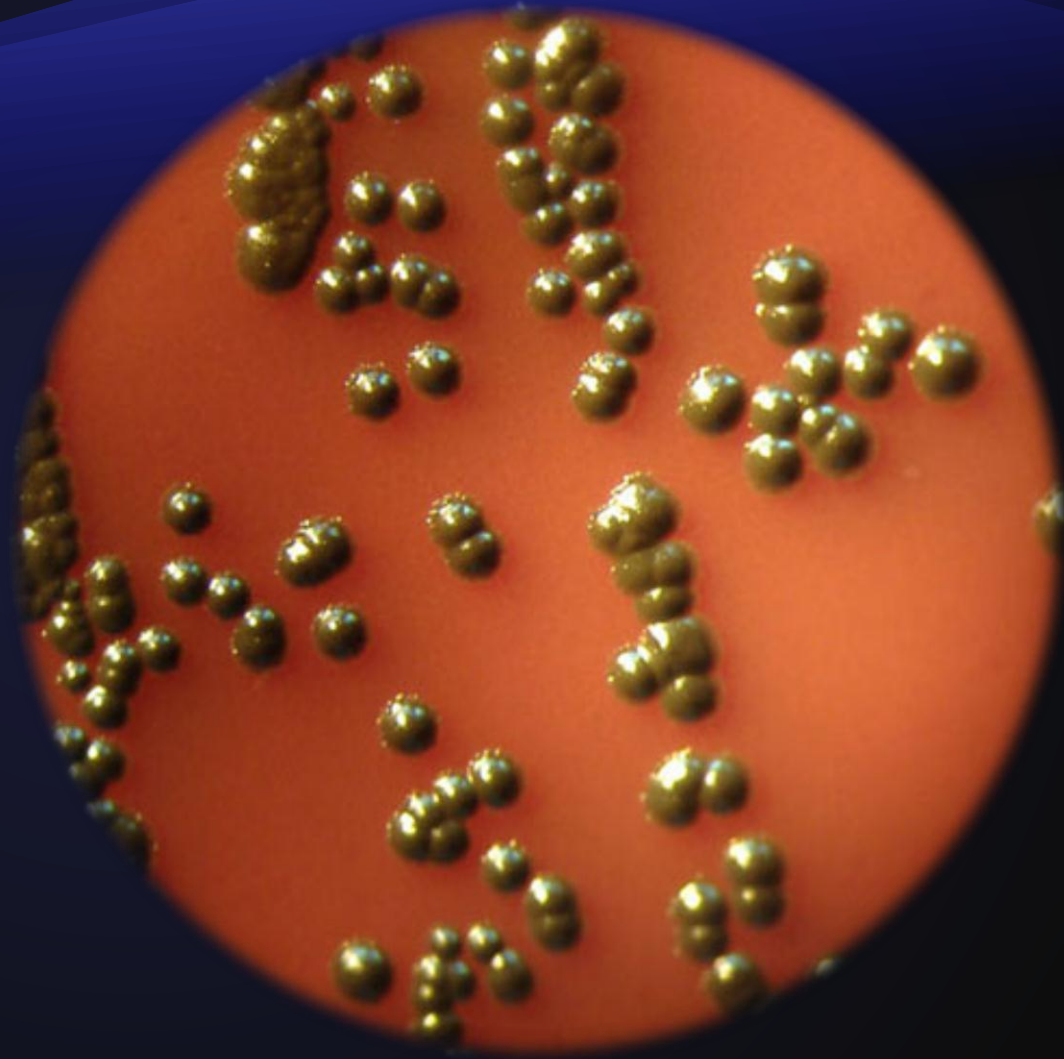
На жидкой среде **gravis** образует пленку на поверхности, а также крошковидный или крупнозернистый осадок. Жидкость остается прозрачной.



*Biovar
gravis*

- Биовар *mitis*:

- Бактерии образуют мелкие (2 мм) гладкие блестящие черные полупрозрачные колонии с ровными краями (S-формы колоний), окруженные зоной гемолиза.
- Крахмал (–).
- На жидкой среде дают равномерное помутнение и порошкообразный осадок.
- На средах Гисса разлагают лишь глюкозу и мальтозу.



Биовар *intermedius*:

- Образует плоские темные гладкие колонии со слегка приподнятым центром и ровными краями (S-формы колоний) или шероховатые колонии с изрезанными краями (RS-формы).
- Колонии мельче (менее 1 мм), чем у других биоваров.
- Ферментирует глюкозу, мальтозу и гликоген.
- Клетки по сравнению с другими биоварами наиболее крупные, с бочковидными очертаниями.
- Клетки разделены внутренними поперечными перегородками на несколько сегментов.
- По основным свойствам похож на биовар *gravis*, поэтому его относят в группу *gravis*.



Резистентность возбудителя

- Долго сохраняется при комнатной температуре во влажной среде; в высушенных пленках выдерживает $T 98^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч, а при комнатной температуре может сохраняться в пленках до 7 мес. На игрушках сохраняется 2 нед. В трупах сохраняет морфологию не более 15 сут., в пыли – до 5 нед., в воде и молоке – до 6-20 сут, на рассеянном свету остается жизнеспособным до 8 ч.
- Дезинфектанты и антисептики быстро инактивируют бактерии: 3 % р-р лизола вызывает гибель в течение 10 мин, этанол – за 1 мин, 1 % р-р H_2O_2 – за 2-3 мин, 2-3 % р-р хлорамина и 5 % р-р фенола – в течение 5-10 мин.

■ Эпидемиология дифтерии

Болеет только человек, не обладающий устойчивостью к возбудителю и антитоксическим иммунитетом (содержание в крови антитоксина по методу Иенсена $\leq 0,03$ АЕ/мл).

Резервуар инфекции – человек (больной, реконвалесцент, бациллоноситель).

Основной путь передачи – **воздушно-капельный**;

Определенное значение в передаче инфекции имеют

воздушно-пылевой и **контактно-бытовой** пути передачи; также возможно заражение через инфицированные продукты (молоко) – **алиментарный** путь передачи инфекции

При дифтерии кожи и ран имеют место **контактный** и **трансмиссивный** (в тропиках) пути передачи.



Род <i>Corynebacterium</i>	Каталаза	H ₂ S	Уреаза	Разложение					Редукция нитратов
				глюкоза	мальтоза	сахароза	крахмал	декстрин	
<i>C. diphtheriae</i> , биовар <i>gravis</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i> , биовар <i>intermedius</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>C. diphtheriae</i> , биовар <i>mitis</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae</i> , биовар <i>mitis</i> , вариант <i>belfanti</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. ulcerans</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>C. xerosis</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	+/-
<i>C. striatum</i>	+	-	-	+	-	+	+	+	+/-

Биохимические свойства

Положительная проба Пизу на наличие цистиназы

- Важным дифференциально-диагностическим признаком является способность *C. diphtheriae* продуцировать фермент **цистиназу**, расщепляющую цистин или цистеин до сероводорода, который, реагируя с уксуснокислым свинцом:
 - вызывает почернение столбика сывороточного агара в результате образования в нем сернистого свинца (положительная **проба Пизу**)
 - или образование коричневых ореолов на цистин-теллурит-сывороточной среде Тинсдаля-Садыковой.
- *C. diphtheriae* образует также каталазу, внеклеточную ДНК-азу, сукцинатдегидрогеназу, нейраминидазу, гиалуронидазу и др. ферменты.



Антигенная структура

- **Поверхностные К-Аг** . Термолабильные (белки), серовароспецифические (т.е. с помощью сывороток к К-антигену *C. diphtheriae* разделяют на серовары – около 58 сероваров); **К-Аг** входит в состав микрокапсулы;
- **Глубокие О-Аг**. Термостабильные (видовые и межвидовые с липидными и полисахаридными фракциями). Расположены в глубине клеточной стенки.

**Антигенная изменчивость обуславливает
вариабельность и слабую напряженность
антибактериального иммунитета**



Факторы патогенности

- **ЭКЗОТОКСИН** – дифтерийный гистотоксин;
- **поверхностные структуры** липидной и белковой природы (пили, фимбрии, ворсинки) к которым относится **корд-фактор** (димиколат трегалозы, входящий в состав микрокапсулы);
- ферменты;
- **ТОКСИНЫ.**

Токсигенные *Corynebacterium diphtheriae* выделяют **ЭКЗОТОКСИН**, который вызывает отёк и некроз слизистых, поражает миокард, периферические нервы (особенно часто — языкоглоточный и блуждающий с развитием паралича мягкого нёба), почки.

- **Поверхностные структуры** способствуют адгезии микробов в месте входных ворот инфекции, препятствуют фагоцитозу бактерий, оказывают токсическое воздействие на клетки макроорганизма, разрушают митохондрии.
- **Корд-фактор** – нарушает фосфорилирование процессов дыхания эукариотических клеток.



Ферменты агрессии и инвазии:

нейраминидаза и **N-ацетилнейраминидаза** (играют роль диффузионного фактора; образуя местные очаги тканевых повреждений);

гиалуронидаза (разрушает остов соединительной ткани → повышение проницаемости кровеносных сосудов → выход плазмы за их пределы → отёк);

гемолизин (обуславливает развитие геморрагического синдрома);

фибринолизин (инвазия);

дермонекротоксин (некроз клеток).

Дифтерийный гистотоксин – мощный

экзотоксин, который проявляет все свойства экзотоксина : термолабильный, высокотоксичный, иммуногенный белок, нейтрализуемый антитоксической сывороткой, имеет инкубационный период действия, высаливается $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, адсорбируется на гидроокиси алюминия, теряет активность при 40°C и под действием 0,4 % раствора формалина.

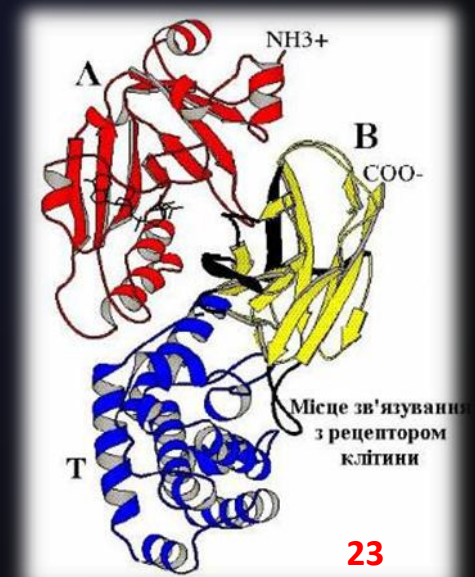
Синтезируется в виде единой полипептидной цепи (протоксина), А- и В-фрагменты которой соединены дисульфидными мостиками.



◆ Дифтерийный гистотоксин

- Фрагмент В отвечает за специфическое взаимодействие с ганглиозидными рецепторами клетки и участвует в образовании транспортного канала для фрагмента А.
- Активированный фрагмент А отвечает за токсичность.
- Компонент А, попав в цитозоль эукариотической клетки, становится недосягаемым для действия антитоксических антител, которые через мембрану клетки не проникают.
- Внутри пораженных клеток фрагмент А обладает ферментативной активностью (АДФ-рибозилтрансфераза)

- А – токсическая часть;
- В – фрагмент гистотоксина, обеспечивающий проникновение части А в клетку;
- Т – клеточный рецептор для дифтерийного токсина (его В-фрагмента).



- Блокада дифтерийным гистотоксином функциональной активности фермента трансферазы ведёт к **нарушению синтеза белка** на стадии элонгации и гибели клеток в результате некроза.
- Дифтерийный гистотоксин оказывает свое специфическое блокирующее воздействие на синтез белка в **клетках органов, наиболее интенсивно снабжаемых кровью**: ССС, миокард, периферическая и ЦНС, почки и надпочечники.

Заболевание вызывают **ТОЛЬКО ТОКСИГЕННЫЕ** штаммы *C. diphtheriae*.

Способность к токсинообразованию проявляют лишь лизогенные штаммы, содержащие в своем геноме **умеренный профаг**, несущий *tox*-ген, ответственный за синтез токсина.

Нетоксигенные штаммы не вызывают дифтерии, хотя способны длительно персистировать в респираторном тракте человека.

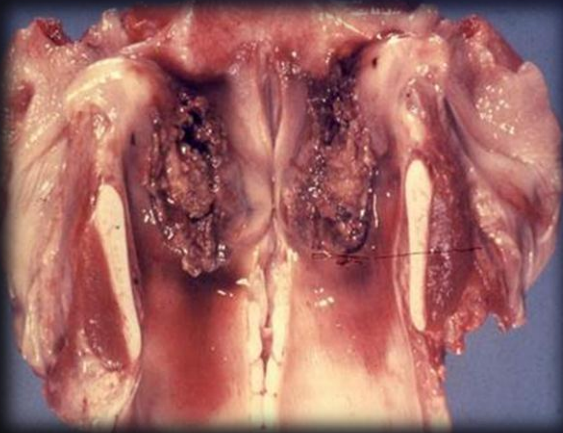
Патогенез поражений

- Входные ворота – слизистые оболочки носоглотки, иногда глаз, половых органов (у женщин), кожные покровы и раны.
- Начальным этапом инфекционного процесса является адгезия микроба в месте входных ворот инфекции и колонизация.
- Сам возбудитель остается на месте входных ворот инфекции, а патогенез и клиническая картина определены действием экзотоксина, который оказывает общее и местное действие.

Вышедший за пределы сосудов фибриноген плазмы, контактируя с тромбокиназой некротизированных клеток макроорганизма, превращается в **фибрин**, что и является **сущностью фибринозного воспаления**.

Патогенез

- Патоморфологическим проявлением взаимодействия макро- и микроорганизма при дифтерии является **фибринозное воспаление**.
- Этот вид воспаления характеризуется образованием экссудата, который по выходу из сосудов немедленно свертывается, в связи с чем выпадает фибрин.
- Фибринозное воспаление при дифтерии в зависимости от природы слизистых оболочек может быть **дифтеритическим** или **крупозным**.



Фибринозное воспаление при дифтерии



Дифтеритическое воспаление

на слизистых оболочках с многослойным плоским эпителием (ротоглотка, надгортанник, голосовые связки, некоторые отделы полости носа), все клетки которого прочно связаны как между собой, так и с подлежащей соединительнотканной основой. В этом случае фибринозная плёнка **плотно спаяна с подлежащей тканью** и не снимается тампоном при осмотре. При попытке сделать это слизистая кровоточит.

Поражение клеток обусловлено действием
токсина.

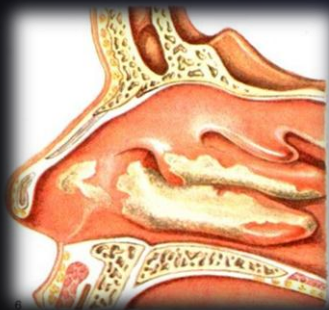
Грязно-белая пленка на мягком нёбе, классический признак дифтерии.



Крупозное воспаление

возникает при локализации процесса в дыхательных путях (гортань, трахея, бронхи), где слизистые оболочки содержат железы, выделяющие слизь и покрытые **однослойным цилиндрическим эпителием**. Здесь фибринозная пленка располагается поверхностно и легко отделяется от подлежащих тканей.

При распространении процесса из ротоглотки вниз по дыхательным путям в виде **нисходящего крупа** крупозное воспаление последовательно захватывает трахею и бронхиальное дерево до его мельчайших разветвлений, что ведет к развитию **истинного крупа** и **асфиксии**.



Дифтерия,
дифтеритическая ангина,
крупозный ларингит и
трахеит.





Дифтерия

Клинические проявления

Инкубационный период – 2-12 сут.

Клинические периоды дифтерии:

- ◆ период манифестных проявлений фибринозного процесса и ранних токсических поражений (первые 5-10 сут);
- ◆ период поздних токсических осложнений (не обязательный), с 10-12 сут до 6 нед;
- ◆ период реконвалесценции (2-3 мес после исчезновения проявлений).



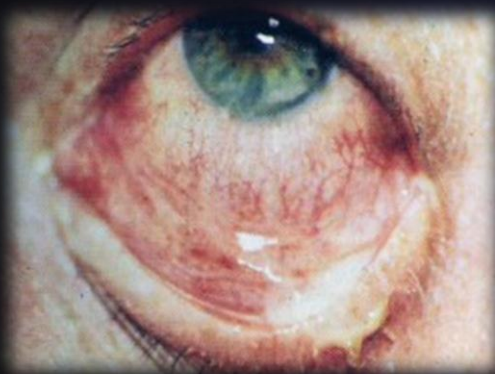
Формы дифтерии



Клинические проявления

В зависимости от локализации процесса выделяют поражения:

- ротоглотки (наиболее часто);
- дыхательных путей;
- носа;
- редкой локализации (глаза, наружные половые органы, кожа, раневые поверхности).



Иммунитет

После перенесенного заболевания формируется длительный и напряженный гуморальный **антитоксический иммунитет**.

Антибактериальный иммунитет ненапряженный, серовароспецифичный, в большой степени носит клеточно-опосредованный характер.

Наличие антитоксического иммунитета не препятствует формированию носительства токсигенных штаммов *C. diphtheriae*.

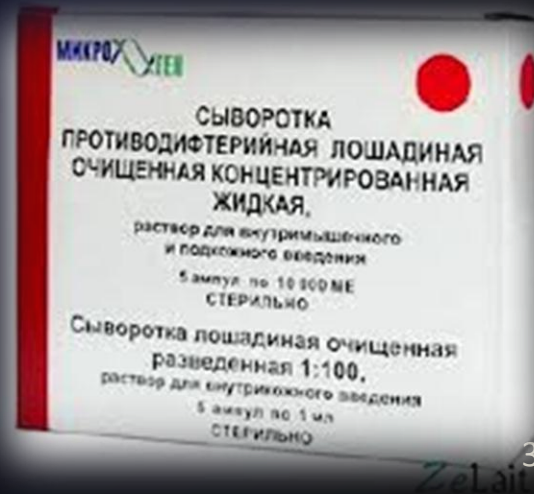


Препараты для профилактики и лечения:

- ◆ **Анатоксин** дифтерийно-столбнячный очищенный сорбированный на гидроокиси алюминия (АДС-анатоксин) – смесь очищенных дифтерийного и столбнячного анатоксинов для профилактики.
- ◆ **Анатоксин** дифтерийно-столбнячный очищенный, сорбированный на гидроокиси алюминия с уменьшенным содержанием антигена – для профилактики.
- ◆ **Сыворотка** противодифтерийная лошадиная очищенная, концентрированная жидкая – для лечения.

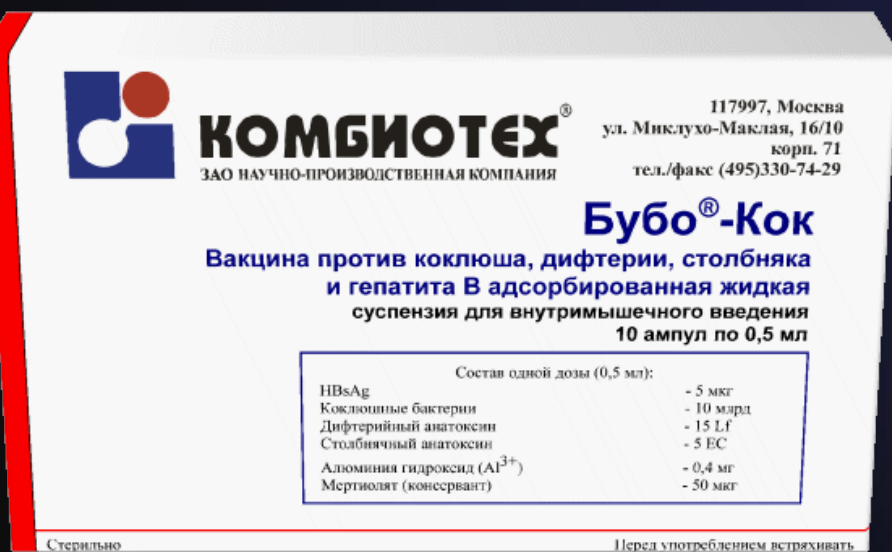


Один из первых пузырьков дифтерийного антитоксина (1895), произведённый Гигиенической Лабораторией Соединённых Штатов.



Препараты для профилактики и лечения:

■ **Вакцина** коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая (АКДС – вакцина) – смесь из взвеси убитых коклюшных микробов, очищенных дифтерийного и столбнячного анатоксинов, сорбированных на гидроокиси алюминия для специфической профилактики.



КОМБИОТЕХ®
ЗАО НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КОМПАНИЯ

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

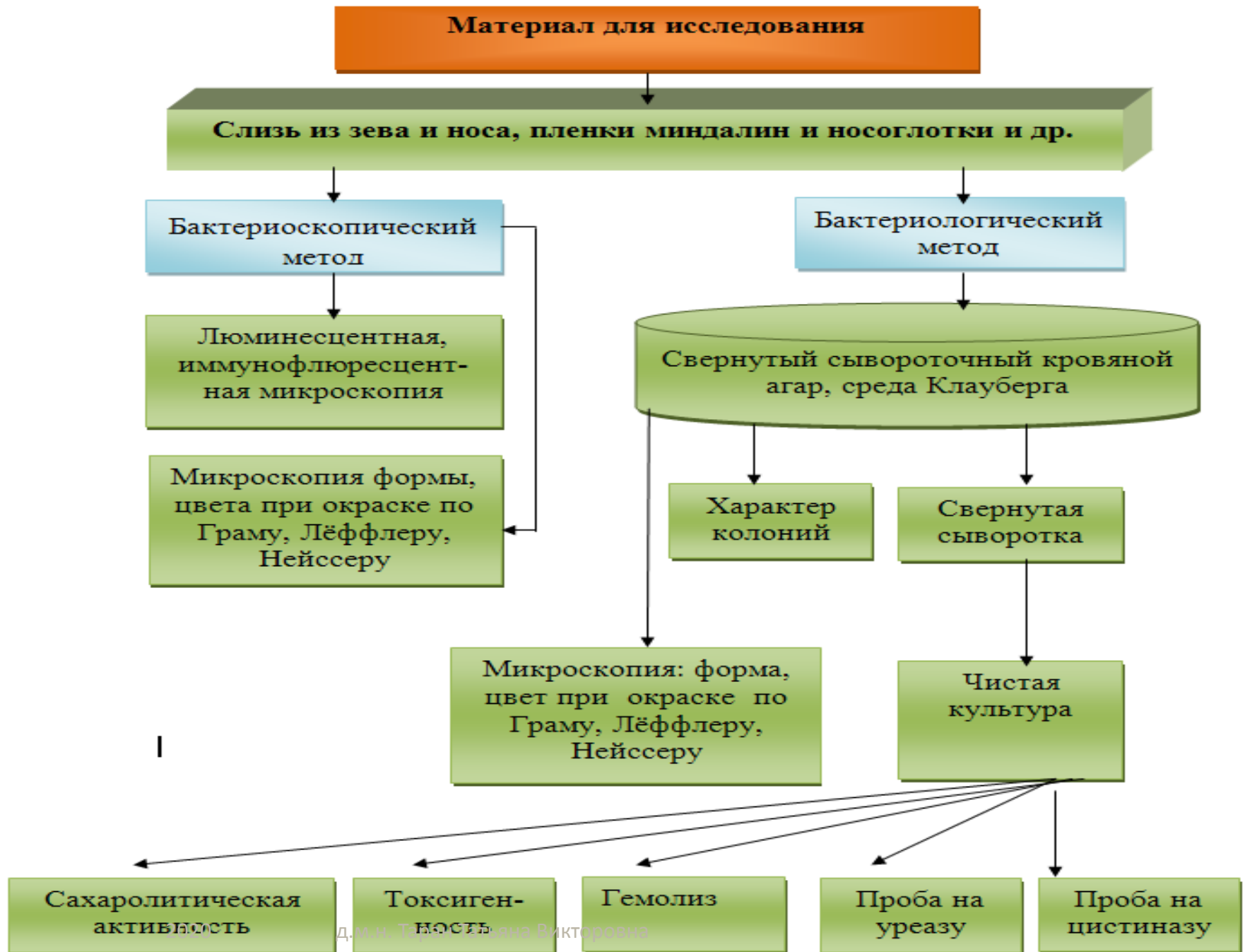
Бубо®-Кок
Вакцина против коклюша, дифтерии, столбняка и гепатита В адсорбированная жидкая суспензия для внутримышечного введения
10 ампул по 0,5 мл

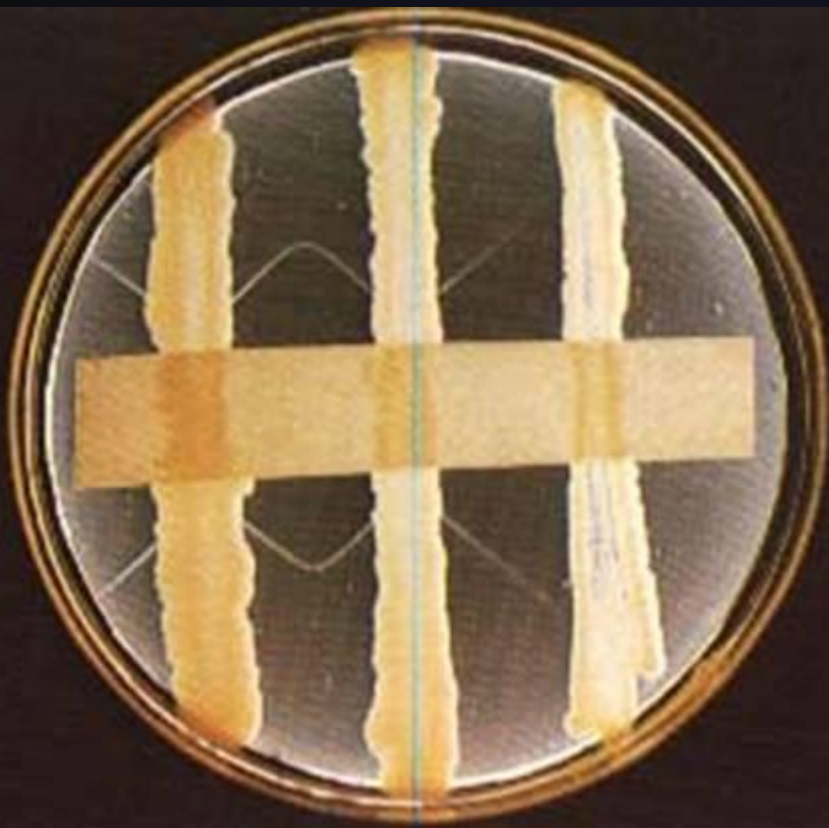
Состав одной дозы (0,5 мл):	
HBsAg	- 5 мкг
Коклюшные бактерии	- 10 млрд
Дифтерийный анатоксин	- 15 Лf
Столбнячный анатоксин	- 5 ЕС
Алюминия гидроксид (Al ³⁺)	- 0,4 мг
Мертиолят (консервант)	- 50 мкг

Стерильно
Перед употреблением встряхивать



ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ДИФТЕРИИ





Определение токсигенности *in vitro*. В его основе лежит **взаимодействие токсина с антитоксином** в агаровом геле. В местах оптимального количественного соотношения токсина и антитоксина в толще агара выпадает преципитат в виде тонких нежных белых линий ("стрелы", "усики").

Иммуносерология

Для ускоренного обнаружения дифтерийного гистотоксина, как в бактериальных культурах, так и в биологических жидкостях (сыворотка крови), применяют:

- ✿ **РА на стекле** – положительная только в 32,4 % случаев заболевания;
- ✿ **РПГА** – более чувствительная, положительная у 84,4 % больных. У 70 % больных в начале заболевания РПГА отрицательна или положительна в разведении 1:40 – 1:80, в последующем титры нарастают в 8-4000 раз;
- ✿ **РНГА** с антительным эритроцитарным диагностикумом;
- ✿ **РНА** (реакция нейтрализации антител) – о наличии токсина судят по эффекту предотвращения гемагглютинации;
- ✿ **РИА и ИФА.**
- ✿ Молекулярно-генетические методы – **ПЦР.**



Спасибо за внимание!

Corynebacterium spp.

