

## УКАЗАНИЯ ОТНОСНО МИКРОБИОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА НА ДИФТЕРИЯ

### ВЗИМАНЕ И ТРАНСПОРТ НА МАТЕРИАЛА ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

При съмнение за дихателна форма на дифтерия се изследва гърлен секрет и задължително носен секрет, тъй като заразноносителството е в носа. При взимането на гърления секрет с тампона се обтриват всички видими лезии. Ако има мембрани, те се „подкъртват“ и материалът се взима с умерен натиск в дълбочина на границата между мембраната и здравана тъкан. Носен секрет се взима от долната третина на носния канал с обтриване с тампона на лигавицата с въртеливи движения.

При съмнение за кожна форма на дифтерия раната се намокря със стерилен физиологичен разтвор, корустите се отстраняват, взима се ранев секрет в дълбочина и задължително носен секрет.

При по-редките форми на дифтерия се взимат съответните конюнктивален, ушен, вагинален секрет и задължително носен секрет.

При наличие на мембрани, при възможност да бъдат безопасно отрязани без кървене, те също се взимат и се изпращат за изследване.

Секретите се взимат със сух стерилен памучен или дакронов тампон, поставят се в контейнер (стерилна епруветка) и се посяват на хранителните среди до два часа от взимането им. Ако се предвижда, че това условие няма да бъде спазено, тогава тампонът се поставя в епруветка с транспортна среда на Стюарт или Амиес, което дава възможност за транспорт до 48 часа на температура от 4 - 8°C. Дифтерийните бактерии са сравнително устойчиви на температурни промени и изсушаване.

### ПОСЯВКА НА ХРАНИТЕЛНИТЕ СРЕДИ

Ако тампона не е бил тоставян в транспортна среда, той е добре да бъде овлажнен с 3-4 капки хранителен бульон преди да бъде посят на хранителните среди. Всеки материал се посява на по едно петри неселективна и селективна среда, като се спазва реда първо неселективната, след това същият тампон на селективната среда:

Като неселективна среда се използва кръвен агар.

Като селективна среда се използва телуритен агар. Телуритните агари биват кръвно-телуритни (Клауберг, Хойл и др.) и серумно-телуритни (Тинсдейл и др.). СЗО препоръчва да се използва кръвно-телуритната среда на Хойл, а при финансова възможност на лабораторията, може да се използва допълнително и серумно-телуритната среда на Тинсдейл.

**ВАЖНО!** България не произвежда селективна среда за дифтерийни бактерии. Затова всяка микробиологична лаборатория трябва предварително да уговори доставка на такава среда (разлята в петри) от някоя от фирмите, доставчици на хранителни среди, както сме постъпили в НЦЗПБ.

Посявките се култивират в аеробна атмосфера на 37°C до 48ия час в аеробна атмосфера, като се прави преглед за съмнителни колонии на 24ти и на 48ми час. Ако няма растеж до 48 часа, посявката се отчита като отрицателна.

На селективната телуритна среда coloniите на дифтерийните бактерии са черни. **ВАЖНО!** На тази среда растат и дифтероиди, така че докато не се направи биохимична идентификация, не може да се каже дали растат дифтерийни бактерии или непатогенни дифтероиди, или коринеформни бактерии. Изключение прави серумно-телуритната среда на Тинсдейл, която съдържа цистин. Само дифтерийните бактерии (*Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*) имат ензима цистиназа, който разгражда цистина, което се визуализира с кафеникаво хало около coloniите и в гъстата посявка. Непатогенните дифтероиди и коринеформните бактерии нямат ензима цистиназа, съответно не образуват хало.

Съществуват четири морфотипа *Corynebacterium diphtheriae*: *gravis*, *mitis*, *belfanti*, *intermedius*. Разликата във вида на coloniите е видна само на телуритна среда, не и на кръвен агар. Coloniите на тип *gravis* са в R форма с цвят на маргаритка; coloniите на типове *mitis* и *belfanti* са в S форма като яйца на очи; coloniите на тип *intermedius* са много дребни като връх на топлийка. Обаче, същият вид имат и coloniите на *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* – най-често изолирания непатогенен дифтероид от носен секрет на здрави хора!

**ВАЖНО!** На телуритната среда могат да пораснат и щамове *Saphylococcus aureus*, но техните coloniи са по-мазни; могат да пораснат и дрожди, но техните coloniи са по-светли (сивеят). Могат да пораснат и щамове коагулаза-отрицателни стафилококи, бета-хемолитични стрептококи, зеленеещи стрептококи. Затова, докато не се направи микроскопски препарат по Грам от съмнителните coloniи, не можем да бъдем сигурни дали растат коки или коринебактерии.

На кръвен агар coloniите на коринебактериите са неразличими от тези на коагулаза-отрицателните стафилококи и все пак стафилококовите coloniи са по-мазни, с блясък, докато coloniите на коринебактериите са сухи, без блясък.

**ВАЖНО!** Препоръчва се ако има растеж на селективната телуритна среда, да се вземат по 10 единични coloniи от всеки морфотип (10 дребни, 10 едри и т.н.), да се изолират на чиста култура и на другия ден да се проверят с микроскопски препарат по Грам. Коринебактериите имат характерен вид на пръснати карфици. Разполагат се предимно по двойки под ъгъл като буквите V и L. За дифтерийните бактерии *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis* е характерен полиморфизъм (коковидни клетки, къси клетки и дълги клетки) и полихромазия (склонност към обезцветяване и багрене в червено).

## БИОХИМИЧНА ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Следва биохимична идентификация на всички Грам-положителни пръчици. Ние препоръчваме да се използват мануалните галерии API Coryne, според нашия опит те дават много добра идентификация, разбира се препоръчват се и апаратни методи. При

използване на MALDI-TOF MS е важно преди накапване на матрица, пробата да се закапва с мравчена киселина, заради съдържанието на миколови киселини със средно-дълги вериги в клетъчната стена на коринебактериите.

**Всяка микробиологична лаборатория трябва да може да изолира и идентифицира дифтерийни бактерии (*Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*).**

**Всички изолирани дифтерийни бактерии се изпращат в НЦЗПБ за изследване за токсигенност.**

## ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТОКСИГЕННОСТ

Всички щамове, идентифицирани като *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis* подлежат на изследване за токсигенност. Прилага се метод real-time PCR за детекция на *tox* ген, който кодира продукцията на дифтериен токсин. Метода се провежда в НРЛ Молекулярна микробиология на НЦЗПБ. Резултатът може да бъде готов в рамките на 24 часа от получаване на материала.

## ОПРЕДЕЛЯНЕ НА НИВО НА АНТИТЕЛА СРЕЩУ ДИФТЕРИЕН ТОКСИН

Това изследване няма диагностична стойност. То е полезно при епидемиологични проучвания за определяне на имунния статус на населението или на отделен човек след ваксинация. В България няма лаборатория, която провежда такова изследване. Резултати от минали проучвания на екип от БулБио-НЦЗПБ от началото на века са показали, че с напредване на възрастта имунната защита спада. Това е наложило въвеждане на бустерна доза Тетадиф на 35-годишните и в последствие на всички възрастни през период от 10 години.