

**МИНИСТЕРСТВО ОБОРОНЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ГЛАВНОЕ ВОЕННО-МЕДИЦИНСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ**

# **ДИФТЕРИЯ**

**(МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО КЛИНИКЕ,  
ДИАГНОСТИКЕ, ЛЕЧЕНИЮ И  
ПРОФИЛАКТИКЕ В ВООРУЖЕННЫХ СИЛАХ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ)**

*Утверждены Начальником Главного Военно-медицинского  
управления МО РФ*

**МОСКВА**

**1998**

В подготовке методических указаний участвовали профессора Ю.В.Лобзин, Ю.И.Ляшенко, П.И.Огарков, кандидаты медицинских наук В.В.Васильев, А.Б.Белов, А.К.Казаков, В.В.Акользин; М.Е.Земсков.

Указания предназначены для войсковых врачей и военно-медицинских специалистов — инфекционистов, терапевтов, эпидемиологов и бактериологов.

## ВВЕДЕНИЕ

Дифтерия - это антропоноз с аэрозольным механизмом передачи, вызываемый токсигенными для человека коринебактериями.

Клинически дифтерия представляет собой острое инфекционное заболевание, характеризующееся токсическим поражением организма, преимущественно сердечно-сосудистой, нервной систем и надпочечников, а также воспалительным процессом с фибринозным налетом, локализующимся в месте входных ворот инфекции.

В прошлом дифтерия являлась неуправляемой инфекцией и вызывала в основном заболевания у детей. С введением в практику здравоохранения массовой иммунопрофилактики анатоксинами был достигнут значительный успех в борьбе с дифтерией: заболеваемость населения (главным образом детей и подростков) снизилась в сотни и даже тысячи раз. Однако несовершенство схем иммунизации и недостаточный охват прививками детей и подростков при потере эпидемиологической настороженности практическими врачами в 70-80-е годы двадцатого столетия почти повсеместно привел к активизации эпидемического процесса и “повзроslению” дифтерии. Это проявилось в резком увеличении заболеваемости населения (в том числе взрослого, включая военнослужащих), что потребовало усиления противоэпидемических мероприятий, а также изменения календаря и схем прививок анатоксинами. В связи с эпидемической ситуацией, прививки теперь проводятся многократно вплоть до 56 лет. По мере увеличения охвата населения прививками и достижения критериев ВОЗ (охват прививками 95% детей и подростков при иммунологической защите их не ниже 90%, а взрослых - не ниже 70%), заболеваемость должна снизиться до спорадического уровня. Это позволит в последующем адаптировать схемы вакцинации к результатам иммунологического скрининга населения в рамках эпидемиологического надзора за дифтерией,

система которого внедряется сейчас в здравоохранении страны. Окончательные переход на дифференцированную (групповую и индивидуализированную) иммунопрофилактику при иммунологическом контроле будет возможен лишь при достижении стойкого благополучия и элиминации дифтерии как местной нозологической формы, хотя риск заноса этой инфекции из неблагополучных стран (регионов) еще будет оставаться длительное время.

Наличие здорового носительства токсигенных штаммов дифтерийных палочек, а также воздушно-капельный механизм их передачи обуславливают сравнительно быстрое инфицирование большого числа людей и могут способствовать, в случае снижения или утраты иммунитета, возникновению групповых заболеваний дифтерией.

При дифтерии поражаются практически все органы и системы, но больше всего - сердечно-сосудистая, центральная и периферическая нервная системы, надпочечники. Сравнительно быстрое возникновение в них необратимых и часто несовместимых с жизнью изменений делает особенно важной раннюю диагностику болезни и своевременную (неотложную) терапию.

Наиболее часто ошибки в диагностике дифтерии связаны со сходством клинической симптоматики дифтерии зева и различных клинических форм ангины и паратонзиллита (перитонзиллярного абсцесса). Вместе с тем, правильная оценка клинических проявлений, учет эпидемической обстановки позволяют в большинстве случаев определить правильный диагноз болезни и проводить необходимую терапию.

Важной предпосылкой успешной борьбы с дифтерией является знание врачами клинической картины различных форм заболевания, особенностей его течения, принципов диагностики, особенно ранней, неотложной помощи, терапии и профилактики.

## КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ЭТИОЛОГИИ И ПАТОГЕНЕЗЕ ДИФТЕРИИ

Возбудителем дифтерии являются дифтерийные палочки - *Corynebacterium diphtheriae* (буквально - «булавовидные палочки мембраны»). Патогенные представители многочисленного рода *Corynebacterium* вызывают инфекцию только у человека и некоторых домашних животных, и могут быть обнаружены как у больных, так и у здоровых бактерионосителей. Клинические проявления дифтерии вызывают только продуцирующие токсин *C. diphtheriae*, однако нетоксигенные штаммы дифтерийных палочек также могут явиться причиной легких форм фарингита и тонзиллита. Такие случаи требуют особого внимания, поскольку определение токсигенности методом диффузии в агаровом геле не всегда достаточно надежно. Кроме того, токсигенные и нетоксигенные варианты одного штамма могут выделяться одновременно у одного больного. Следует иметь в виду и то, что некоторые патогены, в частности вирус Эпштейн-Барр, гемолитические стрептококки, спирохеты и фузиформные бактерии при ангине Симановского-Венсана, могут вызывать образование дифтериеподобных пленок.

С видом *C. diphtheriae* генетически близко связаны виды *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* (ранее - *C. ovis*). Инфекция данными микроорганизмами чаще связана с употреблением сырого молока или наличием прямого контакта с лошадьми, коровами и овцами.

*Corynebacterium ulcerans* чаще изолируется при фарингитах, но иногда токсигенные *C. ulcerans* вызывают заболевание, клинически сходное с дифтерией.

*Corynebacterium pseudotuberculosis* редко вызывают инфекцию у человека, при этом на сегодняшний день ни в одном из зарегистрированных случаев не были выделены токсигенные штаммы от больных людей. Заболевание обычно представляет собой грануломатоз с некротизирующим лимфаденитом аксиллярной и шейной областей.

Множество других представителей рода *Corynebacterium* и коринеформных бактерий (по отношению к ним нередко используют термин «дифтероиды») являются нормальными обитателями слизистых и кожи. Однако в последние годы они все чаще оказываются причастными к различным оппортунистическим инфекциям (эндокардиты, артриты, уретриты, септицемия и т.д.) у больных с иммунодефицитом. Среди дифтероидов наиболее широко распространены *C. xerosis*, *C. pseudodiphthericum* (*C. hofmannii*), *C. striatum*, и умение выделять их служит критерием качества работы бактериологов в межэпидемический период.

Бактерии рода *Corynebacterium* являются грамположительными палочками, не образующими спор, обладающими различной степенью плеоморфизма (разнообразие форм) и характерным расположением клеток в виде римских цифр V и X. Большинство видов лучше растет в аэробных условиях.

Клетки *C. diphtheriae* и некоторых видов дифтероидов часто окрашиваются неравномерно вследствие присутствия в цитоплазме гранул волютина (скопление полифосфата). Окраска основным красителем, например, метиленовой синью позволяет выявить метахроматический эффект, т.е. волютин приобретает розовую или рубиновую окраску при обработке синим красителем. Окраска по Граму нецелесообразна, поскольку многие коринебактерии в мазках выглядят грамвариабельными или даже грамотрицательными.

*C. ulcerans* и *C. hofmannii* часто имеют овоидную форму клеток, которые склонны к параллельному взаимному расположению.

Коринебактерии, циркулирующие среди людей, неоднородны по антигенной структуре. Эта неоднородность проявляется в наличии культурально-биохимических вариантов, серотипов (их количество еще уточняется), фаговаров, корицинов и других внехромосомных мобильных образований бактериальной клетки. Однако вышеуказанные различия не коррелируют со способностью бактерий продуцировать экзотоксин и со степенью токсинообразования. Экзотоксин, являясь основным патогенетическим элементом в этиологии дифтерии как манифестной формы, не связан с механизмами выживания вида *C. diphtheriae*.

Различают три культурально-биохимических варианта (биотипа) *C. diphtheriae*, а именно, *gravis*, *intermedius* и *mitis*. Через 48-72 часа роста тип *gravis* образует обычно матовые, выпуклые, с радиальной исчерченностью и приподнятым центром колонии, диаметром 2-3 мм; тип *mitis* имеет гладкие, выпуклые колонии диаметром 1-2 мм с небольшой зоной  $\beta$ -гемолиза; *intermedius* - мелкие, диаметром 0,5-1 мм, плоские, гладкие.

Идентифицировать коринебактерии на основании морфологии клеток, тинкториальных и культуральных свойств невозможно. Поэтому при установлении видовой принадлежности выделенного микроба необходимо использовать комплекс тестов и методов, и, в первую очередь, по возможности в минимальные сроки определить его патогенность, т.е. в данном случае способность вызывать генерализованную токсемию, размножаясь в области входных ворот инфекции. Другими словами, необходимо определить основной признак *C. diphtheriae* как возбудителя - способность продуцировать экзотоксин.

Дифтерийный токсин по своей природе представляет собой белковую молекулу, состоящую из одной полипептидной цепи, в которой выделяют два фрагмента, имеющие буквенные обозначения А и В. Один из них (фрагмент В) специфически взаимодействует с рецепторами чувствительных клеток тканей организма и способствует проникновению другого в цитоплазму клеток. А-фрагмент нарушает синтез белка, что в конечном итоге ведет клетку к гибели.

Токсигенность дифтерийных коринебактерий контролируется генами умеренных фагов, и синтез токсина является следствием фаговой конверсии лизогенных бактериальных клеток. Существует несколько умеренных коринифагов с генами *tox*<sup>+</sup>. Конверсия нетоксигенных штаммов коринебактерий дифтерии в токсигенные и обратно легко воспроизводится в экспериментальных условиях *in vitro*. Хотя это явление убедительно не подтверждено конкретными микробиологическими исследованиями в реальном эпидемическом процессе, эпидемиологическая интерпретация на базе самых современных и высокочувствительных методов лабораторных исследований (ИФА, ПЦР и др.) позволяет считать ее весьма вероятной. С этих позиций становится ясно, что

если ликвидации манифестных форм дифтерии в принципе возможна, то ликвидация вида возбудителя не реальна, ибо сохранение его обеспечивается широкой циркуляцией нетоксигенных коринебактерий, потенциально способных продуцировать экзотоксин при фазовых сдвигах в паразитарные системы «бактерия-фаг-tox+» при участии факторов восприимчивости хозяина. Поэтому риск манифестации остается, так как при отсутствии естественно стимулированного антитоксического иммунитета эпидемическое благополучие зависит не только от степени охвата населения прививками но и иммунологической эффективности вакцин, при том что 5-10% населения в современных условиях неадекватно реагируют на введение анатоксинов, а до 1% населения являются бактерионосителями.

В клинической практике, в случаях, когда при первичном обследовании выделяются токсигенные варианты *C. diphtheriae*, а на фоне антибактериальной терапии при повторных обследованиях - нетоксигенные, следует предполагать исчезновение токсигенных штаммов, как более чувствительных к действию антибиотиков, и нельзя трактовать такие случаи как потерю способности штаммов продуцировать токсин.

Возбудитель дифтерии считается относительно устойчивым к воздействию средовых факторов. Особенно хорошо коринебактерии переносят отрицательную температуру и высушивание. Так, при комнатной температуре возбудитель в сухой дифтерийной пленке сохраняет свою жизнеспособность до 7 месяцев, в пыли - 5 недель, в воде и молоке - 6 и 20 дней соответственно, в трупах 10-15 дней. Дезинфекционные средства и нагревание свыше 60<sup>0</sup>С убивают коринебактерии в течение 5-10 минут, однако устойчивость их возрастает в условиях повышенной влажности, низкой температуры, белковой защиты (в выделениях) , поэтому дезинфекция является важным противоэпидемическим мероприятием. Объем и порядок дезинфекции в эпидемическом очаге регламентируется специальной инструкцией (приложение 2).

## ПАТОГЕНЕЗ



Входными воротами при дифтерии чаще всего является слизистая оболочка ротоглотки, реже - гортани или носа и, крайне редко, конъюнктив, кожа, раневая поверхность и слизистые оболочки половых органов.

Дифтерийные палочки фиксируются в тканях в области ворот инфекции. Здесь они размножаются и продуцируют экзотоксин.

Считается, что обладающие антитоксическим противодифтерийным иммунитетом люди дифтерией не болеют. Вместе с тем, установлено, что абсолютной защищенности от этой инфекции практически не бывает. При содержании в крови 0,01-0,03 АЕ/мл антитоксина не развивается тяжелая форма дифтерии, при 0,04-0,12 АЕ/мл - может быть только легкая форма патологического процесса, а при более высоком уровне антител инфекционный процесс протекает в латентной форме или в виде бактерионосительства.

Дифтерийный экзотоксин распространяется в организме преимущественно контактным путем (по соединительным тканям). Сами же дифтерийные палочки, как правило, за пределы ворот инфекции не проникают.

Дифтерийный токсин состоит из 4 фракций. Первая - это первично-некротизирующий фактор (некротоксин). Он вызывает на месте ворот инфекции некроз эпителия.

Вторая фракция токсина - гиалуронидаза. Обладает способностью разрушать гиалуроновую кислоту, являющуюся остовом соединительной ткани человеческого организма. Под ее воздействием резко повышается проницаемость сосудов. В результате происходит экссудация плазмы крови в окружающие ткани. Содержащийся в плазме фибриноген при контакте с тромбокиназой некротизированного эпителия превращается в фибрин, образуя фибринную пленку. Поэтому, на участках, покрытых многослойным плоским эпителием (слизистая ротоглотки), возникает дифтеритическая пленка, плотно связанная с подлежащей тканью. На слизистых оболочках, покрытых однослойным эпителием (гортань, трахея, бронхи и др.), развивается крупозное воспаление, при котором пленка легко отделяется от подлежащих тканей.

Третья фракция - гемолизирующий фактор. Играет определенную роль в патогенезе дифтерии только при геморрагической форме заболевания.

Четвертая фракция дифтерийного токсина - собственно дифтерийный токсин (основной его компонент) представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 597 аминокислотных остатков. Он относится к сильнодействующим веществам и по степени токсичности уступает только ботулотоксину. Минимальная летальная доза для человека составляет 100 нг. Истинный дифтерийный токсин обладает способностью конкурировать с цитохромом В (ферментом, участвующим в процессах клеточного дыхания). Проникая в клетки тканей человеческого организма, токсин вытесняет цитохром В, но его функцию не выполняет. В результате блокируются процессы клеточного дыхания и синтеза белка, что ведет к гибели клетки. Больше всего от этого страдают нервно-мышечный аппарат сердца, периферические нервы и надпочечники. Наряду с отмеченным, дифтерийный токсин является сосудистым ядом и вызывает выраженные дистонические и дисциркуляторные нарушения в капиллярах тканей организма.

Таким образом, патогенность дифтерийных палочек связана с их способностью продуцировать экзотоксин. Клиника же заболевания, наряду с состоянием противодифтерийного иммунитета, определяется степенью токсичности возбудителя и локализацией местного патологического процесса.

## КЛИНИКА ДИФТЕРИИ

Классификация. В зависимости от локализации местного воспалительного процесса различают дифтерию зева, носа, гортани, глаз, кожи, раны, уха, наружных половых органов и другой локализации. Кроме того, выделяют отдельно комбинированную форму, протекающую с поражением двух и более анатомически отдаленных органов. У взрослых в подавляющем большинстве случаев наблюдается дифтерия зева, реже - другие формы заболевания. Удельный вес дифтерии зева при спорадической заболеваемости составляет 90%, а при эпидемической - достигает 99%. В условиях военных действий увеличивается заболеваемость дифтерией раны и кожи.

Различают типичные и атипичные формы дифтерии. Типичные случаи заболевания сопровождаются фибринозным характером воспаления (с образованием фибриновой пленки), а атипичные - катаральным (без налета). При типичной дифтерии различают локализованные и распространенные формы заболевания. При локализованной дифтерии фибринозный налет ограничивается поверхностью пораженного органа, а при распространенной - распространяется за его пределы (например, с миндалин - на небные дужки, заднюю стенку глотки, носоглотку или гортань и др.). Отдельно выделяют токсическую дифтерию. Она возникает при поступлении в организм очень большого количества дифтерийного токсина и сопровождается выраженным токсическим поражением организма, преимущественно сердечно-сосудистой и нервной систем, надпочечников, а также токсическим отеком подкожной клетчатки вокруг патологического очага. Она может наблюдаться при любой локализации воспалительного процесса, кроме дифтерии гортани.

## ДИФТЕРИЯ ЗЕВА

Классификация дифтерии зева представлена в таблице 1. Клиническая картина заболевания характеризуется лихорадкой, интоксикацией и местными воспалительными изменениями небных миндалин.

### Классификация дифтерии

Таблица 1

По характеру воспалительного процесса	По распространенности налетов	По выраженности токсического синдрома
Атипичная (катаральная)	-	-
Типичная (с фибринозным налетом)	1. Локализованная: а) островчатая б) пленчатая 2. Распространенная	Токсическая:  а) субтоксическая б) токсическая I степени в) токсическая II степени г) токсическая III степени д) гипертоксическая е) геморрагическая

Особенностью лихорадки при дифтерии является ее кратковременный характер. Даже при токсической форме заболевания повышенная температура тела в большинстве случаев наблюдается всего лишь 3-5 дней, несмотря на то, что местные воспалительные явления сохраняются довольно длительное время. Интоксикация при дифтерии, в отличие от других инфекционных заболеваний, проявляется вялостью, сонливостью, адинамией, бледностью кожи и не сопровождается выраженным ознобом, сильной головной болью, ломотой в теле.

Особенностью местного воспалительного процесса при дифтерии зева является неяркая гиперемия с синюшным оттенком, выраженный отек, наличие

пленчатого налета (при типичной форме) на поверхности пораженных миндалин, а также незначительная выраженность болевых ощущений в горле при глотании и углочелюстных лимфоузлов при их пальпации. Отек тканей, как правило, соответствует тяжести заболевания. Налет всегда выступает над поверхностью слизистой оболочки («плюс ткань»), имеет белый цвет (вид свернувшегося яичного белка) с перламутровым блеском, а с 3-4 дня - грязно-серый или желтовато-серый цвет (при пропитывании кровью он становится коричневым), плотно спаян с тканями и имеет тенденцию к распространению на соседние участки тканей. Его снять можно только при помощи пинцета. На месте снятого налета остается кровоточащий дефект слизистой. Снятая пленка не растирается шпателями, при погружении в воду тонет, не растворяется и не изменяет своей формы.

Вместе с тем, при дифтерии зева у взрослых налет не всегда бывает типичным. Он часто исходит из лакун миндалин и этим напоминает лакунарную ангину. У 1/3 больных он снимается легко, не оставляя дефекта ткани и не появляется снова. Однако и в этих случаях наблюдаются многие признаки характерные для дифтерии. Это - особенности проявлений общей интоксикации, несоответствие болевого синдрома выраженности воспалительных изменений в ротоглотке, застойно-синюшный оттенок гиперемии пораженных тканей, выраженный их отек, выступание налета над поверхностью слизистой («плюс ткань»), плотность налета, способность тонуть при погружении в воду.

Патологический процесс при дифтерии зева сопровождается также поражением регионарных (углочелюстных) лимфатических узлов. Они увеличены в размерах, эластичны, не спаяны между собой и кожей, умеренно болезненны. При тяжелых (токсических) формах заболевания вокруг лимфатических узлов развивается отек подкожной клетчатки.

Картина крови при дифтерии характеризуется нейтрофильным лейкоцитозом со сдвигом формулы влево и повышенными показателями СОЭ.

Катаральная дифтерия зева. Встречается у 20-25% больных дифтерией зева. Первыми признаками заболевания являются субфебрильная температура тела,

неловкость или незначительная болезненность при глотании, умеренно выраженная гиперемия миндалин и увеличение до 0,5-1,0 см углочелюстных лимфоузлов (при отсутствии их болезненности). Со 2-3-го дня с момента заболевания температура тела нормализуется. Самочувствие больных, как и раньше, не ухудшается. Однако по-прежнему сохраняются незначительная боль в горле при глотании, гиперемия миндалин, увеличение (до 1 см в диаметре) и практически полная безболезненность углочелюстных лимфатических узлов. При отсутствии специфического лечения в редких случаях заболевание может прогрессировать и переходить в более тяжелую форму. Длительность болезни 3-5 дней.

Локализованная дифтерия зева (60-65%). Протекает в виде островчатой и пленчатой форм заболевания. При островчатой - налет на небных миндалинах состоит из островков размерами 3-5 мм в диаметре, а при пленчатой - занимает более обширные участки.

Островчатая дифтерия зева (40-45%) начинается постепенно. Температура тела повышается умеренно (до 37,5-38,0 градусов). Появляется небольшая общая слабость и тяжесть в голове, возникает незначительная боль в горле при глотании. На миндалинах образуются налеты, увеличиваются углочелюстные лимфатические узлы. Налеты вначале с одной стороны, а затем - двухсторонние, в первые сутки - тонкие и имеют вид паутины серо-белого цвета, легко снимаются, не оставляя после себя дефекта ткани. На их месте быстро появляются новые налеты, которые с каждым часом принимают все более плотную консистенцию. Примерно через сутки они уже имеют вид возвышающейся над тканями пленки белого цвета. Налеты бывают единичными или множественными и располагаются на внутренней или наружной поверхности миндалин. В первые два дня заболевания вокруг налетов наблюдают венчики гиперемии, которые в последующем распространяются на всю поверхность миндалин. Углочелюстные лимфатические узлы увеличены до 1 см в диаметре и при этом незначительно болезненные.

Пленчатая дифтерия зева (18-20%) может начинаться как постепенно, так и остро. Постепенное начало наблюдается при развитии пленчатой формы болезни из островчатой дифтерии. При этом начальный период болезни соответствует клинической картине, характерной для островчатой формы дифтерии зева. В случаях, когда болезнь с самого начала развивается как пленчатая дифтерия, температура тела в течение одних суток достигает 38,5 градусов, появляются умеренно выраженная общая слабость, тупая головная боль без определенной локализации и сравнительно несильная боль в горле при глотании. При осмотре ротоглотки наблюдаются неяркая гиперемия миндалин, небных дужек и мягкого неба, умеренный отек тканей миндалин и наличие на их поверхности обширных участков, покрытых налетом (вначале нежным, паутинообразным, а через сутки - пленчатым, имеющим плотную консистенцию и спаянным с тканями), а также увеличение до 1,5 см и умеренная болезненность углочелюстных лимфатических узлов.

При локализованной дифтерии зева температура тела нормализуется на 2-4-е сутки заболевания. Вместе с тем, после нормализации температуры не только не отмечается тенденции к выздоровлению, но даже наблюдается дальнейшее развитие болезни. У больных сохраняются общая слабость, тяжесть в голове, снижение аппетита, умеренная боль в горле при глотании. При островчатой дифтерии гиперемия с участков, окружающих налеты, распространяется на всю поверхность миндалин. Увеличиваются размеры налетов. Одновременно выявляется выраженный отек миндалин, который, как правило, является асимметричным (больше выражен на той миндалине, где больше площадь налета). Гиперемия пораженных тканей ротоглотки приобретает синюшный оттенок. Начиная с 3-го дня налеты на миндалинах тускнеют и приобретают серовато-белую окраску. Углочелюстные лимфатические узлы увеличиваются до 2 - 2,5 см в диаметре и остаются малоболезненными. Общая продолжительность заболевания не превышает 7 суток.

Распространенная дифтерия зева (8-10%). Может начинаться как остро, так и постепенно. При остром начале клиническая картина развивается в течение 1-

1,5 суток. Внезапно повышается температура тела (до 38-39,0 градусов) и появляется интоксикация, проявляющаяся общей слабостью, тупой головной болью, вялостью, сонливостью. Появляются признаки тонзиллита, характеризующегося гиперемией миндалин, небных дужек, язычка мягкого неба, а также сплошными пленчатыми налетами на миндалинах. Налеты через 1-2 дня распространяются за пределы этих органов. На миндалинах они вначале тонкие, нежные, серовато-белого цвета, полупрозрачные, легко снимаются, не оставляя после себя дефекта тканей. Через 12-24 часа налеты становятся пленчатыми и плотно спаянными с тканями. Спустя 1-2 суток они распространяются за пределы миндалин (на небные дужки, язычок, заднюю стенку глотки, а иногда и на твердое и мягкое небо). Одновременно увеличивается отек пораженных тканей ротоглотки, который более выражен с той стороны, где больше площадь налетов. У этих больных гиперемия миндалин быстро принимает застойно-синюшный оттенок. Углочелюстные лимфатические узлы достигают 3 см в диаметре и остаются малобольными.

При благоприятном течении заболевания его продолжительность составляет 6-8 суток.

Токсическая дифтерия зева (8-10%). Начинается чаще остро и характеризуется быстрым развитием всех симптомов болезни. Состояние больных тяжелое. Наблюдается выраженная интоксикация, проявляющаяся головной болью, головокружением, анорексией, рвотой и сухостью во рту, адинамией, сонливостью. Поражение ротоглотки в первые 1-2 дня заболевания проявляется сравнительно небольшой болью в горле при глотании, застойно-синюшного цвета гиперемией и отеком миндалин.

При субтоксической дифтерии зева воспалительный процесс в ротоглотке носит односторонний характер: одностороннее поражение небных миндалин, небных дужек, углочелюстных лимфоузлов. При токсической дифтерии зева изменения имеются с обеих сторон. При этом отек миндалин уже с первого дня настолько выражен, что они смыкаются и не представляется возможным рассмотреть их боковые поверхности. Углочелюстные лимфоузлы достигают 2-3



см в диаметре и больше и, в отличие от локализованных форм заболевания, болезненны. Очень рано вокруг них развивается отек подкожной клетчатки.

Налеты на миндалинах появляются в первые-вторые сутки. Вначале они, как и при других формах данного заболевания, нежные, тонкие, серовато-белого цвета, легко снимаются, не оставляя после себя дефекта тканей. На 2-3-и сутки они становятся плотными, приобретают белый цвет с перламутровым отливом, плотно спаяны с тканями и выступают над ними. Однако из-за отека ротоглотки их нелегко обнаружить. Для этого необходимо нажать шпателем на корень языка, что вызывает рвотное движение, во время которого миндалины как бы выворачиваются и становятся доступными для осмотра. При остром развитии токсических форм дифтерии налеты распространяются с миндалин на другие участки слизистой ротоглотки на 2-3-й день болезни. При токсической дифтерии зева, возникшей из локализованной или распространенной, налет уже с первого дня покрывает не только миндалины, но и другие ткани ротоглотки. При этом он имеет не белый, а грязно-серый цвет.

Течение токсической дифтерии характеризуется относительно быстрым нарастанием общих и местных проявлений болезни. Усиливаются сонливость, адинамия, бледность кожи. Сохраняется анорексия. Нередко отмечаются тошнота, повторная рвота и боли в животе. Нарастает отек тканей ротоглотки, что приводит к ущемлению язычка или смещению его в сторону. Отек также распространяется на мягкое и твердое небо и слизистую носоглотки, что затрудняет носовое дыхание. Из-за этого больные вынуждены дышать через рот. Голос приобретает гнусавый оттенок. Осмотр ротоглотки резко затруднен из-за выраженного отека тканей.

Следует отметить, что пленки со слизистой ротоглотки быстро распространяются на слизистую носа (появляются серозные или серозно-сукровичные выделения из носа) и гортань - нисходящий круп (проявляется стенозом). Из рта больных ощущается приторно-сладковатый запах. Углочелюстные лимфоузлы достигают 4-5 см в диаметре, более болезненны, чем при распространенной форме заболевания.

Важным признаком токсической дифтерии зева является отек подкожной клетчатки шеи, проявляющийся изменением ее конфигурации (она становится короткой и толстой), исчезновением подчелюстной, надключичной и подключичной ямок, студенеобразной консистенцией кожи (выявляется при постукивании по ней пальцем). При субтоксической форме заболевания наблюдают лишь односторонний отек подкожной клетчатки шеи. При токсической дифтерии зева I степени отек подкожной клетчатки двухсторонний, распространяется до щитовидного хряща. При токсической дифтерии II степени отек доходит до ключиц, а при токсической форме заболевания III степени - распространяется на грудную клетку. Отек подкожной клетчатки нередко создает впечатление флегмоны шеи.

Следует отметить, что значение отека подкожной клетчатки шеи для ранней диагностики токсической дифтерии зева сравнительно небольшое. Это связано с тем, что лишь у 5% больных он появляется в 1-е сутки заболевания, у 40% - на вторые и у остальных - на 3-4-е. То есть, более чем у половины больных отек подкожной клетчатки шеи появляется после вторых суток с момента начала заболевания, когда эффективность лечебных мероприятий становится незначительной.

У некоторых больных токсической дифтерией зева наблюдается умеренно выраженный геморрагический синдром, проявляющийся пропитыванием кровью фибриновых налетов (приобретают коричневую, а затем - черную окраску), а также единичными кровоизлияниями в кожу шеи или кровоподтеками в местах инъекций.

Гипертоксическая дифтерия зева. Отличается от токсической дифтерии более высокой температурой тела (39,5-40,0 градусов), быстрым прогрессированием токсических проявлений заболевания. У больных отмечается сильная головная боль, заторможенность, бред, судороги, многократная рвота. В связи с быстротечностью болезни налет на миндалинах не успевает развиваться, что создает определенные диагностические трудности. Единственным характерным признаком данного заболевания, который уже имеется в это время, является

значительно выраженный отек тканей ротоглотки. Болезнь может осложниться развитием инфекционно-токсического шока (тошнота, рвота, бледность покровов, акроцианоз, мраморность кожи, частый, слабого наполнения пульс, прогрессирующая артериальная гипотония, геморрагический синдром, снижение диуреза вплоть до анурии и т.д.) или острой надпочечниковой недостаточности (быстрое понижение температуры тела до нормальных или субнормальных цифр, бледность кожи и акроцианоз, липкий, холодный пот, миалгии, многократная рвота, боли в эпигастрии, резкое падение артериального давления).

Следует отметить, что наблюдаемый при инфекционно-токсическом шоке геморрагический синдром характеризуется не только геморрагической сыпью, но и носовыми, желудочными кровотечениями, гематурией и другими проявлениями.

Промедление с лечением больных токсической дифтерией зева ведет к развитию осложнений, нередко являющихся причиной неблагоприятных исходов заболевания. В первые 2-5 дней больные могут погибнуть от острой сердечно-сосудистой недостаточности, обусловленной инфекционно-токсическим шоком и острой надпочечниковой недостаточностью, а также параличом мышц сердца. На 2-3-й неделе наибольшую угрозу больным представляет острая сердечно-сосудистая недостаточность, связанная с миокардитом. На 4-8-й неделе причиной смерти больных может явиться развитие паралича дыхательных мышц и диафрагмы.

Дифтерия зева у привитых. Необходимо помнить, что в ряде случаев (при заражении весьма большой дозой или высоковирулентными штаммами возбудителя) дифтерией болеют и вакцинированные люди, обладающие достаточно высоким противодифтерийным иммунитетом. Клиническая картина заболевания у них имеет некоторые особенности. Болезнь протекает в виде катаральной или островчатой форм. Температура тела не превышает 38,0 градусов. Явления общей интоксикации незначительные или вообще не выявляются. При островчатой форме дифтерии налет имеется только на одной миндалине, сравнительно легко снимается тампоном, не оставляя после себя дефекта ткани (нет кровотечения). Вместе с тем, у этих больных сохраняются

другие характерные для дифтерии зева симптомы - незначительная боль в горле при глотании и при пальпации углочелюстных лимфоузлов, неяркая гиперемия пораженных миндалин, а также фибринозный характер налетов (не растираются шпателями, не растворяются в воде и тонут на дне сосуда). Осложнения встречаются редко, ограничиваются миокардитом и полиневритом и протекают в сравнительно легкой форме.

### ДИФТЕРИЯ НОСА

Дифтерия носа протекает в виде атипичной (катаральной) и типичной (пленчатой) форм. Типичная, в свою очередь, бывает локализованной (фибринозные пленки располагаются на носовых раковинах, перегородке или наружных стенках носа), распространенной (пленки распространяются на слизистую гайморовых пазух носа или на носоглотку) и токсической (сопровождается отеком подкожной клетчатки щек, а иногда и верхних отделов шеи).

Заболевание протекает с нормальной или субфебрильной температурой тела. Самочувствие больных не страдает. Первые проявления дифтерии носа характеризуются появлением из одного из носовых ходов серозно-гнойных выделений, а также умеренно выраженных гиперемии и отека его слизистой. При катаральной форме болезни местные изменения в начальном периоде болезни этим и ограничиваются. При пленчатой же форме болезни на этом фоне на поверхности переднего отдела нижней носовой раковины наблюдают нежный белесоватого цвета, легко снимаемый налет, который на 2-3-й день заболевания приобретает белую окраску, выступает над поверхностью слизистой, имеет плотную консистенцию, спаян с пораженными тканями. На 3-4-е сутки выделения из носа приобретают гнойно-кровянистый характер. Процесс переходит и на второй носовой ход. Носовое дыхание резко затрудняется. На крыльях носа могут появиться мокнутие и корочки. Сухие корочки без воспалительной реакции вокруг них могут появляться также на щеках, лбу, подбородке. Они являются

проявлением дифтерии кожи. Осмотр носовых ходов при катаральной форме болезни, наряду с отеком и кровоточивостью слизистой, выявляет участки эрозий. При пленчатой дифтерии носа, кроме отмеченного, на переднем и среднем отделах нижней носовой раковины, а нередко - на носовой перегородке и на наружных стенках носа выявляются плотно спаянные со слизистой пленки белого цвета, которые с 4-5 дня приобретают серо-белый, а затем грязно-серый цвет. При распространенной форме заболевания пленки обнаруживаются на слизистой носоглотки и гайморовых пазух.

В случаях, когда не применяется специфическое противодифтерийное лечение, заболевание приобретает длительное течение и не поддается воздействию обычных терапевтических средств, применяемых при рините.

Токсическая дифтерия носа развивается при распространенной форме заболевания. У больных наблюдается отек тканей носа, распространяющийся вскоре на подкожную клетчатку щек, а иногда и на верхний отдел шеи.

### ДИФТЕРИЯ ГОРТАНИ

Дифтерия гортани проявляется в виде локализованной формы, когда воспалительный процесс поражает только гортань, или распространенной, когда он переходит на трахею и бронхи, а в ряде случаев - и на бронхиолы. У многих больных поражение гортани возникает в результате распространения патологического процесса из ротоглотки (нисходящая дифтерия гортани). Вследствие особенностей анатомического строения гортани, трахеи и бронхов, обуславливающих плохую всасываемость дифтерийного токсина, синдром интоксикации выражен незначительно. Вместе с тем, образование в этих случаях фибринозных пленок в гортани, отек ее тканей и спазм голосовых связок ведут к нарушению дыхания вплоть до асфиксии (истинный круп), обуславливают тяжелое течение болезни.

Заболевание начинается постепенно, с появления субфебрильной температуры тела, незначительного нарушения самочувствия, кашля и изменения

голоса. Эти симптомы соответствуют катаральному периоду заболевания, который продолжается 1-2 дня.

Спустя 1-2 суток с момента возникновения заболевания у больных становится слабым или почти исчезает голос (афония), кашель становится слабым (беззвучным), а дыхание шумным с затруднением вдоха. Одновременно наблюдается втяжение податливых мест грудной клетки (на вдохе втягиваются яремная, надключичные и подключичные ямки и межреберные промежутки). Это стенотический период. Он продолжается в течение 1-2 суток. Затем становится затрудненным и шумным не только вдох, но и выдох («пилящее» дыхание). Появляется возбуждение больных, бледность и цианоз кожи и слизистых. Вскоре заболевание переходит в асфиктический период, когда дыхание становится поверхностным, появляется холодный пот, усиливается синюшность покровов, появляется нитевидный пульс. В течение нескольких минут может наступить смерть.

Следует знать, что у взрослых может наблюдаться атипичное течение дифтерии гортани. В этих случаях изменения голоса могут и не достигать степени афонии, а стенотические явления умеренно выражены. Однако эта форма заболевания также создает опасность для жизни больного. Патологический процесс из гортани может распространиться на трахею, бронхи, бронхиолы, приводить к острой дыхательной недостаточности, а также к возникновению пневмонии.

### ДИФТЕРИЯ ГЛАЗА

Заболевание протекает в виде типичной (с образованием пленчатых налетов) и атипичной (катаральной) формы. Типичная, в свою очередь, может быть локализованной (местный патологический процесс ограничивается слизистой век), распространенной (сопровождается одновременным поражением и конъюнктивы глазного яблока) и токсической (с отеком околоорбитальной клетчатки).

Начальные проявления. Заболевание начинается с появления субфебрильной температуры тела и поражения только одного глаза, проявляющегося отеком и скудно-гнойным отделяемым из конъюнктивального мешка. Осмотр конъюнктивы при катаральной форме заболевания выявляет ее умеренно выраженную гиперемию. При типичной форме заболевания на гиперемизированной конъюнктиве обнаруживается нежный легко снимаемый, беловатого цвета налет, который со 2-3-го дня становится плотным и трудно снимаемым.

При катаральной форме дифтерии глаза в течение всего периода болезни сохраняются симптомы, наблюдаемые с первых дней заболевания - гиперемия конъюнктив и серозно-гнойное отделяемое из конъюнктивального мешка. При типичной (пленчатой) дифтерии глаза со 2-3-го дня заболевания увеличивается отек века пораженного глаза, и оно приобретает синюшную окраску. Одновременно увеличивается количество отделяемого из конъюнктивального мешка, которое часто принимает сукровичный характер. На конъюнктиве века (при локализованной форме), а также и на конъюнктиве глазного яблока (при распространенной форме) выявляют серо-белого цвета пленки. Вскоре поражается и второй глаз. Самочувствие больных остается удовлетворительным.

Токсическая дифтерия глаза протекает также, как и распространенная. Отличие состоит лишь в появлении при токсической форме болезни отека околоорбитальной клетчатки.

### ДИФТЕРИЯ КОЖИ

Заболевание, как правило, возникает у людей, страдающих заболеваниями с поражением кожи (опрелости, потертости, пиодермии и т.д.). Наблюдаются формы типичные (пленчатые), атипичные (в виде экземы, импетиго, гнойничковых сыпей) и токсические (с отеком подкожной клетчатки вокруг местного патологического очага).

Болезнь характеризуется повышением температуры тела (до субфебрильных показателей), умеренно выраженной общей слабостью. Участки ранее пораженной кожи становятся отечными.

Через 1-2 дня в глубине складок пораженных участков кожи появляются грязно-серого цвета пленки. Одновременно отмечается регионарный малоболлезненный лимфаденит. Заболевание принимает длительное течение и не поддается лечению обычными терапевтическими средствами. При токсической форме заболевания, наряду с вышеотмеченным, наблюдается выраженный отек подкожной клетчатки вокруг пораженного участка.



## ДИФТЕРИЯ РАНЫ

Заболевание развивается у лиц, имеющих раневой процесс и протекает в виде типичной (пленчатой) или атипичной (без образования пленок) формах. Первыми признаками заболевания являются повышение температуры тела до субфебрильных показателей, появление гиперемии и отека краев раны. Через 2-3 дня с момента начала заболевания усиливается отек краев раны, а на ее дне появляется серовато-белого цвета трудно снимаемый налет, который вскоре становится грязно-серым. Заболевание отличается длительным, не поддающимся лечению, течением. В связи с этим во всех случаях затяжного течения раневого процесса, особенно в условиях эпидемического неблагополучия по дифтерии, больных следует многократно обследовать на носительство возбудителей данного заболевания, осуществлять посев материала из ротоглотки и раны. Бактериологическое обследование следует проводить у всех остальных лиц, находящихся в окружении больного.

## ОСЛОЖНЕНИЯ ДИФТЕРИИ

Обусловлены, как правило, действием на организм дифтерийного токсина и поэтому чаще всего наблюдаются при токсических формах заболевания (инфекционно-токсический шок, острая надпочечниковая недостаточность, миокардит, паралич мышцы сердца, дыхательных мышц и диафрагмы, невриты). При легких формах дифтерии осложнения возникают только при несвоевременном применении противодифтерийной сыворотки (инфекционно-токсический миокардит, невриты). При дифтерии гортани наиболее типичными осложнениями являются истинный круп и вторичная бактериальная пневмония.

Дифтерийный (инфекционно-токсический) миокардит развивается в конце первой - начале второй недели заболевания. Он проявляется кардиалгиями, нарастающей общей слабостью, бледностью покровов, выраженной тахикардией,

глухостью сердечных тонов, систолическим шумом, небольшим расширением границ сердца, а также характерными изменениями электрокардиограммы (снижением вольтажа зубцов, инверсией и расщеплением зубца Т, смещением отрезков ST, а также удлинением отрезка PQ (более 0,2 с). При диффузном миокардите, кроме приведенного, отмечаются различного рода аритмии, ритм галопа, внезапные перепады частоты сердечных сокращений, а на ЭКГ - периоды Самойлова - Венкебаха, выпадение желудочковых сокращений, асинхронность сокращений предсердий и желудочков, признаки их мерцания, деформация и уширение комплекса QRS (более 0,1 с). Вскоре присоединяются явления сердечной недостаточности - прогрессирующее учащение пульса и слабое его наполнение, гипотония, цианоз кожи и слизистых, увеличение печени, рвота и боли в животе. Стойкий ритм галопа, сопровождающийся болями в животе и рвота - неблагоприятные прогностические признаки.

Дифтерийные невриты. Весьма типичным осложнением дифтерии является поражение периферических нервов. При этом страдают многие нервные стволы, но в первую очередь те, которые находятся ближе к воротам инфекции. Лишь в последующем могут появиться поражения отдаленных нервных стволов туловища и конечностей. В конце первой - в начале второй недели с момента заболевания возникают невриты IX и X пары черепномозговых нервов (паралич мягкого неба), а также III, VI, VII и некоторых других. В результате наблюдаются парез аккомодации, косоглазие или птоз, иногда - парез мускулатуры лица. На 4-6 неделе появляются параличи мышц шеи, туловища и конечностей.

Инфекционно-токсический шок часто развивается на фоне нормальной температуры тела и характеризуется бледностью или мраморностью кожи, акроцианозом, прогрессирующей тахикардией, артериальной гипотонией, снижением диуреза, а затем и полным прекращением выделения мочи, умеренно выраженным геморрагическим синдромом.

Острая надпочечниковая недостаточность проявляется болями в эпигастрии, рвотой, миалгиями, бледностью кожи, акроцианозом, липким потом, тахикардией, резким падением артериального давления, олигурией вплоть до

анурии, а также снижением чувствительности организма к вазопрессорным веществам.

Основной причиной летальных исходов при дифтерии являются сердечно-сосудистая недостаточность, обусловленная инфекционно-токсическим шоком, недостаточностью надпочечников, миокардитом, параличом мышцы сердца, а также острая дыхательная недостаточность, связанная с крупом (при дифтерии гортани) или с параличом диафрагмы и дыхательных мышц (при токсических формах дифтерии).

### **ДИАГНОЗ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ ДИАГНОЗ ДИФТЕРИИ**

Диагностика дифтерии должна основываться преимущественно на клинических данных. Лабораторные методы подтверждения диагноза занимают достаточно много времени. Лечение же больных может быть эффективным, если оно осуществляется с первых дней болезни.

Больше всего диагностических затруднений возникает при локализованных формах дифтерии зева, клиническая картина которых нередко имеет сходство со стрептококковой ангиной. В связи с этим, все случаи ангины, имеющие постепенное начало, протекающие без признаков выраженной интоксикации (без озноба, выраженной головной боли, ломоты в теле и других) с непродолжительным повышением температуры тела (в течение 2-3-х дней) и явлениями пленчатого тонзиллита (пленки белого или серовато-белого цвета, выступают над поверхностью миндалин и с трудом или легко снимаются, с отеком пораженных тканей, а также со склонностью к длительному течению воспалительного процесса должны рассматриваться, как подозрительные на дифтерию.

Диагностические ошибки на догоспитальном этапе в определенной мере связаны с преобладанием сравнительно легких (катаральной и островчатой) форм заболевания (в 67% случаев), напоминающих катаральную и фолликулярную ангину, а также в связи с отсутствием настороженности врачей в отношении

возможности течения его с подобной симптоматикой. Однако диагностические ошибки встречаются и при типичном течении заболевания, когда у больных пленчатой формой дифтерии зева необоснованно диагностируется «атипичная ангина» или «пленчатая ангина». Особенно заслуживает внимания тот факт, что в ряде случаев у врачей не возникает сомнения в отношении дифтерии даже в тех случаях, когда у больных, перенесших «ангину», возникают типичные для дифтерии осложнения - парез мягкого неба, миокардит и другие. Следует помнить, что все случаи заболеваний, сопровождающиеся тонзиллитом с пленчатым (фибринозным) налетом должны рассматриваться, как подозрительные на дифтерию. Выделение же от больных ангиной токсигенных дифтерийных палочек (из зева или носа) как правило является свидетельством заболевания не ангиной, а дифтерией.

Катаральную дифтерию зева необходимо дифференцировать с катаральной ангиной, которая отличается острым началом, более высокой и сравнительно продолжительной температурой тела, более выраженными симптомами интоксикации (озноб, общая слабость, головная боль, ломота в теле, нарушение аппетита), интенсивными болями в ротоглотке и болезненностью углочелюстных лимфатических узлов, а также яркой гиперемией небных миндалин, язычка и дужек (таблица 2).

Локализованные формы дифтерии зева требуется отличать от фолликулярной и лакунарной ангины. Последние характеризуются острым началом заболевания, относительно продолжительной (5-6 суток) лихорадкой, выраженной интоксикацией (озноб, выраженная общая слабость, головная боль, ломота в теле, беспокойный сон, нарушенный аппетит), значительной болью в горле при глотании, гиперемией лица, ярко красной гиперемией миндалин,

Клиническая дифференциальная диагностика катаральной дифтерии зева и катаральной ангины  
Таблица 2

Клинические проявления заболевания	Ангина	Катаральная дифтерия зева
Начало заболевания	Острое с ознобом	Постепенное без озноба
Проявления интоксикации	Озноб, беспокойный сон, общая слабость, головная	Отсутствуют

		боль, ломота в теле	
Проявления тонзиллита			
а) боль в горле		Выраженная	Незначительная
б) гиперемия миндалин		Выраженная, с распространением на небные дужки и язычок	Умеренная
в) отек миндалин		Отсутствует	Умеренно выраженный
Характер изменений углочелюстных лимфоузлов		Увеличены и болезненны	Умеренно увеличены и безболезненны
Выраженность лихорадки и ее продолжительность	38-38,5	градусов в течение 3-4 суток	37,1-37,5
Эффект от бензилпенициллина		Выраженный	Отсутствует

небных дужек, язычка и значительной болезненностью углочелюстных лимфоузлов. При фолликулярной ангине на миндалинах видны подэпителиально расположенные гнойные фолликулы в виде возвышающихся белого цвета образований размером 2-3 мм в диаметре, которые не снимаются шпателем и не имеют тенденции к периферическому росту. При лакунарной ангине налет исходит из лакун, носит гнойный характер, легко удаляется тампоном, растирается шпателями и растворяется в воде. Налеты не распространяются. Исключением является тяжелое течение ангины с некротическим поражением миндалин, распространяющимся на всю их поверхность (таблицы 3,4).

Локализованные формы дифтерии приходится также дифференцировать с ангиной Симановского-Венсана, инфекционным мононуклеозом и скарлатиной. Ангина Симановского-Венсана отличается кратковременной субфебрильной температурой тела, незначительной общей интоксикацией в виде умеренно выраженной общей слабости, поражением лишь одной миндалины в виде язвы размером 5-10 мм в диаметре, покрытой легко снимаемым налетом желтовато-белого или беловато-серого цвета.

После удаления налета образуется кратерообразный дефект ткани с ровным дном (язва) без признаков кровотечения. Из рта больных ощущается гнилостный запах. В мазках из отделяемого пораженных участков миндалин, окрашенных по Романовскому-Гимза, обнаруживается фузоспирохетоз.

Клиническая дифференциальная диагностика островчатой дифтерии зева и  
фолликулярно-лакунарной ангины

Таблица 3

Клинические проявления заболевания	Ангина	Островчатая дифтерия зева
Начало заболевания	Острое с ознобом	Постепенное без озноба
Проявления интоксикации	Озноб, возбуждение, беспокойный сон, общая слабость, головная боль, ломота в теле, гиперемия лица	Вялость, умеренная бледность кожи
Проявления тонзиллита		
а) боль в горле	Выраженная	Незначительная
б) отек миндалин	Незначительный или отсутствует вообще	Выражен, особенно на той миндалине, где больше площадь налетов
в) характер налетов	В виде фолликулов белого цвета, размерами 2-3 мм в диаметре, не снимающихся, а также гной в лакунах	В I-е сутки - нежные, белесоватые, легко снимаются, а со 2 дня - плотно спаянные с тканями островки налетов белого цвета размером 2-5 мм в диаметре
Характер изменений углочелюстных лимфоузлов	Увеличены и болезненны	Увеличены и малоболезненны
Продолжительность лихорадки	5-6 суток	2-3 дня
Эффект от бензилпенициллина	Выраженный	Отсутствует

Инфекционный мононуклеоз также, как и дифтерия зева, часто протекает с пленчатым тонзиллитом. Однако при инфекционном мононуклеозе налет не плотный, а крошкообразный, легко снимается, не оставляя дефекта ткани. Состояние больного страдает умеренно, интоксикация сравнительно небольшая. Кроме того, при инфекционном мононуклеозе наблюдается полиаденит (поражаются углочелюстные, заднешейные, затылочные, подмышечные, а нередко и другие группы лимфоузлов), увеличение печени и селезенки, а в крови - выраженный лимфоцитоз (до 80%) с появлением атипичных одноядерных, а также плазматических клеток.

Основными отличиями скарлатины от дифтерии зева являются острое начало заболевания (с ознобом, ломотой в теле, выраженной общей слабостью, головной болью, нарушением аппетита), особенности тонзиллита, состоящие в яркой гиперемии тканей ротоглотки («пылающий зев») и наличия в отдельных

случаях незначительного количества гноя в лакунах миндалин, появлением в первые сутки болезни по всей поверхности кожи, кроме носогубного треугольника, обильной точечной сыпи, расположенной на гиперемизированном фоне.

Клиническая дифференциальная диагностика пленчатой дифтерии зева и фолликулярно-лакунарной ангины

Таблица 4

Клинические проявления заболевания	Ангина	Пленчатая дифтерия зева
Начало заболевания	Острое с ознобом	Постепенное без озноба
Проявления интоксикации	Озноб, возбуждение, беспокойный сон, общая слабость, головная боль, ломота в теле, гиперемия лица	Вялость, сонливость, умеренная бледность кожи
Проявления тонзиллита		
а) боль в горле	Выраженная	Незначительная
б) отек миндалин	Незначительный или отсутствует вообще	Выражен, особенно на той миндалине, где больше площадь налетов
в) характер налетов	В виде фолликулов белого цвета, размерами 2-3 мм в диаметре, не снимающихся, а также гной в лакунах	В I-е сутки - нежные, белесоватые, легко снимаются, а со 2 дня - пленчатые, белого цвета, плотно спаяны с тканями
Характер изменений углочелюстных лимфоузлов	Увеличены и болезненны	Увеличены и малоболезненны
Продолжительность лихорадки	5-6 суток	2-3 дня
Эффект от бензилпенициллина	Выраженный	Отсутствует

Распространенную дифтерию зева следует отличать от болезней крови (лейкоза и агранулоцитоза), которые в ряде случаев также протекают с тонзиллитом, сопровождающимся поражением, кроме миндалин, и слизистой полости рта и глотки.

Острый лейкоз и агранулоцитоз отличаются от распространенной дифтерии зева длительным течением и лихорадкой, сопровождающейся большими суточными размахами температуры тела, с ознобами и обильным потоотделением, сравнительно поздним присоединением некротического тонзиллита (на 5-7-е сутки заболевания), геморрагической сыпью,

гепатолиенальным синдромом, а также характерными изменениями картины периферической крови (при лейкозах - гиперлейкоцитоз или нормоцитоз с преобладанием высокодифференцированных и молодых клеток при отсутствии переходных; при агранулоцитозе - лейкопения с одновременным резким снижением числа нейтрофилов).

Определенные трудности возникают в диагностике токсической дифтерии зева, особенно в начальный период, когда еще не развился отек подкожной клетчатки шеи. В таких случаях дифтерию нередко принимают за грипп.

В начальный период токсической дифтерии зева, когда отмечается асимметричный отек тканей ротоглотки, иногда ошибочно ставят диагноз паратонзиллита или паратонзиллярного абсцесса. Однако в отличие от дифтерии, больные упомянутыми заболеваниями возбуждены, кожа лица в этих случаях гиперемирована. Беспокоят сильные боли в горле, часто иррадиирующие в ухо или в нижнюю челюсть, носящие пульсирующий характер. Боли резко усиливаются при глотании. Открывание рта также болезненное и ограниченное. Отмечается выраженное слюнотечение. Из-за болей в горле больные вынуждены постоянно сплевывать слюну. Миндалины свободны от налетов, только иногда имеется в лакунах гной. На пораженной стороне выявляется гиперемия небной дужки, язычка и мягкого неба, нависание последнего над сводом, а также смещение пораженной миндалины к центру. Из рта ощущается гнилостный запах.

Токсическая дифтерия зева, в отличие от паратонзиллита (паратонзиллярного абсцесса), характеризуется заторможенностью больных, выраженной бледностью кожи лица, умеренно выраженной болью в горле при глотании, полным и безболезненным открыванием рта, гипосаливацией (сухостью во рту), застойно-синюшным оттенком гиперемии тканей ротоглотки и резким их отеком, а также приторно-сладковатым запахом изо рта.

В ряде случаев токсическую дифтерию смешивают с эпидемическим паротитом, сопровождающимся отеком подкожной клетчатки вокруг околоушных и подчелюстных слюнных желез. Однако диагностические трудности исчезают,



если учитывается, что при эпидемическом паротите поражаются не углочелюстные лимфоузлы, а слюнные железы. Они увеличены в размере, имеют тестоватую консистенцию, болезненны при пальпации. При этом имеются симптомы Филатова и Мурсона, ощущается боль при открывании рта и жевании твердой пищи, а также отсутствие изменений со стороны зева.

В отдельных случаях возникают трудности в диагностике ангины, при которой выделяются токсигенные коринебактерии. Окончательный диагноз ангины с сопутствующим носительством коринебактерий дифтерии может быть поставлен ретроспективно на основании исследования антитоксического и антимикробного иммунитета (в процессе заболевания не нарастает титр антител к дифтерийному токсину и коринебактериям дифтерии).

При ретроспективной диагностике дифтерии имеет значение правильная клиническая оценка типичных для нее осложнений. Так, например, появление пареза мягкого неба у больного с «ангиной» свидетельствует о том, что больной переносит или перенес соответствующую форму дифтерии зева. Возникновение диффузного миокардита у больного с длительно протекающей ангиной также может указывать на дифтерию.

## ЛЕЧЕНИЕ

Больные дифтерией и носители токсигенных штаммов дифтерийной палочки подлежат немедленной изоляции и госпитализации в специально выделенные (изолированные) палаты инфекционного отделения военного госпиталя. В период эпидемической вспышки дифтерии целесообразно развертывать отделения для больных дифтерией и бактерионосителей, а также диагностическое отделение (палаты) для больных с подозрением на дифтерию.

Опасность дифтерии состоит в том, что экзотоксин возбудителей заболевания сравнительно быстро поражает клетки жизненно важных органов и систем, часто вызывая в них необратимые изменения. В связи с этим лечебные мероприятия при дифтерии должны: начинаться немедленно - в медицинском

пункте части, предусматривать устранение интоксикации, коррекцию обусловленных болезнью нарушений и осуществляться по всем правилам неотложной помощи и интенсивной терапии.

В комплексе лечебных мероприятий решающее значение принадлежит противодифтерийной антитоксической сыворотке (далее — ПДС). **ПДС дает наилучший результат, если применяется в первые 3 дня заболевания.** Это связано с тем, что сыворотка нейтрализует только циркулирующий в крови токсин. На токсин, связанный с тканями, она практически не оказывает действия. При всех формах заболевания, в том числе при самых легких или даже при подозрении на дифтерию, сыворотку следует вводить немедленно, не дожидаясь результатов бактериологического исследования, так как без этого даже легкая форма может быстро перейти в самую тяжелую с неблагоприятным исходом.

Введение противодифтерийной сыворотки может сопровождаться анафилактическим шоком. Анафилактический шок возникает у людей с повышенной чувствительностью к чужеродному (лошадиному) белку. С целью профилактики данного осложнения перед началом серотерапии ставят внутрикожную пробу с лошадиной сывороткой, разведенной 1:100, которая выпускается вместе с лечебной сывороткой. При отсутствии разведенной сыворотки для внутрикожной пробы ее следует приготовить путем смешивания 0,1 мл лечебной сыворотки и 9,9 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. В сгибательную поверхность предплечья внутрикожно вводят 0,1 мл разведенной сыворотки и наблюдают за больным в течение 20 мин. Проба считается отрицательной, если общая реакция отсутствует, диаметр папулы не превышает 0,9 см, а краснота вокруг нее ограничена. Пробу считают положительной, если папула достигает 1 см и более и окружена большой зоной красноты. При отрицательной внутрикожной пробе 0,1 мл не разведенной противодифтерийной сыворотки применяют подкожно. При отсутствии в течение 30 минут реакции вводят всю назначенную дозу препарата.

Введение противодифтерийной сыворотки больным распространенной, токсической и тяжелой комбинированной дифтерией является мероприятием,

проводимым по жизненным показаниям. В связи с этим, проверку чувствительности организма к чужеродному белку данной категории больных можно не проводить, а сыворотку им вводить под прикрытием больших доз глюкокортикоидов (180-240 мг преднизолона) и антигистаминных препаратов.

После введения сыворотки требуется медицинское наблюдение за больным в течение часа с готовностью к оказанию неотложной помощи в случае возникновения анафилактического шока. С целью обеспечения условий для эффективного оказания неотложной медицинской помощи при анафилактическом шоке в течение всего времени введения противодифтерийной сыворотки и последующего наблюдения осуществляется внутривенное введение больному (с помощью капельницы) инфузионных растворов. Анафилактический шок проявляется симптомами острой циркуляторной и дыхательной недостаточности, а иногда и судорожным синдромом. У больных внезапно появляются общая слабость, беспокойство, чувство страха, головокружение, внезапное покраснение, а затем бледность лица, похолодание конечностей, затруднение дыхания, холодный липкий пот, боль в груди или животе, частый и слабый пульс, резкое снижение артериального давления, иногда рвота, потеря сознания, судороги, непроизвольное отхождение мочи и кала.

При появлении первых признаков анафилактического шока необходимо немедленно прекратить введение сыворотки, уложить больного с приподнятыми ногами (на 15°), осуществить ингаляцию кислорода. Внутривенно вводят 60 мг преднизолона, 0,5 мл 1% раствора адреналина, 10 мл 10% раствора хлорида кальция, 2 мл 1% раствора димедрола на фоне капельного введения раствора Рингера или лактасола, 5% раствора глюкозы, 0,9% раствора хлорида натрия (500 мл). При отсутствии эффекта повторно вводят 90-120 мг преднизолона. В случаях продолжающейся артериальной гипотензии внутривенно капельно вводят 1% раствор мезатона. Скорость, длительность и кратность введения мезатона определяется в зависимости от артериального давления.

В случае клинической смерти необходимо обеспечить проходимость дыхательных путей, провести искусственное дыхание (аппаратом), закрытый массаж сердца.

Каждый случай применения сыворотки регистрируется в медицинской книжке (в истории болезни) с обязательным указанием номера серии, названия предприятия-изготовителя, количества и способа ее введения.

Неотложная медицинская помощь в медицинском пункте части (ОМедБ) включает внутримышечное введение всем больным дифтерией 2 млн ЕД бензилпенициллина. В случае задержки эвакуации бензилпенициллин вводят повторно через 4 часа. При аллергии организма к пенициллину можно применить антибиотики-макролиды (клацид, сумамед - по 0,5 г, эритромицин или олеандомицин по 0,4 г внутрь) или тетрациклины (тетрациклин 0,3 г, доксициклин 0,1 г внутрь). Отдельным категориям больных следует также вводить парентерально преднизолон (при распространенной дифтерии зева - 90 мг, при токсической - 120-240 мг) и противодифтерийную сыворотку.

В последние годы появились рекомендации использовать при дифтерии более низкие дозы противодифтерийной сыворотки по сравнению с общепринятыми (Турьянов М.Х. с соавт., 1994, 1995). Однако, частое наличие у военнослужащих различной степени недостаточности иммунной системы и неспецифических механизмов защиты организма, связанных с воздействием экстремальных факторов, а также трудности определения тяжести заболевания на этапах эвакуации обязывают вводить им достаточно высокие дозы препарата. При распространенной форме дифтерии зева следует применять 60 тыс. МЕ сыворотки, при субтоксической и токсической I степени - 100 тыс. МЕ, при токсической II степени - 150 тыс. МЕ, при токсической III степени и гипертоксической - 200 тыс. МЕ. Первоначально больному налаживают внутривенное (с помощью капельницы) введение кристаллоидных растворов, затем вводят 120-180 мг преднизолона, затем - противодифтерийную сыворотку. Одновременно с сывороткой внутривенно вводится 10 мл 10% раствора хлорида

кальция. При необходимости глюкокортикоиды и хлорид кальция применяются повторно.

Больным дифтерией гортани внутримышечно вводится 90 мг преднизолона и внутривенно (с помощью капельницы) - 20 тыс. МЕ противодифтерийной сыворотки. При наличии признаков дыхательной недостаточности доза сыворотки должна составлять 40 тыс. МЕ. Одновременно следует осуществлять ингаляцию гидрокортизона (по 125 мг каждые 4 часа), увлажненного кислорода, а также вводить литическую смесь: 1 мл 1% раствора промедола + 1 мл 1% раствора димедрола + 2 мл 2,5% раствора аминазина. В случае отсутствия эффекта от консервативных мероприятий показана интубация. При невозможности ее выполнения (при нисходящем крупе) осуществлять трахеостомию (коникотомию). Во всех случаях после введения сыворотки следует в течение часа вести за больным интенсивное наблюдение и обеспечить готовность к оказанию неотложной медицинской помощи при анафилактическом шоке путем внутривенного введения с помощью капельницы кристаллоидных растворов.

Основные мероприятия неотложной помощи больным дифтерией зева и гортани представлены в таблице 5.

При появлении признаков инфекционно-токсического шока или надпочечниковой недостаточности (тахикардия с частотой пульса более 100 ударов в минуту, понижение систолического давления ниже 105 мм рт. ст., олигоанурия) следует дополнительно вводить внутримышечно 120-180 мг преднизолона, внутривенно - 500 мл 5%-ного раствора глюкозы и 400 мл реополиглюкина (скорость введения 40-60 капель в минуту). При отсутствии терапевтического эффекта от перечисленных мероприятий и падении систолического артериального давления ниже 80 мм рт. ст. - ввести капельным способом (вместе с 250 мл изотонического раствора хлорида натрия или 5%-ного раствора глюкозы) 1-2 мл 1%-ного раствора мезатона.

	Дифтерия зева			Дифтерия гортани
	локализованная	распространенная	токсическая	
Бензилпенициллин (млн ЕД)	2	2	2	2
Противодифтерий- ная сыворотка (тыс.МЕ)	-	60	100-200	20-40
Хлорид кальция (мл 10%-ного раствора)	-	10	10	10
Преднизолон (мг парентерально)	-	90	120-240	90
Гидрокортизон (мг, ингаляционно)	-	-	-	125
Литическая смесь Ингаляция кислорода	-	-	-	+
Интубация (трахеостомия)	-	-	-	по показаниям

Эвакуацию больных осуществлять на носилках, при осложнении заболевания инфекционно-токсическим шоком - наиболее рационально на носилках с приподнятыми ногами, а при дыхательной и сердечно-сосудистой недостаточности - в полусидячем положении. Во время эвакуации продолжать мероприятия неотложной помощи, начатые в медицинском пункте части.

Лечение и интенсивная терапия больных дифтерией в стационаре.  
Поступающих в госпиталь больных дифтерией размещают в палатах (блоках) интенсивной терапии.

В комплексной терапии больных различными клиническими формами дифтерии решающее значение имеет применение противодифтерийной сыворотки. Поступающим в госпиталь немедленно вводится противодифтерийная сыворотка в следующих разовых дозах: при катаральной форме - 10 тыс. МЕ, локализованной - 20 тыс. МЕ, распространенной - 60 тыс. МЕ, при

субтоксической - 80 тыс. МЕ, токсической I степени - 100 тыс. МЕ, токсической II степени - 150 тыс. МЕ, токсической III степени - 200 тыс. МЕ, гипертоксической - 300 тыс. МЕ, при локализованной дифтерии гортани - 20 тыс. МЕ, а при распространенной - 40 тыс. МЕ. Если больной распространенной и токсической дифтерией на догоспитальном этапе не получал противодифтерийную сыворотку, в лечебном учреждении ее доза должна быть увеличена на соответствующее количество МЕ. Курсовая доза противодифтерийной сыворотки должна составлять: при локализованной дифтерии зева - 20-40 тыс. МЕ, при распространенной - 120 тыс. МЕ, при субтоксической - 180 тыс. МЕ, токсической I степени - 200 тыс. МЕ, токсической II степени - 300 тыс. МЕ, токсической III степени - 400 тыс. МЕ и при гипертоксической - 500 тыс. МЕ. При локализованной форме дифтерии гортани она равняется 40 тыс. МЕ, а при распространенной - 80 тыс. МЕ. В случаях, когда процесс распространился также на бронхи и бронхиолы, доза препарата должна составлять 120-200 тыс. МЕ. При комбинированной дифтерии разовая и курсовая дозы противодифтерийной сыворотки должны определяться путем суммирования доз препарата, применяемых при каждой локализации и форме патологического процесса в отдельности. Курсовые дозы противодифтерийной сыворотке при различных формах заболевания представлены в таблице 6. При наличии показаний они могут быть увеличены.

При локализованной дифтерии зева сыворотка вводится одномоментно, внутримышечно. При распространенной и токсической, а также при дифтерии гортани половина дозы препарата вводится внутривенно, остальная часть - внутримышечно.

При острой недостаточности кровообращения (инфекционно-токсический шок, острая надпочечниковая недостаточность) в связи с нарушением всасывания лекарственных веществ из тканей сыворотку следует вводить только внутривенно.

При распространенной, токсической, а также комбинированной формах болезни, когда одномоментное введение курсовой дозы препарата не представляется возможным из-за больших количественных показателей, ее

следует ввести в несколько приемов в течение первых 12-18 часов с момента поступления больного в стационар с интервалами между введением в 4-6 часов.

Применение адекватного клинической форме болезни количества противодифтерийной сыворотки сопровождается нормализацией температуры тела, значительным снижением интоксикации и уменьшением площади (за счет «расплавления» или отторжения) налетов. При локализованной дифтерии это происходит в течение 12-24 часов, а при распространенной и токсической - через 24-36 часов с момента введения курсовой дозы препарата. Если по истечению указанного промежутка времени не выявлено значительного уменьшения общих и местных проявлений заболевания, то это является свидетельством того, что введенная доза препарата недостаточна. В этих случаях требуется в срочном порядке дополнительно ввести сыворотку в количестве соответствующее 1/2 - 1 первоначально примененной дозы.

Больным распространенной и токсической дифтерией зева, тяжелой комбинированной формой болезни также следует проводить неспецифическую дезинтоксикацию организма (внутривенное введение 5% раствора глюкозы, полиионных растворов и 10% раствора альбумина (200-400 мл) в общем объеме, не превышающем 1000 - 1500 мл/сутки, применение глюкокортикоидов - преднизолон 120-300 мг/сутки). Наличие у данной категории больных выраженных дистонических и дисциркуляторных нарушений требует применить им трентал (при распространенной дифтерии по 0,2 x 3 раза в день внутрь, а при токсической или комбинированной - по 100 мг в 250 мл 5% раствора глюкозы или в изотоническом растворе хлорида натрия внутривенно капельно 3 раза в сутки).

Курсовая доза противодифтерийной сыворотки при различных клинических формах  
дифтерии

Таблица 6

Клиническая форма заболевания	Курсовая доза препарата (тыс. МЕ)
Дифтерия зева:	



- катаральная	10
- локализованная	20-40
- распространенная	120
- субтоксическая	180
- токсическая I степени	200
- токсическая II степени	300
- токсическая III степени	400
- гипертоксическая	500
Дифтерия гортани:	
- локализованная	40
- распространенная	80-200
Дифтерия носа, глаза и других локализаций:	
- атипичная	10
- локализованная	40
- распространенная	80
- токсическая	100-200

Всем больным дифтерией назначают комплекс витаминов (при тяжелой форме болезни - парентерально, остальным - внутрь).

Важное направление медицинской помощи при дифтерии заключается в блокаде процессов продукции в организме дифтерийного токсина. Прекратить его образование представляется возможным только путем подавления жизнедеятельности возбудителей заболевания. Обычно для этих целей рекомендуются антибиотики-макролиды (эритромицин, олеандомицин) и тетрациклины. Однако, эффективность этих препаратов не очень высокая, так как они обладают статическим действием на микроорганизмы (тормозят их развитие). В связи с этим, преимуществом обладают антибиотики с бактерицидным механизмом действия, например, бензилпенициллин. Однако, многие штаммы коринебактерий дифтерии чувствительны к нему в концентрации 0,4-0,6 ЕД/мл. Ее можно обеспечить в организме, в том числе в месте локализации микробного очага, только при применении препарата в разовой дозе, соответствующей 2 млн ЕД. Следовательно, всем больным следует применять бензилпенициллин по 2 млн ЕД через 4 часа (12 млн ЕД/сутки). При аллергии организма к пенициллину

целесообразно применять антибиотики-макролиды с бактерицидным механизмом действия - сумамед 0,5 один раз в сутки или клацид 0,5 два раза в сутки внутрь. При их отсутствии можно использовать эритромицин (олеандомицин) по 0,4 x 4 раза/сутки внутрь или тетрациклины (тетрациклин 0,3 x 4 раза/сутки или доксициклин 0,1 x 2 раза/сутки, внутрь). Продолжительность антибактериальной терапии должна составлять 5-7 суток.

Один из ведущих механизмов поражения жизненно важных органов и систем при дифтерии связан с кислородной недостаточностью. В связи с этим, в комплексе интенсивной терапии при распространенной и токсической дифтерии зева должны быть мероприятия, способные устранить гипоксию. Наибольшей эффективностью в этом отношении обладает гипербарическая оксигенация (по 45-60 мин в режиме 0,5-1 атмосферы избыточного давления 1-2 раза в день на протяжении 7-10 суток). Ее применение способствует более быстрому выздоровлению больных и предупреждает развитие миокардита.

Особого внимания заслуживает вопрос лечения больных дифтерией гортани. При этой форме заболевания не развиваются угроза инфекционно-токсического шока, инфекционно-токсического миокардита или острой надпочечниковой недостаточности. Однако, тяжесть состояния больных от этого не уменьшается. Она связана с развитием нисходящего крупа с явлениями острой дыхательной недостаточности.

Нарушение проходимости дыхательных путей в этом случае вызывают несколько механизмов - воспалительный отек слизистой, рефлекторный спазм мышц гортани и обтурация просвета гортани, трахеи, бронхов, а нередко и бронхиол фибринозными пленками. В связи с этим, интенсивная терапия больных дифтерией гортани должна предусматривать кроме специфических (сыворотка) и неспецифических (антибиотики) этиотропных средств, мероприятия, направленные на каждое звено патогенеза упомянутых нарушений в отдельности.

С целью уменьшения отека тканей гортани, вызванного воспалительным процессом, применяются глюкокортикоиды (преднизолон - 90-120 мг/сутки внутрь, гидрокортизон 125 мг в виде ингаляций до 4-6 раз в сутки) и

антигистаминные препараты (1%-ный раствор димедрола - 1 мл подкожно х 2 раза в сутки). Для устранения спазма мускулатуры гортани назначаются седативные (0,5%-ный раствор седуксена по 2 мл 3-4 раза в сутки) и спазмолитические средства (5%-ный раствор эфедрина по 1 мл и 0,1%-ный раствор атропина по 1 мл подкожно) препараты. При резко выраженном возбуждении дополнительно вводят литическую смесь (1 мл 1%-ного раствора димедрола + 1 мл 1%-ного раствора промедола + 2 мл 2,5% раствора аминазина). Обтурация гортани и нижележащих отделов респираторного тракта устраняется механическим их удалением при бронхоскопии, а также аспирацией с помощью электроотсоса, выполняемых многократно в процессе лечения больного. В связи с явлениями гипоксии назначаются ингаляции увлажненного кислорода через носовые катетеры. В случае отсутствия эффекта от консервативных мероприятий применяется интубация или трахеостомия.

В общем виде схема интенсивной терапии больных не осложненной формой дифтерии зева и гортани представлена в таблице 7.

Возникающие при дифтерии осложнения связаны с лечебными мероприятиями (сывороточная болезнь) или с действием дифтерийного экзотоксина (инфекционно-токсический шок, острая надпочечниковая недостаточность, инфекционно-токсический миокардит, полиневрит и т.д.).

Сывороточная болезнь у людей, ранее не получавших чужеродную (лошадиную или другую) сыворотку, развивается через 7-12 суток. В случаях вторичного введения сыворотки (независимо от сроков), она может развиваться через 3-6 дней. Сывороточная болезнь проявляется повышением температуры тела, преимущественно уртикарной сыпью. Сопровождающейся сильным зудом и отеком кожи, лимфаденитом, болезненностью, а иногда и отеком суставов, увеличением селезенки, гипотонией. Продолжительность заболевания составляет 5-7 суток.

При повторном введении сыворотки может возникнуть также местная реакция по типу феномена Артюса.

Лечение сывороточной болезни осуществляется с помощью противовоспалительных (10% раствор хлорида кальция по 10 мл внутривенно или по 20 мл 3 раза в день внутрь), антигистаминных препаратов (димедрол по 0,05, пипольфен или супрастин по 0,025 x 3 раза в сутки внутрь). В тяжелых случаях назначают глюкокортикоиды (преднизолон по 15-20 мг 4 раза в сутки внутрь).

При инфекционно-токсическом шоке проводят мероприятия, направленные на стабилизацию гемодинамики (5%-ный раствор глюкозы и полиионные растворы до 2-2,5 л/сутки, реополиглюкин - 400-600 мл/сутки, 20%-ный раствор альбумина (или плазма) - 200-400 мл/сутки, преднизолон 5-20 мг/кг/сутки, гидрокортизон 20-25 мг/кг/сутки, дезоксикортикостерона ацетат 0,5% раствор - 0,5-2 мл), на устранение нарушений системы гемостаза, гипоксии (ГБО), изменений электролитного баланса (панангин и другие) и кислотно-щелочного состояния. Инфузионные растворы вводятся струйно до момента нормализации артериального давления, а затем - капельно. В обязательном порядке ведется учет диуреза. При его недостаточности применяется лазикс (2-4 мг/кг/сутки).

Схема интенсивной терапии  
больных не осложненной дифтерией зева и гортани

Таблица 7

Мероприятия	Дифтерия зева			Дифтерия гортани
	локализованная	распространенная	токсическая	
Противодифтерийная сыворотка (курсовая доза, тыс. МЕ)	20-40	120	180-500	40-80
Бензилпенициллин (млн ЕД/раз)	2	2	2	2
Преднизолон (мг/сут)	-	120	240-300	60-120
Гидрокортизон (мг, ингаляции)	-	-	-	125 мг каждые 4 часа
Инфузия кристаллоидных растворов (л/сутки)	-	1	1-1,5	-
Инфузия альбумина (10% раствор, л/сутки)	-	-	0,2-0,4	-
Гипербарическая оксигенация (сеансов/сутки)	-	1	1-2	-

Ингаляция увлажненного кислорода	-	-	-	+
Седативные, спазмолитические и антигистаминные средства	-	-	-	+
Механическое удаление пленок из дыхательных путей (электроотсосом или при бронхоскопии)	-	-	-	+
Трахеостомия (интубация)	-	-	-	по показаниям

Коррекция нарушений системы гемостаза на первых стадиях инфекционно-токсического шока (ИТШ) проводится, в основном, с помощью гепарина. Вводят 10 тыс. ЕД препарата, а затем применяют его по показаниям каждые 4-6 часов под контролем показателей свертывания крови. Обычно при ИТШ I стадии (гиперкоагуляция) требуется вводить в сутки 150-250 ЕД/кг гепарина, при ИТШ II стадии (переход к гипокоагуляции без признаков фибринолиза) - 300 - 400 ЕД/кг и при третьей стадии (коагуляция с активацией фибринолиза) - 75-100 ЕД/кг.

При ИТШ III-IV стадий показано применение ингибиторов фибринолиза (эпсилон-аминокапроновая кислота по 100 мл 5% раствора в/венно капельно, повторно) и протеиназ (трасилол, контрикал, гордокс и другие - по 2-5 тыс. ЕД/кг в сутки, в/венно капельно).

При выраженных гемодинамических нарушениях, сопровождающихся почечной недостаточностью, медленно вводят небольшие дозы допамина (50-100 мг препарата в 250-400 мл 5% раствора глюкозы со скоростью 20 капель в минуту). Это позволяет повысить артериальное давление, увеличить минутный объем сердца, а также восстановить почечный кровоток. Применяются и другие мероприятия по восстановлению функции почек: внутривенное капельное введение 200 мл 5% раствора натрия гидрокарбоната, а затем медленно - 10 мл 2,4% раствора эуфиллина и в заключение 6-10 мл 1% раствора лазикса. Показаны тепловые процедуры на поясничную область (грелки, диатермия), паранефральная новокаиновая блокада.

При отсутствии эффекта от проводимых мероприятий и развитии анурической фазы острой почечной недостаточности необходимо строгое соблюдение суточного баланса жидкости. В связи с возможностью гиперволемии

с последующими острой сердечной недостаточностью и отеком легких крайне опасно избыточное введение жидкости. Назначается диета с ограничением белков и продуктов, богатых калием. Внутривенно вводят 10% раствор кальция хлорида (10-20 мл ежедневно), 20% раствор глюкозы (до 500 мл в сутки) с соответствующей дозой инсулина. Показан прием внутрь сорбита по 40-50 г в 100 мл теплой воды ежедневно. С целью ограничения катаболизма белков назначают анаболические гормоны (5% раствор ретаболила в/мышечно). Осуществляется коррекция кислотно-щелочного состояния. В случаях продолжающейся анурии и нарастания азотемии показаны перитонеальный диализ, экстракорпоральный гемодиализ.

При острой надпочечниковой недостаточности осуществляется терапия, направленная на замещение нарушенной функции надпочечников (преднизолон в дозе 5-15 мг/кг/сутки, гидрокортизон 20-25 мг/кг/сутки, дезоксикортикостеронацетат 0,5% - 2 мл), а также на обеспечение функции сердечно-сосудистой системы (в/венно 5% раствор глюкозы - 500 мл, полиионный раствор - 500 мл, реополиглюкин 400 мл, плазма 200-400 мл, коргликон 0,05% раствор 0,1 мл, мезатон 1% раствор 0,1-0,5 мл). При неукротимой рвоте и судорогах назначают галоперидол 0,5% раствор по 2 мл, дроперидол 0,25% раствор по 2-4 мл или седуксен 0,5% раствор по 2 мл.

При проведении мероприятий интенсивной терапии всегда следует учитывать возможность возникновения у больного дифтерией в конце первой недели заболевания инфекционно-токсического миокардита. В этих случаях инфузионные мероприятия следует осуществлять с большой осторожностью.

При дифтерийном миокардите исключают из пищи продукты, вызывающие метеоризм, уменьшают нагрузку на мышцу сердца путем снижения объема инфузионных растворов (до 500-1000 мл/сутки), назначают средства, нормализующие метаболические нарушения в миокарде (рибоксин по 2 г х 3 раза в сутки), оказывающие противовоспалительное действие (преднизолон 1-3 мг/кг массы тела внутрь, хлорид кальция, антигистаминные, аскорбиновая кислота в терапевтических дозах), устраняющие явления гипоксии (ГБО в режиме 0,5-1,0

ата в течение 60 мин по 1-2 сеанса в сутки), нарушения ритма и проводимости с учетом их происхождения. При повышенной свертываемости крови под контролем коагулограммы применяют гепарин (по 5-10 тыс. ЕД).

Лечение больных с дифтерийными невритами (полирадикулоневритами) проводят при участии невропатолога. При нарушении дыхания и глотания рекомендуется постельный режим и тщательный уход. В этих случаях необходимо периодически отсасывать скапливающуюся в верхних дыхательных путях слизь, а при возникновении дыхательной недостаточности - переводить больных на ИВЛ.

При явлениях пареза мягкого неба питание больных следует осуществлять полужидкой пищей, а при нарушениях глотания - через зонд. Больным назначают антихолинэстеразные препараты (прозерин 0,05% раствор по 0,75 мл подкожно 2 раза в день, галантамина бромид 1% раствор, начиная с 0,25 мл с постепенным увеличением дозы препарата до 1 мл подкожно). В восстановительном периоде галантамин целесообразно применять в сочетании с массажем и гимнастикой, ультрафиолетовым облучением, гальванизацией.

При острой дыхательной недостаточности у больных дифтерией гортани проводятся мероприятия, направленные на устранение спазма мускулатуры, охранительный режим, применение седативных (седуксен по 2 мл 0,5% раствора 3-4 раза в день в/мышечно, хлоралгидрат по 2,0 в клизме) и спазмолитических (по 1 мл 5% раствора эфедрина и 1 мл 0,1% раствора атропина подкожно) средств. При резком возбуждении назначают литическую смесь (см. выше). С целью уменьшения отека слизистой рекомендуется внутривенное введение антигистаминных препаратов (1 мл 1% раствора димедрола), глюкокортикоидов (80-100 мг преднизолона или адекватных доз других препаратов). Положительный эффект оказывают ингаляционное применение глюкокортикоидов (40-60 мг преднизолона или 125 мг гидрокортизона на ингаляцию каждые 4 часа), назначение «отвлекающих» процедур в виде горячих ножных ванн, устранение явлений гипоксии (ингаляции увлажненного кислорода через носовые катетеры), а также удаление пленок при бронхоскопии и с помощью электроотсоса.

При отсутствии эффекта от проводимых мероприятий или прогрессировании явлений крупа применяют оперативное вмешательство. При локализованном крупе предпочтительна интубация и только при нисходящем крупе показана трахеостомия с последующим удалением пленок из гортани, трахеи и бронхов с помощью электроотсоса. По соответствующим показаниям проводится ИВЛ.

При дифтерии глаза, раны, кожи вводится противодифтерийная сыворотка (таблица 6) и применяются общепринятые методы лечения воспалительных процессов при этих локализациях заболевания.

Больные дифтерией должны соблюдать постельный режим (таблица 8). Питание больных дифтерией осуществляется по норме стола № 2. Только при токсической дифтерии зева и при дифтерии гортани назначается стол № 11 Т (пища должна быть полужидкой или жидкой и давать ее следует небольшими порциями через 3-4 часа). При резкой болезненности в горле при глотании применяют зондовое питание. В период реконвалесценции назначается стол № 15.

Выписку реконвалесцентов после дифтерии следует осуществлять после полного клинического выздоровления и получения двух отрицательных результатов посевов материала на дифтерийную палочку. Выписка из госпиталя больных с осложненной дифтерией определяется индивидуально. Перенесшим полиневрит или легкую форму миокардита предоставляется отпуск по болезни на 30-60 суток. После тяжелой формы миокардита, а также в случаях стойких остаточных явлений полиневрита решается вопрос о степени годности военнослужащих к военной службе. Ориентировочные сроки пребывания больных в стационаре и варианты экспертных решений при дифтерии представлены в таблице 8.

Лечение бактерионосителей токсигенных дифтерийных палочек.  
Выявленные в части бактериовыделители токсигенных дифтерийных палочек также подлежат госпитализации в инфекционное отделение госпиталя. Их лечение начинают после проведения повторных бактериологических исследований. Если первый посев дал отрицательный результат, через два дня



делают второй. При повторном отрицательном результате носителя выписывают с диагнозом «транзитное носительство». Если же при обследовании в госпитале выделяют дифтерийную палочку, необходимо провести санацию возможных очагов хронической инфекции ЛОР-органов. Кроме того, назначают бензилпенициллин по 2 млн ЕД внутримышечно через 4 часа, а при аллергии к пенициллину - антибиотики-макролиды (сумамед 0,5 х 1 раз в сутки, клацид 0,5 х 2 раза в сутки или эритромицин 0,4 х 4 раза в сутки - внутрь) в течение 5 суток.

Выписку носителей осуществляют после окончания лечения и последующего получения двух отрицательных результатов бактериологических исследований, проведенных с интервалом в 2-3 дня.

Продолжительность постельного режима, сроки выписки и военно-врачебная экспертиза при различных клинических формах не осложненной дифтерии

Таблица 8

Клиническая форма заболевания	Продолжительность постельного режима (дней)	Ориентировочные сроки выписки в днях от начала лечения	Военно-врачебная экспертиза
Дифтерия зева			
- катаральная	5	15	Освобождение от занятий, физ.подготовки, нарядов и работ на 5 суток
- локализованная	10	21	Отдых при части 15 суток
- распространенная	15	28	Отпуск по болезни 30 суток
- субтоксическая	15	28	то же
- токсическая I ст.	20	35	то же
- токсическая II ст.	25	40	Отпуск по болезни 60 суток
- токсическая III ст.	30	50	то же
- гипертоксическая	30	50	то же
Дифтерия гортани	15	30	Отпуск по болезни 30 суток
Дифтерия носа, глаза и других локализаций:			
- атипичная	5	15	Освобождение от занятий, физ. подготовки, нарядов и работ на 5 суток
- локализованная	10	21	Отдых при части 15 суток
- распространенная	15	28	то же
- токсическая	20	35	Отпуск по болезни 30 суток

Примечание: при токсических формах дифтерии указаны сроки строгого постельного режима.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ДИФТЕРИИ

Эпидемиологические особенности дифтерии тесно связаны с характеристиками взаимодействующих в ходе эпидемического процесса популяций людей и циркулирующих в них коринебактерий. Первые неоднородны по восприимчивости, обусловленной не только антитоксическим иммунитетом, но и антибактериальной иммунорезистентностью, вторые - по токсигенности и вирулентности. При этом взаимодействии среди населения идет постоянное перераспределение его структуры по долевым соотношениям источников инфекции, восприимчивых и невосприимчивых. Структура циркулирующих возбудителей под влиянием вышеуказанного также перестраивается по токсигенности и вирулентности. Эти связи реализуются при обязательном участии необходимых и достаточных социальных и природных условий, влияющих как автономно на обе популяции, так и через механизм передачи возбудителя. В зависимости от определенных сочетаний вышеупомянутых признаков взаимодействующих в конкретных условиях популяций, у людей возникают манифестные или бессимптомные формы, наблюдаются те или иные клинические особенности дифтерийной инфекции и эпидемиологические характеристики заболеваемости.

### Источник инфекции

Источниками инфекции при дифтерии является человек, больной одной из манифестных форм инфекции, или бактерионоситель, выделяющий токсигенные коринебактерии. Особенно опасны больные дифтерией зева, которые наиболее активно выделяют возбудителя во внешнюю среду. Дифтерия носа регистрируется реже, однако больные этой формой заболевания также имеют большое эпидемиологическое значение. Менее опасны больные дифтерией кожи и другими редкими формами. Они могут заражать различные бытовые объекты: белье, мебель, что приводит к возникновению, как правило, отдельных

спорадических заболеваний. Эпидемиологическая значимость таких больных возрастает при допуске их к приготовлению и раздаче пищи. В этих случаях они могут явиться источниками алиментарных вспышек дифтерии.

Носители выделяют во внешнюю среду в 3-10 раз меньше возбудителя по сравнению с больными, однако их роль в поддержании эпидемического процесса является ведущей. Считается, что не менее 90% заражений, сопровождающихся развитием манифестных заболеваний, обуславливают носители токсигенных дифтерийных палочек. При высоких уровнях заболеваемости дифтерией доля носителей в эпидемических очагах может составить 10 - 20% и более от численности коллективов, однако они могут обнаруживаться даже при отсутствии заболеваний. Уровень носительства нетоксигенных коринебактерий обычно в 8-10 раз превышает уровень носительства токсигенных коринебактерий. Увеличение уровня обоеих форм носительства является настораживающим прогностическим признаком, поскольку имеются определенные экологические параллели в циркуляции токсигенных и нетоксигенных коринебактерий, связанные с феноменом фаговой конверсии. Обычно манифестации дифтерии предшествует усиление циркуляции токсигенных штаммов, которое происходит на фоне увеличения количества носителей нетоксигенных коринебактерий.

«Здоровые» носители составляют обычно большинство, но у половины и более из них все же выявляются хронические тонзиллиты или хроническая патология верхних дыхательных путей, придаточных пазух и т.п. Если носитель страдает ангиной, ОРЗ или хроническим тонзиллитом, то его эпидемическая опасность существенно повышается по сравнению с эпидемической опасностью «здорового» носителя. Коринебактерии, выделенные у таких носителей из носоглотки отличаются выраженными адгезивными свойствами, что свидетельствует о высокой заразительности этих источников инфекции. Эпидемиологическая значимость носителей как источников инфекции при дифтерии повышается из-за трудности их выявления, и контроля за распространением инфекции.

75-80% носителей токсигенной дифтерийной палочки освобождаются от нее в течение 2-4 недель (в основном это лица с транзитным носительством). У остальных формируется затяжное или хроническое носительство (от 1 до 6 и более месяцев), которое особенно характерно для лиц с хроническими воспалительными процессами в носоглотке, а также с дефектами локальной антибактериальной иммунорезистентности. Часто тот и другой дефицит совмещаются в одном лице, что взаимно отягчает преморбидный фон организма. Показано, что уровень антитоксического иммунитета не оказывает влияния на продолжительность носительства токсигенных дифтерийных палочек, более того у вышеуказанных лиц их уровень достаточен для того, чтобы не развилась манифестная форма инфекции. В отдельных случаях клиническая картина дифтерии зева (носа) может связываться с коринебактериями, у которых обычными лабораторными методами не обнаруживается способность продуцировать токсин. Это объясняется недостаточной чувствительностью рутинных методов обнаружения токсина, поэтому допускается постановка окончательного диагноза заболевания по клиническим признакам.

Источником дифтерийной инфекции для человека иногда могут быть и домашние животные (коровы, лошади, овцы и др.), у которых на слизистых оболочках обнаруживаются коринебактерии (чаще всего других видов, в том числе способных продуцировать токсин). Однако в целом дифтерийная инфекция зоонозной природы эпидемиологического значения не имеет, и протекает преимущественно в легкой форме, трудно дифференцируемой от ОРЗ по типу фарингита. Динамика носительства дифтерийных коринебактерий и случаи заболеваний животных, совпадающие с проявлениями дифтерии у людей, могут быть также следствием заражения животных от людей и временной циркуляции среди них маловирулентных и слабо токсигенных возбудителей.

### Механизм передачи

В соответствии с основной эпидемиологической локализацией возбудителя в организме источника инфекции, основным механизмом передачи при дифтерии - аэрозольный. Ведущее значение в распространении заболеваний и носительства имеет воздушно-капельный путь передачи. Микробы дифтерии с капельками слюны и носоглоточной слизи выделяются в воздух больными и носителями при разговоре, кашле, чихании. Часть капелек, содержащих возбудителя, подсыхая, образует капельно-ядерную фазу аэрозоля. Дегидратация капелек и превращение их в ядра сопровождается гибелью заключенных в них палочек дифтерии, хотя часть возбудителей сохраняет жизнеспособность и токсигенность. Воздушно-пылевой путь передачи возбудителя в эпидемиологии дифтерии практического значения не имеет.

Реализации воздушно-капельного пути передачи дифтерии в воинских коллективах способствуют неблагоприятные санитарно-бытовые условия размещения личного состава: недостаточные (менее уставных) площадь и кубатура спальных помещений казарм, размещение военнослужащих в спальнях большими группами (по 100 и более человек), многоярусная или нерациональная расстановка коек, плохая вентиляция жилых и административных помещений, нерегулярная влажная уборка спален, помещений клубов, учебных классов.

Контактно-бытовой путь передачи не имеет большого значения в эпидемиологии дифтерии, так как способствует возникновению лишь спорадических заболеваний этой инфекции с нефарингеальной локализацией возбудителя. В этом случае возбудитель передается зараженными руками и предметами (полотенце, носовые платки), на которых палочка дифтерии сохраняется в течение продолжительного времени без потери токсигенных свойств.

Заражение молока и молочных продуктов, в котором палочка дифтерии способна размножаться, может служить причиной распространения заболевания

алиментарным путем. Оно может осуществляться не только больными дифтерией зева (носа) и носителями, но и больными с локализацией патологического процесса вне дыхательных путей, например при дифтерии кожи. Алиментарные вспышки в этом случае требуют тщательного эпидемиологического обследования с установлением конечного фактора передачи возбудителя (как при кишечных инфекциях) и выявлением источника инфекции. Не исключается также попадание возбудителя зоонозной природы в указанные продукты, в результате чего могут возникать групповые заболевания верхних дыхательных путей (фарингиты), похожие на легкую форму дифтерии.

### Иммунитет

Иммунитет при дифтерии носит антимикробный и антитоксический характер, однако в связи с ведущей ролью в патогенезе заболевания экзотоксина защитную функцию выполняет антитоксический иммунитет. Защитным титром в крови по решению ВОЗ (1993 г.) считается уровень противодифтерийных антител в титре 0,01 МЕ/мл. Однако, гарантированную защиту человека от заболевания дает уровень антител в титре 0,1 МЕ/мл, что соответствует титру в РПГА 1:80-1:160.

Важнейшее патогенное свойство дифтерийного токсина - это его способность блокировать синтез белка в культивируемых клетках млекопитающих, в результате чего происходит гибель этих клеток. Это свойство используется для определения количества (титров) противодифтерийных антител с помощью реакции нейтрализации с использованием клеточных культур, чувствительных к дифтерийному токсину. Дополнительными тестами *in vitro* для количественного определения противодифтерийных антител являются реакция пассивной гемагглютинации (РПГА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и иммуноферментный анализ (ИФА)

Антитоксины в крови человека могут появляться в результате перенесенной дифтерии, бактерионосительства (“бытовой иммунизации”) и прививок анатоксином.

Наиболее точно состояние иммунитета против дифтерии устанавливают в ходе иммунологического контроля с помощью РПГА с дифтерийным диагностикумом. Неблагоприятными прогностическими признаками являются (помимо факта регистрации заболевания дифтерией) низкий уровень противодифтерийного иммунитета (уровень дифтерийного антитоксина ниже защитного титра более чем у 70% обследованных), стойкая тенденция к увеличению выделяемости токсигенных или нетоксигенных штаммов коринебактерий, а также наличие вспышек носительства тех или иных форм. Особую настороженность следует проявлять при наличии следующих фактов (даже при отсутствии заболеваемости дифтерией):

1. сочетание большого процента личного состава, охваченного противодифтерийными прививками (по данным документации) с высоким процентом лиц, имеющих титры столбнячного антитоксина ниже защитного уровня, что свидетельствует о недостаточном охвате контингента прививками;
2. сочетание большого процента личного состава, незащищенного от столбняка, с высокими титрами дифтерийного антитоксина, что сопряжено с вероятным скрытым, но достаточно активным эпидемическим процессом;
3. предшествующие заболевания ангиной в коллективе с недостаточным объемом бактериологических исследований (без установления возбудителя ангины и при отсутствии результатов обследования на дифтерию);
4. достоверное увеличение выделяемости коринебактерий биовара Gravis и высокотоксигенных штаммов.



Эти неблагоприятные прогностические признаки являются основанием для иммунологического и клинико-эпидемиологического обследования групп риска и принятия решения о проведении противоэпидемических мероприятий.

Выявление дифтерийного и столбнячного антитоксина в защитном титре при отсутствии прививочной документации или соответствующих записей в ней можно связать с качественно проведенной иммунизацией. В этом случае ревакцинация не проводится.

Общие закономерности инфекционно-иммунологического порядка, определяющие характер распространения и распределения дифтерии среди населения, объясняют и особые эпидемические ситуации, связанные с поражением дифтерией взрослого населения, в том числе и воинских коллективов. Эпидемическое благополучие в последних по дифтерии сильно зависит от общего состояния привитости населения страны и конкретных регионов, из которых поступают контингенты призывников или может осуществляться занос возбудителей другими лицами. В то же время именно заболеваемость военнослужащих является индикатором неблагополучия среди населения, так как вспышки в воинских коллективах иногда предшествуют общему повышению заболеваемости.

В периоды формирования или частичного обновления в воинские коллективы из местностей, неблагополучных по дифтерии, прибывают носители, формирующие в последующем внутренний резервуар возбудителя, а из местностей, не пораженных дифтерией, где прививки проводятся с неполным охватом населения или с грубыми дефектами - не иммунные или утратившие иммунитет лица. Заражение последних приводит к появлению манифестных заболеваний среди личного состава, причем в начале активизируется носительство токсигенных штаммов коринебактерий. Нередко выявлению первого случая дифтерии предшествует повышение заболеваемости ангинами и только тяжелые типичные осложнения у больных, безуспешно леченных пенициллином, свидетельствуют об ошибочном диагнозе. Следовательно, периодом наиболее вероятного возникновения заболеваемости дифтерией в войсках является время

прибытия пополнения или других категорий военнослужащих из мест, где имеются источники дифтерийной инфекции. В этом случае призывной контингент является группой риска заболевания. В отдельных случаях, когда осуществляется интенсивный занос токсигенных коринебактерий, военнослужащие “коренного состава”, непривитые в прошлом или привитые “не по схеме” (с ее разрывами или с увеличением временных интервалов) становятся группой риска. В последнее время к группе риска стали обоснованно относить офицеров и приравненных к ним лиц (особенно старших возрастных групп), которые в течение ряда лет не ревакцинировались и значительно утратили антитоксический иммунитет.

В условиях полноценного охвата населения страны прививками заболеваемость дифтерией в войсках представлена единичными случаями, в основном заносного характера. При отягощенной эпидемической ситуации в стране (регионе) в воинских коллективах может регистрироваться круглогодичный уровень (спорадическая заболеваемость). При стойком неблагополучии по дифтерии в гарнизоне (части) в годовой динамике заболеваемости отмечаются сезонные волны, связанные с периодами обновления коллективов. Большая часть заболеваний приходится на холодный период года. Это связано с действием сезонных факторов (снижение общей резистентности, активизация механизма передачи, переохлаждение и т.д.). В отдельных случаях регистрируется вспышечная заболеваемость с очагами, насчитывающими до нескольких больных и десятков бактерионосителей, при этом увеличивается количество носителей, выделяющих нетоксигенные коринебактерии. При формировании стойких внутренних резервуаров инфекции стабильная циркуляция возбудителей осуществляется за счет хронических бактерионосителей с увеличением риска заболевания вновь прибывших в коллектив лиц. Подобные ситуации возникают при некачественной работе медицинской службы и требуют проведения немедленных противоэпидемических мероприятий.

#### Профилактические и противоэпидемические мероприятия

Основным мероприятием по профилактике дифтерии является правильно организованные, своевременно и качественно проведенные прививки дифтерийным анатоксином.

В настоящее время в этих целях проводится ревакцинация против дифтерии:

1) военнослужащим срочной службы из числа прибывающего пополнения, у которых нет документального подтверждения (форма 025 - 1/у или 025 - 3/у) о проведенной им ревакцинации в 16-летнем возрасте;

2) военнослужащим при размещении их в населенных пунктах, неблагополучных по дифтерии;

3) воспитанникам суворовских и нахимовских училищ, а также военно-музыкальных училищ, достигших 16-летнего возраста.

4) военнослужащим, проходящим службу по контракту в возрасте с 26 по 56 лет включительно, каждые 10 лет (лиц, ранее привитых против столбняка, у которых после прививки прошло менее 10 лет, иммунизируют АД-М анатоксином (однократно, в дозе 0,5 мл), более 10 лет - АДС-М анатоксином).

При возникновении сомнений в полноценности привитости наблюдаемого контингента проводится иммунологическое обследование на антитоксический иммунитет. Если возможности лаборатории ограничены, используют скрининговый метод: формируются репрезентативные группы, у которых отбираются пробы крови из пальца для определения антитоксинов. Например, если требуется проверить реальный уровень защищенности пополнения, то формирование скрининговых групп следует проводить по принадлежности призывников к месту призыва (городским или сельским военкоматам). Офицеров и приравненных к ним лиц целесообразно объединять в группы по возрасту или срокам последних прививок. В группах должно быть 15-20 человек. По результатам скрининга делается вывод о реальной привитости и иммунологической защищенности всех призванных из данного региона (офицеров определенной возрастной группы), решается вопрос о

дифференцированной иммунизации лиц, непривитых ранее или не имеющих защитного титра антител.

Необходимо поддерживать постоянную связь с санитарно-эпидемиологическими учреждениями МЗ РФ в целях получения оперативной информации об эпидемической обстановке по дифтерии среди населения, проживающего в районах дислокации войск. При осложнении этой обстановки принимаются меры по недопущению заноса дифтерии в войска. В отдельных случаях, когда, несмотря на введение режимно-ограничительных мероприятий, невозможно исключить угрозу заноса дифтерии в воинские коллективы от населения, личному составу проводится ревакцинация по эпидемическим показаниям. Для этих целей используют дифтерийно-столбнячный анатоксин для подростков (АДС-М) или адсорбированный дифтерийный анатоксин (АД-М) с уменьшенным содержанием антигена, которые вводят внутримышечно в дозе 0,5 мл всему личному составу, подвергающемуся риску заражения. При проведении прививок по эпидемическим показаниям необходимо обеспечить охват ими военнослужащих, находящихся в условиях риска заражения, в возможно короткий срок (в течение 1 - 2 суток) . Для введения АДС-М или АД-М используются безыгольные инъекторы или одноразовые шприцы. При крайне неблагоприятной эпидемической обстановке по дифтерии допускается двукратное введение анатоксина с интервалом 30-45 дней. В особых случаях дифтерийные анатоксины можно использовать в составе схем комплексной вакцинации военнослужащих вместе с гриппозной инактивированной, туберкулезной, менингококковой химической вакцинами, а также сочетать с применением некоторых иммуностимуляторов (тималин, тимоген и др.). Решение об этом принимает начальник медицинской службы гарнизона (округа) по представлению эпидемиолога.

В целях раннего выявления дифтерии осуществляется активное наблюдение за больными ангиной, в особенности с выраженными патологическими изменениями на миндалинах (включая паратонзиллярные абсцессы) в течение не менее 3-х дней от первичного обращения; проводится однократное

бактериологическое обследование на дифтерию. Материал для исследования отбирают при первом обращении до начала лечения антибиотиками или другими антибактериальными препаратами. Доставка материала в лабораторию осуществляется в течение 2-3 часов с момента его взятия. Должна быть обеспечена госпитализация всех направляемых в стационар больных ангиной.

Важным в профилактике дифтерии является соблюдение уставных норм размещения военнослужащих в спальнях помещений.

При выявлении больного (больных) дифтерией в эпидемическом очаге проводится весь комплекс мероприятий по его ликвидации. При эпидемиологическом обследовании выявляют причины и условия возникновения очага, устанавливают его пространственные и временные границы, делают прогноз о возможности возникновения повторных заболеваний. Прогноз во многом зависит от выяснения возможного места заражения первого больного (больных): в части или вне части, сроков его (их) выявления, изоляции, реального состояния привитости личного состава и его иммунологической защищенности, оперативности проведения в очаге необходимых противоэпидемических мероприятий.

При появлении заболевания (заболеваний) дифтерией в части в течение первых-вторых суток проводится вакцинация личного состава по эпидемическим показаниям. Технически прививки осуществляются так же, как и при угрозе заноса заболеваний. Это основное мероприятие, наиболее эффективно предупреждающее появление повторных заболеваний. При недостаточной выработке иммунитета (возникновение повторных заболеваний за счет внутреннего резервуара возбудителей в коллективе несмотря на вакцинацию) рекомендуется повторное введение препарата через 30-45 суток.

Для выявления носителей токсигенных штаммов коринебактерий дифтерии и последующего лечения их в стационарных условиях производится бактериологическое обследование личного состава в очаге. Число лиц, подлежащих обследованию по контакту с больными дифтерией, устанавливают в процессе эпидемиологического обследования в соответствии с конкретными

особенностями очага и с учетом возможности реализации воздушно-капельного пути передачи возбудителя. Во всех случаях обследованию подлежат военнослужащие, находившиеся в одном спальном помещении с заболевшим, в отдельных случаях - тесно общавшиеся с ним в других местах (учебных классах, столовой, клубе и т.д.). В группу риска заболевания (формирования хронического носительства) входят также лица, часто болеющие ангиной, ОРЗ по типу фарингита или ринофарингита, имеющие хронический тонзиллит и хроническую патологию ЛОР-органов. В случае необходимости предпочтение при выборе контингента для бактериологического и иммунологического обследования следует отдавать вновь прибывшим в коллектив лицам (призывники, командированные и т.п.). При возможности обследуются также медицинский персонал, работники питания и другие категории, заражение которых может привести к возникновению вспышек дифтерии.

За очагом дифтерии устанавливается наблюдение в течение 10 суток после изоляции больного (больных) и бактерионосителей, а также проведения заключительной дезинфекции. На всем протяжении срока наблюдения в очаге проводится активное выявление вторичных заболеваний. При появлении их бактериологическое обследование личного состава на носительство возбудителей дифтерии повторяют. Вновь выявленных носителей токсигенных дифтерийных палочек изолируют и лечат в стационарных условиях. В период неблагополучия по дифтерии, при появлении больных дифтерией и в ходе последующего наблюдения за очагом обследованию на носительство токсигенных штаммов подлежат также все больные ангиной. Выписка лиц, переболевших ангиной в этот период, допускается только после получения отрицательного результата бактериологического исследования на наличие возбудителя дифтерии.

В случае необходимости для быстрой изоляции большого количества больных дифтерией и выявленных носителей в части необходимо подготовить специальные помещения, оснащенные необходимым медицинским, хозяйственным имуществом и средствами ухода (нештатный изолятор). В этой ситуации решение на его развертывание принимает начальник медицинской

службы гарнизона (округа), выделяющий для усиления медицинской службы и организации противоэпидемических и лечебно-диагностических мероприятий эпидемиолога, инфекциониста и других специалистов, а также необходимые силы и средства.

На воинскую часть, в которой появились заболевания дифтерией, накладывается обсервация сроком на 10 суток с момента изоляции последнего больного и проведения заключительной дезинфекции. При этом прекращаются (или максимально ограничиваются) увольнения личного состава, запрещается проведение общих собраний и зрелищных мероприятий. В очагах дифтерии производится текущая и заключительная дезинфекция всех предметов и вещей, которые могут быть инфицированы выделениями больного (стены и пол помещений, в которых находился больной, его нательное и постельное белье, обмундирование, носовые платки, полотенца, посуда, емкости для сбора выделений). Обеззараживают также постельные принадлежности и кровати лиц, находившихся в непосредственной близости от больного в спальном помещении. Для этой цели в зависимости от характера обеззараживаемых объектов можно использовать осветленные растворы хлорной извести, ДТС-ГК, растворы хлорамина в концентрациях, применяемых для уничтожения вегетативных форм микробов (приложение 2). Вещи из тканей можно дезинфицировать кипячением или камерным способом по режимам, разработанным для вегетативных форм возбудителей. Личный состав в очаге проходит внеочередную помывку со сменой нательного и постельного белья, которую предваряет медицинский осмотр (выявление больных, в том числе дифтерией кожи).

Усиливается медицинский контроль за выполнением военнослужащими требований личной и общественной гигиены, за содержанием жилых и служебных помещений. В наряд на кухню не допускаются военнослужащие, перенесшие в течение предшествующего месяца ангины, острые респираторные инфекции, а также лица с хроническим тонзиллитом, с гнойничковыми поражениями кожных покровов. В комплексе противоэпидемических мероприятий существенную роль должна играть санитарно-просветительная работа.

Вспышки дифтерии в войсках нередко возникают вследствие диагностических ошибок из-за недостаточного знакомства медицинского состава с клиникой этого заболевания и неполного проведения в срок противоэпидемических мероприятий. В связи с этим большое значение приобретает специальная подготовка медицинской службы по вопросам диагностики дифтерии, организации и проведения противоэпидемических мероприятий в части.



**ИНСТРУКЦИЯ**  
**ПО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ НА**  
**ДИФТЕРИЮ**

**ВЗЯТИЕ И ДОСТАВКА МАТЕРИАЛА**

При проведении исследования на дифтерию необходимо во всех случаях брать материал из ротоглотки и носа. При дифтерии редких локализаций (глаз, ухо, рана, кожа, половые органы), помимо пораженных участков, следует брать материал также с миндалин и из носа. Материал для исследования берут до начала лечения антибиотиками. Взятие мазков должно производиться специально обученным персоналом.

Для взятия материала используют сухие стерильные ватные тампоны. Материал из ротоглотки и носа берут отдельными тампонами, натошак или не ранее, чем через 2 часа после еды, при хорошем освещении, с использованием шпателя, не касаясь тампоном зубов, слизистой щек и языка. Одним тампоном собирают материал с пораженных участков ротоглотки - миндалин, а при необходимости - с небных дужек, задней стенки глотки. При наличии налетов материал следует брать с границы здоровых и пораженных тканей, слегка нажимая на них тампоном, т.к. большинство жизнеспособных коринебактерий находится в глубоких слоях псевдомембраны, и поверхностный мазок может не содержать их.

Тампоны должны быть доставлены в лабораторию не позднее 3-х часов с момента взятия материала. При невозможности произвести доставку и посев материала в указанный срок, его необходимо засеивать на чашки с питательной средой или в транспортную среду на месте взятия. Применение транспортной среды удлиняет срок выдачи окончательного ответа на одни сутки, однако использование питательного бульона в качестве транспортной среды позволяет

применить экспресс-методы выявления дифтерийного токсина для выдачи предварительного ответа (иммуоферментный метод, реакцию непрямо́й гемагглютинации). При транспортировании на дальние расстояния можно использовать тампоны, предварительно смоченные 5% раствором глицерина на физиологическом растворе, рН которого доводят до 7,6 20% раствором. В осенне-зимнее время года материал доставляют в лабораторию в термоконтейнерах.

Каждой пробирке с исследуемым материалом (зев, нос, другая локализация) придается номер. В прилагаемом сопроводительном документе указывается номер пробирки, фамилия, имя, возраст, название учреждения, направляющего материал, цель обследования (диагностическая, по эпид. показаниям, профилактическое обследование), дата и время взятия материала.

## ХОД ИССЛЕДОВАНИЯ

### ПЕРВЫЙ ДЕНЬ

Микроскопия окрашенного по Граму мазка из нативного материала не является обязательной процедурой из-за низкой диагностической ценности. Коринебактерии дифтерии не могут быть надежно идентифицированы от сапрофитов с помощью данного метода, который также имеет низкую чувствительность. Однако его целесообразно использовать при подозрении на дифтерию редких локализаций.

1. Материал от одного лица засевают на чашку с селективной дифференциальной средой (кровяно-теллуритовым агаром), используя при этом половину чашки для посева материала из зева, а вторую половину - из носа. При обследовании на дифтерию редких локализаций, добавляется еще одна чашка для посева клинического материала. Для повышения вероятности обнаружения возбудителя первичный посев следует производить дополнительно еще на одну чашку с другой селективной средой (Тинсдаля, Бучина) и чашку с кровяным агаром. Не допускается посев материала от нескольких лиц на одну чашку.

2. При посеве материал втирают в среду со всех сторон тампона на участке площадью приблизительно 2x1 см и затем частыми непрерывными штрихами, не изменяя положения тампона, засевают оставшуюся поверхность половины чашки.

3. Засеянные чашки или пробирки с транспортной средой помещают в термостат при 37<sup>0</sup>С. Высев из транспортной среды производят на следующие сутки на плотную питательную среду тампоном, отжатым о стенки пробирки, или петлей (что гораздо лучше и надежнее), взяв материал из осадка.

4. Посев следует производить на среды, согретые при комнатной температуре или в термостате. Свежеприготовленные среды необходимо подсушить в термостате 20-30 минут.

## ВТОРОЙ ДЕНЬ

5. Колонии, выросшие на чашках, просматривают через 24 часа после посева материала с помощью микроскопа бинокулярного стереоскопического (МБС) или лупы.

Чашки с колониями, похожими на колонии коринебактерии дифтерии, отбирают для дальнейшей идентификации культуры по всем тестам.

Колонии, подозрительные на принадлежность к *C. diphtheria*, *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, через 24 часа роста на средах с теллуридом калия имеют черный или с серым оттенком цвет, обычно мелкие, не более 2 мм в диаметре, выпуклые, вязкие или крошащиеся при прикосновении петлей. На кровяном агаре колонии серые или слегка кремовые, могут быть окружены небольшой зоной гемолиза. На среде Бучина подозрительные колонии имеют синий цвет, а среда в месте их роста приобретает фиолетовый оттенок. На агаре Тинсдаля колонии черного цвета и, в дополнение, *C. diphtheria*, *C. ulcerans*, иногда *C. pseudotuberculosis* образуют коричневый ореол вокруг колонии. Колонии черного цвета на средах с солями теллура могут формировать и некоторые другие бактерии (например, стрептококки и стафилококки).

6. Из сомнительных колоний готовят мазки и окрашивают их метиленовой синью Леффлера. Если при микроскопии обнаруживают палочки, характерные для рода коринебактерий, то эти колонии отбирают для дальнейшей идентификации. При обнаружении кокков, дрожжей, споровых палочек дальнейшее исследование можно прекратить.

7. В случае роста подозрительных однотипных колоний необходимо приступить к их идентификации (определение токсигенных свойств, цистеназы) и выделению чистой культуры на скошенном сывороточном агаре. Токсигенные свойства изучают не менее чем у двух колоний путем посева одной половины каждой колонии на среду для определения токсигенности и, необожженной петлей, на среду Пизу, а другой половиной колонии - в пробирку со скошенным сывороточным агаром для накопления чистой культуры. При невозможности снять половину колонии. Для посева на токсигенность и на среду Пизу используется материал целой колонии; посев на скошенный агар исключается и, в дальнейшем, используется культура из пробирки с пробой Пизу или из бляшки, выросшей на среде для определения токсигенности через 48 часов роста или через 24 часа в случае выявления токсигенных свойств.

Если на чашке первичного посева вырастает множество подозрительных колоний, крайне важно изучить токсигенные свойства, по возможности, у максимального числа колоний (не менее 10), смешивая по 5-10 однотипных колоний в одну бляшку.

8. При наличии множественного роста подозрительных колоний, можно поставить РНГА или ИФА (после субкультивирования колоний 5-18 часов на сывороточном бульоне), использовать дополнительную пробу Заксе или индикаторный диск для определения ферментации мочевины (3-5 однотипных колоний, учет через 0,5-2 часа инкубации) или пробу Пизу на модифицированной среде (5-6 однотипных колоний, учет через 3 часа инкубации).

При характерной для коринебактерии дифтерии морфологии колоний, морфологии клеток при микроскопии, отрицательной пробе Заксе, положительной пробе Пизу, положительном результате РНГА или ИФА можно выдать

предварительный ответ об обнаружении культуры, подозрительной на коринебактерии дифтерии через 36-48 часов (на третьи сутки) с момента первичного посева исследуемого материала.

9. Чашки с первичным посевом исследуемого материала после просмотра на вторые сутки, вновь помещают в термостат на 24 часа и просматривают их повторно.

### ТРЕТИЙ ДЕНЬ

10. Через 24 часа просматривают чашки с посевами на токсигенность в проходящем свете и на темном фоне. Выделенная культура считается токсигенной, если образовавшиеся линии преципитации контрольного и исследуемого штаммов, сливаясь концами, плавно переходят одна в другую.

При наличии специфических линий преципитации, положительной пробе на цистеназу выдают документированный предварительный ответ о выделении токсигенной культуры коринебактерии дифтерии.

При отсутствии специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности, чашки инкубируют еще 24 часа.

11. Культуру, выросшую на скошенном сывороточном агаре или с пробы Пизу (после определения ее чистоты), засевают на среды для определения биохимического варианта (сахароза, глюкоза, крахмал) и ферментации мочевины.

12. Чашки с первичным посевом просматривают повторно через 36-48 часов инкубации. При отсутствии колоний, подозрительных на коринебактерии дифтерии, выдают окончательный ответ, что коринебактерии дифтерии не выявлены.

При обнаружении подозрительных колоний проводят идентификацию культуры, определяют токсигенные свойства, цистеназную активность и выделяют чистую культуру (см. второй день исследования).

Иногда коринебактерии дифтерии вырастают на чашках первичного посева через 72 часа и позднее, поэтому следует осторожно относиться ко времени

выдачи отрицательного ответа. Если материал для исследования был взят от больного подозрительного на дифтерию, необходимо произвести повторное взятие и исследование материала от этого больного.

Полное отсутствие роста на чашках первичного посева колоний каких-либо микроорганизмов свидетельствует о нарушении правил взятия, доставки, посева и культивирования исследуемого материала.

#### ЧЕТВЕРТЫЙ ДЕНЬ (или ПЯТЫЙ)

13. Повторно (через 48 часов) учитывают результаты теста на токсигенность, поставленного на второй день исследования. Одновременно производят учет сахаролитических свойств и уреазной активности в тестах, поставленных на третий день исследования.

При отсутствии специфических линий преципитации через 48 часов инкубации чашек со средой для определения токсигенности, но при положительных результатах проб на цистеназу, глюкозу, отрицательных результатах ферментации сахарозы и определения уреазной активности, культуру идентифицируют как коринебактерии дифтерии нетоксигенные, с указанием биохимического типа (см. таблицу 9).

В случае выделения токсигенных коринебактерий дифтерии и выдачи предварительного ответа на третий день, окончательный ответ с указанием биотипа выдается на четвертый или пятый день (через 72-96 часов с момента первичного посева исследуемого материала).

Биологические свойства коринебактерий, используемые при идентификации

Таблица 9

Вид	Токиген	Ферментация					Редук-
корине- бактерий	-ные свойств а	цистина	глюкоз	сахароз	крахма-	мочеви-	Редук- ция нитрато в
					мальто-		

			Ы	Ы	ла	НЫ	ЗЫ	
<i>C.diphtheria</i>								
, var.gravis	+/-	+	+	-	+	-	+	+
var.mitis *	+/-	+	+	-	-	-	+	+
intrmedius	+/-	+	+	-	-	-	+	+
<i>C.ulcerans</i>	+/-	+	+	-	+	+	+	-
<i>C.pseudotuberculosis</i>	+/-	+	+	-	-	+	+	v
<i>C.pseudodiphthericum</i>	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>C.xerosis</i>	-	-	+	+	-	-	+	+

Примечание:

+, 90% и более штаммов положительны в течение 2 дней;

-, 90% и более штаммов отрицательны;

v, более 10%, но менее 90% штаммов положительны;

\*, биотип *mitis* включает штаммы ферментирующие сахарозу и не редуцирующие нитраты (вариант *belfanti*), которые встречаются редко

**Таким образом, выделенные коринебактерии являются возбудителями дифтерии, если они обладают токсигенными свойствами, ферментируют глюкозу, крахмал, цистин; не ферментируют сахарозу и мочевины, а также имеют характерные морфологические и культуральные свойства.**

## СРОКИ ВЫДАЧИ И ФОРМУЛИРОВКА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. Предварительный ответ об обнаружении культуры, подозрительной на коринебактерии дифтерии, выдается через 24-48 часов с момента первичного посева исследуемого материала при характерной для коринебактерий дифтерии морфологии бактериальных клеток и морфологии колоний, отрицательной пробе Заксе, положительной пробе Пизу, выявлении токсина методами иммуноиндикации, в частности, РНГА, ИФА, РНАт (методика последней изложена в приложении 5 к приказу МЗ СССР 1986 г. № 450), либо при выявлении гена токсинообразования (tox -гена) с помощью геноиндикации - полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. При обследовании на бактерионосительство с профилактической целью, а также при исследовании материала из мест редкой локализации дифтерии предварительный ответ не выдается. В этих случаях выдается только окончательный ответ, основанный на идентификации выделенных культур по всем свойствам.

3. Окончательный ответ при обследовании лиц всех категорий в случае роста коринебактерии дифтерии на чашках первичного посева через 24 часа может быть выдан через 48 часов (культура токсигенная) или через 72 часа (культура нетоксигенная). В тех случаях, когда колонии на чашках первичного посева появляются позднее, чем через 24 часа, ответ выдается, соответственно, позднее (до 96 часов). При применении транспортных сред срок выдачи ответа отодвигается еще на 24 часа.

4. Формулировка окончательного ответа при положительном анализе: «Выделены токсигенные (или нетоксигенные) дифтерийные палочки». При этом указывается биохимический вариант коринебактерий дифтерии.

5. При наличии линий преципитации, идентичных специфическим линиям контрольного штамма коринебактерий дифтерии, положительных проб на уреазу,



цистеназу, ферментации глюкозы и крахмала, отсутствии ферментации сахарозы, редукации нитратов в нитриты культуру относят к виду *C. ulcerans*, токсигенный вариант (см. таблицу 9). Эти штаммы следует направлять в специализированную лабораторию для дальнейшего изучения.

В случае идентификации *C. ulcerans*, нетоксигенный вариант, выдают отрицательный ответ. Обнаружение коринебактерий Гофмана или других дифтероидов также дает возможность считать ответ отрицательным.

6. Во всех случаях обнаружения дифтерийных палочек лаборатория обязана известить учреждение, из которого был доставлен материал, и районного эпидемиолога.

7. При передаче ответа по телефону необходимо записывать дату передачи и фамилии лиц, передавших и принявших телефонограмму.

## **МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ДИФТЕРИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ**

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИГЕННЫХ СВОЙСТВ КОРИНЕБАКТЕРИЙ ДИФТЕРИИ С ПОМОЩЬЮ РЕАКЦИИ ПРЕЦИПИТАЦИИ В ГЕЛЕ**

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

Токсигенность коринебактерий дифтерии определяют, как правило, в чистой культуре (отдельные колонии или культура со скошенного агара, или с пробы Пизу). Смесь колоний или культуры, загрязненные посторонней микрофлорой, могут также быть испытаны на токсигенность. При отсутствии, в

этом случае, преципитата в агаровом геле, опыт следует повторить с выделенными чистыми культурами.

Для постановки пробы на токсигенность необходимо иметь: стерильные чашки Петри с ровным дном, питательную среду - агар Мартена или сухую коммерческую среду, стерильные полоски из фильтровальной бумаги размером 1,5 x 8 см, нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота, противодифтерийную антитоксическую сыворотку или очищенный ферментализом и специфической сорбцией дифтерийный антитоксин (антитоксин диагностический дифтерийный очищенный, сухой, изготовитель - НПО «Биомед», 614099, Пермь, ул. Братская 177, тел. 48-57-22), контрольный токсигенный штамм коринебактерий дифтерии 24-48-часового роста (для постановки пробы на токсигенность пересеивается в условиях лаборатории каждые сутки).

#### *Приготовление чашек для постановки пробы на токсигенность*

При небольшом объеме работы питательный агар для определения токсигенности коринебактерий дифтерии целесообразно разливать в пробирки по 10 мл (количество, необходимое для приготовления одной чашки). Питательный агар, разлитый во флаконы, требует многократного расплавления, а длительное термическое воздействие значительно ухудшает его качества. Питательный агар расплавляют в водяной бане при 90<sup>0</sup> С, тотчас вынимают из бани, охлаждают до 50<sup>0</sup> С и добавляют 20% сыворотки крови крупного рогатого скота. Так, к 10 мл питательного агара добавляют 2 мл сыворотки крови крупного рогатого скота, перемешивают и выливают, соблюдая правила асептики, в стерильную чашку Петри, распределяют среду по дну осторожным вращением чашки. В центр чашки, на поверхность застывающего агара обожженным пинцетом помещают фильтровальную бумажку, пропитанную противодифтерийной антитоксической сывороткой или очищенным антитоксином. Чашку просушивают в термостате при 37<sup>0</sup> С в течение 15-20 мин, повернув ее вверх дном.

Чашки со средой для определения токсигенности (без фильтровальной бумажки) можно хранить в холодильнике в течение одних суток.

### *Приготовление бумажных полосок*

Полоски фильтровальной бумаги нарезают размером 1,5 х 8 см, заворачивают по 2-4 штуки в пакетик и стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 30 мин. Сохраняют пакетики с бумажными полосками в стерильной крышке чашки Петри до 3-х недель.

Перед постановкой пробы на токсигенность фильтровальные бумажки обожженным пинцетом помещают в стерильную чашку Петри. На каждую полоску наносят 0,25 мл противодифтерийной антитоксической сыворотки или очищенного антитоксина, активностью 500 МЕ в 1 мл. Для удаления избытка сыворотки полоску прикладывают к стерильной чашке Петри.

### *Разведение противодифтерийной антитоксической сыворотки*

Соблюдая правила асептики, противодифтерийную антитоксическую сыворотку или очищенный антитоксин переносят из ампул в стерильную пробирку. На пробирке указывают данные этикетки и срок хранения. Хранят сыворотку в холодильнике.

Сыворотка должна быть разведена стерильным физиологическим раствором до содержания 500 МЕ в 1 мл. Коммерческий препарат «Противодифтерийная антитоксическая сыворотка» может иметь различную активность (5000 МЕ, 10000 МЕ, 20000 МЕ) и различный объем.

### *Примеры разведения сыворотки*

*Пример 1.* В ампуле содержится 10000 МЕ (в объеме 4,8 мл, как указано на этикетке коробки с ампулами), противодифтерийной антитоксической сыворотки. Для упрощения расчетов общий объем сыворотки можно принять за 50 мл. Следовательно, в 1,0 мл сыворотки содержится 2000 МЕ ( $10000 \text{ МЕ} : 5 = 2000$

МЕ). Чтобы получить 500 МЕ в 1 мл, следует 1 мл сыворотки развести в 4 раза, т.е. к 1 мл сыворотки добавить 3 мл стерильного физиологического раствора. При необходимости можно развести сыворотку в меньших объемах: к 0,1 мл сыворотки добавить 0,3 мл физиологического раствора или к 0,2 мл сыворотки добавить 0,6 мл физиологического раствора и т.д.

*Пример 2.* Разведение сыворотки можно выполнить другим способом. Если, например, в ампуле содержится 5000 МЕ сыворотки в объеме 2,5 мл, то 500 МЕ содержится в 0,25 мл сыворотки. К этому объему добавляют 0,75 мл стерильного физиологического раствора и получают разведение 500 МЕ в 1 мл.

Очищенный ферментализом и специфической сорбцией дифтерийный антитоксин разведения не требует, т.к. в 1 мл этого препарата содержится 500 МЕ.

На пропитывание одной полоски фильтровальной бумаги требуется 0,25 мл сыворотки (100-125 МЕ). Разведенную сыворотку можно хранить до 7 дней в холодильнике.

### **Постановка пробы**

Культуру засевают в виде бляшек диаметром 0,6-0,7 см на расстоянии 0,7-0,8 см друг от друга и 0,5 см от края полоски фильтровальной бумаги.

На одну чашку следует засеять не более 10 бляшек. Из них - 6 бляшек испытуемой культуры, 4 - контрольного штамма (рис. 1). Чашки с посевом помещают в термостат при 37<sup>0</sup> С.

### **Учет результатов**

Результат учитывают через 18-24 часа и 48 часов роста. Следует иметь в виду, что препарат противодифтерийной антитоксической сыворотки не является моновалентным и содержит, помимо антител к дифтерийному токсину, антитела к антигенам микробной клетки. Поэтому, при постановке пробы на токсигенность с использованием данного препарата, преципитаты могут образовываться не только в результате связывания токсина с антитоксином (специфические преципитаты), но и при взаимодействии антибактериальных антител с компонентами клетки коринебактерий дифтерии (неспецифические преципитаты). Последние могут

формироваться как у токсигенных, в том числе и контрольного штамма, так и нетоксигенных штаммов коринебактерий дифтерии. Иногда отмечается появление множественных линий преципитации. Неспецифические преципитаты, как правило, слабо выражены, имеют нечеткие контуры, появляются чаще через 48-72 часа, но иногда могут появляться и на первые сутки. Критерием оценки специфичности преципитатов является слияние линий преципитации испытуемого штамма с таковыми контрольного токсигенного штамма. В тех случаях, когда у контрольного штамма формируется несколько линий преципитации, специфическими следует считать более четкие и рано появляющиеся преципитаты. Поэтому просмотр чашек с пробой на токсигенность осуществляют через 18-24 часа с момента ее постановки. Если в течение данного времени у контрольного штамма линии преципитации не обнаруживаются, это свидетельствует о нарушении условий постановки реакции.

Наблюдаются следующие варианты оценки результатов реакции:

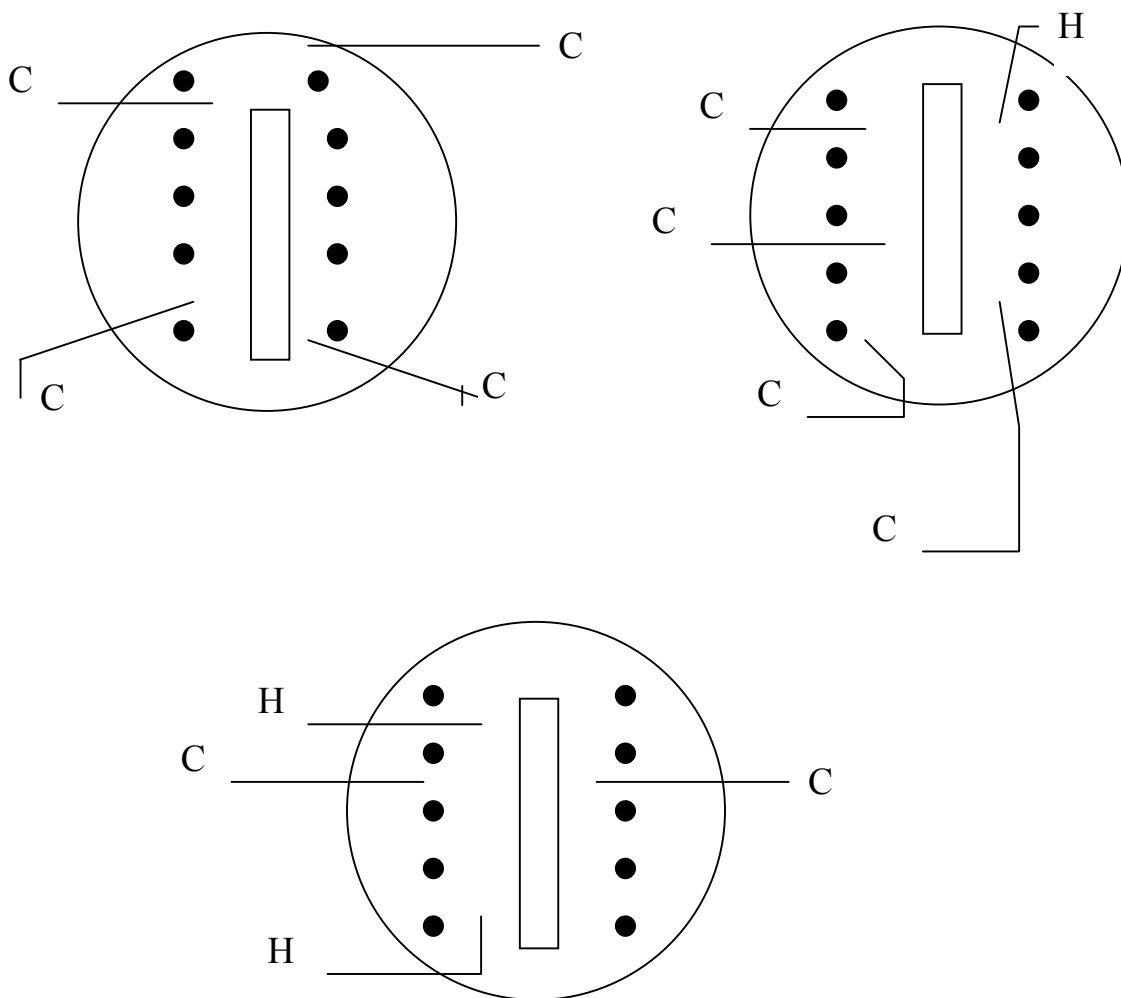
1. Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются токсигенными, если образуемые ими линии преципитации сливаются или имеют тенденцию к слиянию с соответствующими специфическими линиями контрольного токсигенного штамма.

Пример постановки и учета реакции преципитации в геле для определения токсигенности коринебактерий дифтерии из 4-х анализов (№ 14, 15, 20, 26)

Рисунок 1

Условные обозначения: К - посев контрольного токсигенного штамма, С - специфические преципитаты, Н - специфические преципитаты, цифрами обозначены испытуемые штаммы (анализов).

14-1 и 14-2 - две колонии из одного анализа (№ 14) по 1/2 каждой поставлены слева от фильтровальной бумаги, справа - «бляшки» 14-3 и 14-4 из пяти колоний каждая, вся культура анализа № 14 - токсигенная. Из анализа № 15 сделано 6 «бляшек», т.к. выросло много подозрительных колоний. Слева от фильтровальной бумаги «бляшки» № 15-1, 15-2 и 15-3 из трех отдельных колоний (по 1/2 каждая) оказались токсигенными (15-1 и 15-2) и нетоксигенной (15-3). Следовательно, в анализе № 15 смешанная культура коринебактерий дифтерии - токсигенные и нетоксигенные. В анализе № 20 «бляшки» из 1/2 колонии (№ 20-1) и из двух колоний (№ 20-2). Культура из анализа № 20 - нетоксигенная. В анализе № 26-4 «бляшки» - слева № 26-1 и 26-2 (по 1/2 отдельных колоний), справа № 26-3 и 26-4 - смеси из 3-х колоний. Культура из анализа № 26 - токсигенная



2. Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются нетоксигенными, если:

а) линии преципитации, образуемые испытуемой культурой, отсутствуют, при наличии специфических линий преципитации у контрольного штамма;

б) линии преципитации не могут слиться со специфическими линиями преципитации контрольного штамма, а скрещиваются или имеют тенденцию к скрещиванию с ними (неидентичные, неспецифические линии);

в) линии преципитации испытуемой культуры сливаются с неспецифическими линиями контрольного штамма;

г) линии преципитации испытуемой культуры перекрещиваются со специфическими линиями и сливаются с неспецифическими линиями контрольного штамма.

Очищенный ферментализом и специфической сорбцией антитоксин не содержит антител к компонентам микробной клетки, и при использовании этого препарата неспецифических линий преципитации не образуется.

#### **Хранение контрольного штамма в лаборатории**

Для хранения контрольного штамма в лаборатории можно использовать 0,1% полужидкий сывороточный агар, приготовленный на бульоне Мартена или другом питательном бульоне (рН - 7,6). Хранить в холодильнике, пересев 1 раз в 2-3 месяца. Полужидкий агар разливают по 8 мл в пробирки и добавляют по 1 мл сыворотки крупного рогатого скота. Контрольный штамм получают в Государственном НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А.Тарасевича. В пробе на токсигенность нельзя использовать в качестве контрольного производственный штамм РW-8 и его варианты. Контрольный штамм необходимо периодически пассировать на кровяном агаре.

## МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ

### **Определение цистиназной активности (проба Пизу)**

Коринебактерии дифтерии и коринебактерии ульцеранс, в отличие от ложнодифтерийной палочки и других дифтероидов, обладают ферментом цистиназой (см. табл. 9).

Испытуемую культуру засевают уколом в питательную среду для определения цистиназы, разлитую в узкие пробирки столбиком высотой 4 см. В составе питательной среды имеется цистин и уксуснокислый свинец. В процессе роста культура продуцирует цистиназу, расщепляющую цистин, а образующийся при этом сероводород вступает в реакцию с уксуснокислым свинцом, который превращается в сернокислый свинец - соединение темно-коричневого цвета. Коринебактерии дифтерии и коринебактерии ульцеранс вызывают не только почернение среды по ходу укола, но и образуют вокруг него облачко темно-коричневого цвета на расстоянии примерно 1 см от поверхности среды. Результат реакции учитывают через 24 часа. Для получения ускоренного ответа (через 3 часа) среду инокулируют большим количеством культуры. Одновременно с испытуемыми культурами производится посев контрольного штамма в отдельную пробирку.

### **Определение уреазной активности**

Ложнодифтерийные палочки, коринебактерии ульцеранс и некоторые другие микроорганизмы рода *Corynebacterium* обладают способностью продуцировать в процессе роста фермент уреазу и расщеплять мочевины. Коринебактерии дифтерии такой способностью не обладают (см. табл. 9).

Пробу на уреазу можно ставить в двух вариантах - путем посева на бульон с мочевиной (а) и по методу Заксе (б).



а) Чистую культуру коринебактерии дифтерии засевают в бульон с мочевиной, разлитый в пробирки по 2-3 мл и помещают в термостат, результат учитывают через 24 часа инкубации при 37 градусах.

б) Для определения уреазы по методу Заксе ex tempore смешивают одну часть реактива А и 19 частей реактива В. Смесь разливают в узкие пробирки по 0,1 мл и вносят одну петлю испытуемой чистой культуры или несколько однотипных колоний с чашки первичного посева. Результат учитывают после инкубации в термостате при 37 градусах в течение 60 мин.

Фермент уреазы расщепляет мочевину с образованием аммиака и углекислоты. При этом повышается рН среды и происходит изменение цвета индикатора (покраснение). При отсутствии у исследуемой культуры этого фермента окрашивание среды не происходит. Рекомендуется одновременно, в отдельную пробирку, засеять контрольный штамм.

#### **Определение сахаролитической активности**

Для определения сахаролитической активности коринебактерий дифтерии используют среды Гисса с углеводами - сахарозой, глюкозой, растворимым крахмалом. Каждую пробирку со средой Гисса инокулируют одной петлей культуры. Результат учитывают через 24 часа, а при отрицательном крахмальном признаке - через 48 часов культивирования посевов в термостате при 37<sup>0</sup> С.

При сбраживании того или иного углевода образуется кислота и происходит восстановление обесцвеченного фуксина, и среда приобретает малиновую окраску. Рекомендуется одновременно ставить пробу с контрольным штаммом коринебактерий дифтерии варианта *gravis*.

#### **Определение нитратредуктазной активности**

Способность коринебактерий дифтерии восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты) является дополнительным признаком, позволяющим дифференцировать коринебактерии ульцеранс.

Производят посев исследуемой культуры в пробирку с нитратным бульоном, инкубируют посев в течение 24 часов и добавляют 2-3 капли реактива на нитриты (Грисса или Касаткина). В случае, если произошло образование нитритов, среда окрашивается в красный цвет. Если микроорганизм не обладает нитратредуктазой, изменения окраски среды не происходит. Одновременно с опытными пробирками инкубируют контрольную пробирку со стерильной средой.

## МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

### **Транспортная среда**

В качестве основы для приготовления транспортной среды используют 0,1% питательный агар на переваре Хоттингера (способ приготовления перевара Хоттингера см. в «Справочнике по микробиологическим и вирусологическим методам исследования». Под ред. М.О.Биргера, М., 1982) или 0,1% агар на коммерческом питательном бульоне, рН - 7,6.

Полужидкую 0,1% агаровую основу разливают в пробирки по 3-4 мл, стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 20 мин. Срок хранения - до 1 мес при 4<sup>0</sup>. Перед употреблением в каждую пробирку, с соблюдением правил асептики, добавляют 0,5 мл сыворотки крупного рогатого скота и по 0,05 мл (1 капля) 2% -ного раствора теллурита калия. Среду выборочно контролируют на стерильность в термостате при 37<sup>0</sup> в течение 48 часов. Срок хранения готовой среды - 10 дней при 4<sup>0</sup>.

### **Жидкая питательная среда для постановки РПГА и ИФА**

С целью идентификации дифтерийного токсина в РПГА, ИФА материал из зева и носа или чистую культуру засевают в пробирки с 3 мл жидкой сывороточной питательной среды, приготовленной на одной из следующих питательных основ: бульон Хоттингера, Мартена, коммерческие - СПБ, ГРМ с содержанием аминного азота 150-180 мг/%, рН - 7,6. Питательную основу

разливают в пробирки по 3-4 мл, стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 20 мин. Срок хранения - до 1 мес при 4<sup>0</sup>.

Перед употреблением в каждую пробирку с соблюдением правил асептики добавляют 0,5 мл сыворотки крупного рогатого скота и по 0,05 мл (1 капля) 2% -ного раствора теллурита калия. Среду контролируют и хранят также, как и полужидкую транспортную среду.

### **Среды для первичного посева исследуемого материала**

#### *Среда Клауберга II*

К 100 мл стерильной питательной агаровой основы (рН - 7,6), расплавленной и охлажденной до 50<sup>0</sup>, добавляют 3 мл 2% -ного раствора теллурита калия, 10 мл глицериновой смеси и 50 мл «лаковой» крови. Принимая во внимание, что питательная среда разводится глицериновой смесью и «лаковой» кровью в 1,6 раза, при приготовлении данной среды следует увеличить навеску сухого питательного агара в 1,6 раза.

*Пример расчета.* На этикетке флакона с сухим коммерческим питательным агаром указана навеска, необходимая для приготовления 1 л среды, например, 30 г. Для приготовления 1 л питательной основы для среды Клауберга II следует взять навеску 48 г (т.е. 30 г x 1,6 = 48 г).

*Для приготовления глицериновой смеси* к 40 мл дефибринированной крови или кровяной смеси добавляют 20 мл химически чистого стерильного глицерина (глицерин стерилизуется при температуре 110<sup>0</sup> С в течение 30 мин).

*Для приготовления «лаковой» крови* к 34 мл стерильной дистиллированной воды добавить 16 мл дефибринированной крови.

#### *Кровяно-теллуриновый агар (КТА)*

К 100 мл стерильной питательной агаровой основы (рН - 7,6), расплавленной и охлажденной до 50<sup>0</sup>, добавляют 2 мл 2% -ного раствора теллурита калия и 7 мл дефибринированной или 10 мл гемолизированной крови.

Вместо крови можно использовать кровяную теллуритовую смесь (10 мл на 100 мл среды), однако при этом на 100 мл КТА добавляют не 2, а 1 мл 2% -ного раствора теллурита калия. Принимая во внимание, что питательная среда разводится кровью примерно в 1,1 раза, при приготовлении данной среды следует увеличить навеску сухого питательного агара в 1,1 раза.

*Пример расчета.* На этикетке флакона с сухим коммерческим питательным агаром указана навеска, необходимая для приготовления 1 л среды, например, 30 г. Для приготовления 1 л питательной основы для КТА следует взять навеску 33 г (т.е.  $30 \text{ г} \times 1,1 = 33 \text{ г}$ ).

*Среда Клауберга II и кровяно-теллуритовый агар на аминокептиде*

Состав агаровой основы на аминокептиде для среды Клауберга II (расчет на 1 л):

1. Аминокептид.....0,35 л
2. Дистиллированная вода .....0,65 л
3. Сухой экстракт кормовых дрожжей (ЭКД)..... 5,0 г
4. Хлорид натрия.....4,0 г
5. Агар-агар.....24,0 г
6. L-цистеина гидрохлорид.....0,01 г
7. Активированный уголь.....3,0 г

Состав агаровой основы на аминокептиде для кровяно-теллуритового агара (расчет на 1 л):

1. Аминокептид.....0,25 л
2. Дистиллированная вода.....0,75 л
3. Сухой экстракт кормовых дрожжей (ЭКД)..... 5,0 г
4. Хлорид натрия.....4,0 г
5. Агар-агар.....18,0 г
6. L-цистеина гидрохлорид.....0,01 г
7. Активированный уголь.....3,0 г

Аминопептид разводят дистиллированной водой, добавляют хлорид натрия, агар-агар и кипятят до расплавления агара, добавляют ЭКД, размешивают до полного его растворения, устанавливают pH-7,8 с помощью 20% раствора NaOH. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, доводят до первоначального объема дистиллированной водой, добавляют L-цистеина гидрохлорид (можно также использовать L-цистеин, растворенный в 0,1 N растворе HCl) и активированный уголь.

Приготовленные питательные агаровые основы разливают в стерильные флаконы и стерилизуют при 0,5 атм 30 мин. Сохраняются питательные основы при 4<sup>0</sup> в течение 2 месяцев.

Среда Клауберга II и кровяно-теллуритовый агар готовятся на соответствующих питательных агаровых основах по вышеуказанным прописям.

#### *Методика приготовления кровяных и кровяно-теллуритовых смесей*

Для приготовления питательных сред лучше всего использовать дефибринированную кровь животных - крупного рогатого скота, лошадей, свиней, овец, кроликов. Кровь собирают в стерильные сосуды с бусами, с помощью специально смонтированной системы, тщательно соблюдая правила асептики.

Можно использовать кровь человека с истекшим сроком годности (цитратную и с консервантами), приготовив из нее специальные кровяные смеси. При использовании такой крови, следует удалить жидкую часть отстоявшейся крови, содержащую цитрат натрия, консерванты. К отстоявшейся в сосуде эритроцитарной массе добавить стерильный физиологический раствор или сыворотку крупного рогатого скота до первоначального объема и теллурит калия.

Хорошим сырьем для получения кровяной смеси служит эритроцитарная масса, которая остается после производства гамма-глобулина. К эритроцитарной массе добавляют стерильный физиологический раствор из расчета 1/5 объема эритроцитарной массы и теллурит калия.

Можно также использовать кровяные сгустки, остающиеся от производства гамма-глобулина, после серологических реакций (при отрицательном результате реакций), сгустки плацентарной или абортной крови. Сгустки собирают в стеклянные бутылки с бусами, затем сгустки разбивают. Если сгустки не удается разбить бусами, их замораживают и оттаивают, после чего сгустки легко разрушаются. Эту процедуру можно повторить 2-3 раза. Затем добавляют стерильный физиологический раствор из расчета 1/5 объема сгустков и теллурид калия.

Теллурид калия добавляют к крови или кровяной смеси в качестве консерванта. К каждой порции крови или кровяной смеси в 10 мл, добавляемой к 100 мл агара, приливают 1 мл 2%-ного раствора теллурида калия. Такую кровяно-теллуридовую смесь можно сохранять при 4<sup>0</sup> до 2-х месяцев.

*Пример расчета.* К 200 мл эритроцитарной массы, после удаления 50 мл жидкой части отстоявшейся крови, добавляют такое же количество – 50 мл физиологического раствора или сыворотки крупного рогатого скота (без консерванта). Таким образом, получается 250 мл кровяной смеси, что достаточно для приготовления 2,5 л КТА. Для консервирования 250 мл кровяной смеси необходимо добавить 25 мл 2%-ного раствора теллурида калия.

В дальнейшем, при приготовлении кровяно-теллуридовой среды, на каждые 100 мл растопленного и охлажденного до 50<sup>0</sup> питательного агара добавляют 10 мл консервированной теллуридом калия кровяной теллуридовой смеси и 1 мл 2%-ного теллурида калия.

#### *Приготовление раствора теллурида калия ( $K_2TeO_3$ )*

Для приготовления теллуридовых сред используют готовый коммерческий 2%-ный раствор теллурида калия.

При отсутствии готового раствора теллурида калия его готовят следующим образом. В 100 мл дистиллированной воды растворяют 2 г теллурида калия. Для стерилизации раствор прогревают в кипящей водяной бане 30 мин и сохраняют

при температуре 4<sup>0</sup>. Кристаллический теллурид калия хранят герметически закрытым в банке из темного стекла.

### **Сывороточный агар**

Сывороточный агар, используемый для отсева колоний и культивирования коринебактерий дифтерии, может быть приготовлен на любой из перечисленных выше питательных основ.

К 100 мл расплавленной и охлажденной до 50<sup>0</sup> питательной основе (рН 7,6) стерильно добавляют 10 мл сыворотки крупного рогатого скота. Среду перемешивают, разливают в стерильные пробирки по 4-5 мл и устанавливают их в наклонном положении. Каждая партия сывороточного агара проверяется на стерильность: несколько пробирок из этой партии помещают на сутки в термостат. В случае прорастания среды бракуется вся партия. Пробирки со скошенным сывороточным агаром хранят при 4<sup>0</sup> до 2 недель.

## **Среда для определения токсигенности**

### *Мартеновский агар с мясной водой двойной концентрации*

Мартеновский пептон - 0,5 л, мясная вода - 0,5 л, агар-агар - 15 г, уксуснокислый натрий - 5 г, мальтоза - 3 г.

15 г агара промывают в течение рабочего дня в проточной водопроводной воде, тщательно отжимают и переносят в 1 л мартеновского бульона (0,5 л мартеновского пептона и 0,5 л мясной воды). Устанавливают рН 7,8-8,0 путем защелачивания бульона 20%-ным раствором NaOH по бумажке с индикатором крезоловый красный, которая при этой реакции изменяет желтый цвет на розово-малиновый. Бульон кипятят в течение 10 мин, затем добавляют 0,5% (5 г на 1 л) уксусно-кислого натрия, 0,3% мальтозы (3 г на 1 л), проверяют рН и, если нужно, снова доводят до 7,8-8,0, кипятят в течение 15 мин, дают отстояться в теплом месте (в аппарате Коха или термостате) 2-3 часа и фильтруют через тканевый или ватно-марлевый фильтр. Разливают в стерильные флаконы (70-80 мл) при большом объеме работы, для одноразового использования, или пробирки (10 мл) и стерилизуют однократно текущим паром в течение 30 мин.

### *Мартеновский пептон*

Свиные желудки, желательны парные, с упругими стенками, большим количеством слизи и без катаральных явлений очищают от жира (желудки, пропитанные желчью, отбрасывают), разрезают и измельчают в мясорубке. Полученный фарш из желудков помещают в бутылки емкостью 3-5 литров и заливают подогретой до 50<sup>0</sup> водой из расчета на 1 литр воды 300-500 г измельченной массы. Туда же добавляют 1% химически чистой соляной кислоты (уд. вес 1,19). Массу хорошо перемешивают и ставят в термостат: либо на 15-18 часов (или более) при 37<sup>0</sup>, либо, при наличии отдельного термостата, при 42<sup>0</sup> на



18 часов (или более). В течение процесса переваривания бутылку встряхивают, вначале чаще (через 1-1,5 часа), затем реже. В хорошо переваренном пептоне на дне бутылки лежит небольшой слой мелкого темного осадка.

Полноту осаждения балластных белков можно проверить путем добавления к 5 мл профильтрованного пептона 1-2 капель 10%-ного NaOH, муть не должна появляться.

Действие фермента останавливают нагреванием в водяной бане, постепенно доводя температуру до  $80^{\circ}$ , устанавливаемую по показаниям термометра, погруженного в бутылку с переваром. Нагревание продолжается в течение 10 мин. Для этой цели можно использовать аппарат Коха или автоклав. Бутылки тщательно взбалтывают, закрывают ватно-марлевой пробкой с бумажным колпачком и ставят в прохладное сухое помещение для отстаивания при температуре не выше  $12^{\circ}$ . Пептон годен к употреблению не ранее, чем через 7 дней, когда плотно осядут взвешенные частицы.

Необходимо добавить 20 мл хлороформа на 1 л пептона для консервирования и закрыть бутылку резиновой пробкой. В таком виде пептон может храниться без стерилизации при комнатной температуре.

#### *Мясная вода*

Для приготовления мясной воды двойной концентрации желательно использовать свежее мясо молодого животного средней упитанности. Обезжиренное, освобожденное от сухожилий мясо пропускают через мясорубку, заливают водой в пропорции 1 л воды на 1 кг фарша и оставляют на ночь при  $4^{\circ}$  С, утром смесь кипятят на асбестовой сетке в течение 15-20 мин с момента закипания. Готовый отвар фильтруют, фарш отжимают, полученную воду разливают в стерильные бутылки по 25-500 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин. Хранить при  $4^{\circ}$  С.

*Бумажки с индикатором крезоловый красный*

0,1 г крезолового красного растворяют в 100 мл 95%-ного спирта и оставляют при температуре 37<sup>0</sup> на 24 часа, часто встряхивая. На следующий день смачивают в этом растворе полоски фильтровальной бумаги и быстро высушивают. Ярко-желтый цвет бумажек в щелочной среде переходит в разные оттенки красного.

### **Среды для определения биохимических свойств**

#### *Среды для определения цистионазной активности*

##### *Среда Пизу на Мартеновском агаре*

К 90 мл расплавленного 1,5%-ного мартеновского агара (не допускается использование агара Хоттингера), рН 7,6, добавляют 2 мл 1%-ного раствора L-цистина в 0,1 N растворе соляной кислоты (HCl), тщательно перемешивают и добавляют такой же объем 0,1 N раствора NaOH. Раствор NaOH добавляют к среде для нейтрализации соответствующего количества кислоты. Растворы кислот и щелочей должны быть взаимно оттитрованы, можно использовать фиксанально выпускаемые предприятиями химической промышленности.

Среду стерилизуют при температуре 112<sup>0</sup> в течение 30 мин, можно сохранять в течение 1 месяца при 4<sup>0</sup>.

Агар с цистином расплавляют при 90<sup>0</sup> (не кипятят) для сохранения цистина. К охлажденной до 45<sup>0</sup> среде добавляют 1 мл 10%-ного раствора уксуснокислого свинца и 9 мл сыворотки крупного рогатого скота с соблюдением правил асептики и разливают по пробиркам.

Необходимо учитывать, что при температуре среды 50<sup>0</sup> и выше, в присутствии уксуснокислого свинца, сыворотка мутнеет и среда приобретает молочный цвет. Это затрудняет учет результатов реакции.

##### *Среда Пизу на основе коммерческой среды АГВ*

Для приготовления среды Пизу можно использовать доступную и сбалансированную по составу коммерческую среду АГВ, применяемую в бактериологической практике для определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам. Навеску сухой среды АГВ в количестве 2,7 г вносят в 90 мл дистиллированной воды и кипятят ее до полного растворения. Готовят 5%-ный раствор гидрокарбоната натрия. Для этого растворяют 0,5 г  $\text{NaHCO}_3$  в 10 мл дистиллированной воды. В 10 мл гидрокарбоната натрия внося 0,1 г L-цистина и кипятят до полного растворения цистина. Затем 2 мл кипящего щелочного раствора цистина вносят в 90 мл расплавленной среды АГВ, доводят рН до 7,6 и стерилизуют при  $112^{\circ}$  в течение 10 мин. К расплавленной и охлажденной до  $45^{\circ}$  основе последовательно добавляют: 10 мл сыворотки крупного рогатого скота, 1 мл 10%-ного раствора уксуснокислого свинца, 1,5 мл стерильного свежеприготовленного 10%-ного раствора гипосульфита натрия и разливают по пробиркам.

Растворы уксуснокислого свинца и гипосульфита натрия готовят ex tempore, используя стерильные пробирки и дистиллированную воду, стерилизуют текучим паром или на водяной бане в течение 30 мин.

#### *Среды для определения уреазной активности*

Пробу на уреазу можно ставить в 2-х вариантах: путем посева на бульон с мочевиной и по методу Заксе.

*Бульон с мочевиной*

К 100 мл стерильного мясо-пептонного или бульона Хоттингера (рН 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6%-ного спиртового раствора индикатора крезолрот. Разливают по 2-3 мл в стерильные пробирки и стерилизуют текучим паром в течение 10 мин.

*Приготовление реактивов для определения уреазной активности по методу Заксе*

Готовятся 2 реактива – А и В.

Реактив А:

Мочевина .....2 г  
 96%-ный этиловый спирт..... 2 мл  
 Дистиллированная вода.....4 мл

Реактив В:

0,2%-ный раствор фенолрот.....1 мл  
 Однозамещенный фосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).....0,1 г  
 Двухзамещенный фосфат калия ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).....0,1 г  
 Хлорид натрия .....0,5 г  
 Дистиллированная вода.....100 мл

Реактив А не стерилизуют и хранят при температуре 4<sup>0</sup>. Реактив В стерилизуют в автоклаве текучим паром.

*Среда для определения сахаролитической активности*

Для определения сахаролитической активности рекомендуется использовать питательную среду на 1%-ной пептонной воде.

К 100 мл горячей дистиллированной воды добавляют 1 г пептона, 0,5 мл химически чистого NaCl и 1 мл индикатора Андресе. Устанавливают рН 7,4,

кипятят 5 мин, фильтруют через бумажный или полотняный фильтр, доводят до первоначального объема горячей дистиллированной водой. К полученной основе добавляют один из углеводов: сахароза, глюкоза (в количестве 1 г), растворимый крахмал (0,5 г).

Среды разливают в пробирки по 2-3 мл и стерилизуют текучим паром в течение 3 дней по 30 мин или при 0,5 атм 30 мин. Готовые среды с индикатором Андрее бесцветны или имеют слегка розоватый оттенок.

#### *Индикатор Андрее*

Посуда для приготовления индикатора должна быть сухой, химически чистой, с притертой пробкой.

К 100 мл дистиллированной воды добавляю 0,5 г кислого фуксина и 16,4 мл 4%-ного раствора NaOH. Раствор на сутки оставляют при 37<sup>0</sup>, периодически встряхивая, 2-е суток выдерживают на свету и затем убирают в темное место. Свежеприготовленный раствор имеет соломенно-желтый цвет или слегка розовый оттенок, который исчезает в процессе хранения. Интенсивно розовая окраска раствора в процессе приготовления индикатора указывает на необходимость увеличения содержания щелочи до 18 мл.

#### *Среда для определения нитратредуктазной активности*

К 100 мл питательного бульона (МПБ или бульона Хоттингера) рН 7,3-7,5, свободному от нитритов (проверить реактивом Грисса или Касаткина), прибавляют 0,1 г свободного от нитритов нитрата калия (KNO<sub>3</sub>). Проверяют еще раз на наличие нитритов и разливают по 2 мл в пробирки, предварительно тщательно промытые проточной водой. Среды стерилизуют 15 мин при 120<sup>0</sup>.

#### *Реактив Грисса*

**Раствор 1.** 0,8%-ная сульфаниловая кислота в 5 N уксусной кислоте.

**Раствор 2.** 0,6%-ная диметил-альфа-нафтамин в 5 N уксусной кислоте.

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин, бесцветен, при появлении розового окрашивания - непригоден. Растворы 1 и 2 хранят при 4<sup>0</sup> в течение 2 месяцев.

*Реактив Касаткина*

**Раствор 1.** 0,1%-ный раствор риванола в дистиллированной воде.

**Раствор 2.** 12%-ный раствор соляной кислоты (HCl).

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин, бесцветен, при появлении розового окрашивания - непригоден. Растворы 1 и 2 хранят при 4<sup>0</sup> в течение 2 месяцев.

## **МЕТОДИКИ ПОСТАНОВКИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА**

Для решения задачи эпиднадзора за дифтерийной инфекцией необходим качественно новый подход к лабораторной диагностике дифтерии - сокращение сроков исследования, применение более надежных и специфических методов исследования.

Совершенно очевидно, что для сокращения сроков диагностики дифтерийной инфекции необходимо подходить не с позиции выявления коринебактерий дифтерии (токсигенных и нетоксигенных), а с позиций индикации патогенного агента возбудителя дифтерии - дифтерийного токсина.

При определении дифтерийного токсина методом ИФА применяется твердофазный вариант. Далее приводится описание метода с использованием моноклональных антитоксических противодифтерийных антител (МкАт), полученных к СООН-концевому участку В-фрагмента дифтерийного токсина, ответственного за биологическое связывание с клетками макроорганизма, и

иммобилизированных на полистироле. Используются также поликлональные антитоксические противодифтерийные антитела (ПкАт), меченые ферментом пероксидазой хрена. Сорбированные на поверхности полистироловых планшетов МкАт связывают находящиеся в исследуемых пробах молекулы дифтерийного токсина (анатоксина) и не связывают никаких других продуктов микробного или иного происхождения, обеспечивая тем самым исключительно высокую специфичность метода. Свободные антигенные детерминанты молекулы токсина взаимодействуют с ПкАт, конъюгированными с пероксидазой хрена. При наличии в анализируемых пробах токсина образовавшийся комплекс моноклональные антитела - дифтерийный токсин - поликлональный конъюгат с пероксидазой проявляются индикаторной субстратной смесью перекиси водорода с 5-аминосалициловой кислотой (рисунок 2).

Учет реакции производят визуально или инструментально по изменению цвета субстратной смеси. Высокая чувствительность и специфичность метода позволяет выявить токсин в концентрации 4-8 нг/мл или 0,002 Lf/мл анатоксина. Значительным преимуществом ИФА является возможность индикации токсина непосредственно в жидкой питательной среде, в которую был произведен посев клинического образца, минуя этап выделения чистой культуры. Этот метод можно использовать как для качественного (по принципу «да - нет»), так и количественного определения дифтерийного токсина. Пробы ставят в дубликатах - по 2 лунки для каждой пробы.

РНГА - двухкомпонентная реакция, предполагает использование диагностикума эритроцитарного дифтерийного антительного, действующим началом которого являются связанные с эритроцитами очищенные специфической сорбцией поликлональные антитоксические противодифтерийные антитела, вступающие во взаимодействие лишь с дифтерийным токсином - анатоксином. Учитывая возможность появления неспецифической агглютинации в первых лунках планшетов за счет высокой концентрации белка, при постановке РНГА все исследуемые пробы анализируются в серийных разведениях. При наличии в исследуемой пробе токсина, образуется специфический комплекс

дифтерийный токсин - сенсibilизированные эритроциты - антитоксические антитела, формирующий осадок в виде агглютината эритроцитов. Чувствительность практически не уступает ИФА.

Сравнительное испытание методов - реакции преципитации в агаре (метод традиционной бактериологии), РНАт, ИФА, РНГА показало преимущество ИФА и РНГА по чувствительности, специфичности, времени проведения анализа. ИФА и РНГА позволяют выдать ответ о наличии токсина или его отсутствии в исследуемом материале на 1-3 суток раньше традиционных методов. Чувствительность ИФА и РНГА зависит от условий культивирования исследуемого материала. Использование жидкой питательной среды позволяет выявить токсин у слаботоксигенных штаммов, продукцию которого уловить на плотной питательной среде, при постановке менее чувствительной реакции иммуно-преципитации в агаре, не всегда представляется возможным.

ИФА и РНГА могут быть применены для ускоренного выявления токсина в материале от больных дифтерией, носителей токсигенных коринебактерий дифтерии; от лиц, обследуемых с профилактической целью или по эпидемическим показаниям; а также - в культурах, выделенных на разных этапах бактериологического исследования. Кроме того, они позволяют изучить уровень токсинообразования штаммов коринебактерий дифтерии. Эти методы могут быть реализованы в бактериологических, диагностических лабораториях СЭО.

### *Иммуноферментный анализ*

Для проведения исследований необходимы:

1. коммерческая тест-система иммуноферментная моноклональная для определения дифтерийного токсина «Дифтерия-Монозим» (изготовитель - фирма «Илья Мечников» при ЦНИИВС им. И.И.Мечникова, 103064, Москва, пер. Мечникова, 5а, тел. 916-03-20);



2. пипеточные дозаторы или автоматические пипетки на 100 мкл или 200 мкл (импортные или отечественного производства);
3. термостат 37<sup>0</sup>С;
4. мерная посуда (химически чистая);
5. фильтровальная бумага;
6. дистиллированная вода;
7. 0,85% раствор хлорида натрия, рН 7,2;
8. 4% раствор гидроксида натрия (NaOH);
9. 3% раствор перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>);
10. в случае необходимости инструментального учета - вертикальный фотометр для оценки иммуноферментных реакций в 96-луночных планшетах с фильтром 450 нм.

Общий принцип постановки ИФА описан на примере коммерческого набора «Дифтерия-Монозим». При использовании других коммерческих тест-систем вносят коррективы согласно инструкции применения этих систем.

Набор «Дифтерия-Монозим» содержит:

- 1) моноклональные антитела для адсорбции на планшетах;
- 2) конъюгат антитоксический поликлональный - меченные пероксидазой хрена ПкАт;
- 3) положительный контроль - анатоксин дифтерийный, 300 Lf/мл;
- 4) отрицательный контроль - среда культивирования контрольного нетоксигенного штамма коринебактерии дифтерии;
- 5) 5-АС - 5-аминосалициловая кислота (индикатор);
- 6) твин-20 - детергент для приготовления промывающего раствора;
- 7) планшеты полистироловые (обязательно плоскодонные в случае инструментального учета результата) для иммуноферментных реакций одноразового пользования.
- 8)

## Подготовительные работы при исследовании материала в ИФА

### *Накануне тестирования исследуемого материала.*

1. Приготовление раствора МкАт для сенсibilизации планшетов (раствор 1) в разведении 1:50.

Готовят 30 мл физиологического раствора 0,85%-ной концентрации рН 7,2, вскрывают ампулу с МкАт и вносят в нее 0,6 мл приготовленного физиологического раствора. Затем содержимое ампулы переносят в оставшееся количество физиологического раствора (24,9 мл), тщательно перемешивают.

2. Сенсibilизация планшетов (адсорбция МкАт на планшеты).

Во все лунки планшетов (из набора) вносят по 0,1 мл (100 мкл) раствора 1. Планшеты накрывают крышками, выдерживают в течение 2 часов в термостате при 37<sup>0</sup> С, затем переносят планшеты на 18-24 часа в холодильник (4<sup>0</sup> С). При необходимости сенсibilизированные планшеты могут храниться в течение 2 недель при температуре 4<sup>0</sup> С.

3. Подготовка исследуемого материала и положительного контроля.

Тампоны при исследовании носоглотки или других мест локализации патологического процесса; микроорганизмы в объеме 1 бактериологической петли диаметром 1,5 мм; 1-3 колонии с чашки первичного роста засевают в жидкую питательную среду (см. раздел «Питательные среды»).

Качество жидкой питательной среды проверяют культивированием контрольного (референс) токсигенного штамма коринебактерии дифтерии варианта *gravis*, который засевают в жидкую питательную среду в объеме 1 бактериологической петли диаметром 1,5 мм.

Пробирки с исследуемым материалом и контрольным штаммом выдерживают в термостате в течение 18 часов при 37<sup>0</sup> С (при необходимости исследования материала можно провести после 5-часового инкубирования в термостате).

*В день постановки опыта* готовят рабочие разведения всех компонентов реакции.

### 1. Приготовление промывающего раствора 2.

Используют 0,05% раствор твина-20, для чего содержимое флакона «Твин-20» полностью переносят в 2 л 0,85% раствора хлорида натрия рН 7,2, тщательно перемешивают (образуется пена). Раствор используют для промывания планшетов, разведения исследуемых проб, коъюгата, положительного контроля. Раствор можно хранить при 4<sup>0</sup> С до 2-х недель.

### 2. Приготовление рабочего разведения положительного контроля (дифтерийного анатоксина) - раствор 3.

Контроль вводится для оценки чувствительности тест системы. Используют рабочее разведение анатоксина 1:4000, которое готовят методом последовательных разведений. Разведение 1:40 - в ампулу, содержащую 0,05 мл анатоксина, вносят 1,95 мл раствора 2, тщательно перемешивают (хранят при 4<sup>0</sup> С до 2-х недель). Затем готовят разведение 1:400 - 0,1 мл анатоксина в разведении 1:40 вносят в 0,9 мл раствора 2, тщательно перемешивают; разведение 1:4000 - 0,1 мл анатоксина в разведении 1:400 вносят в 0,9 мл раствора 2, тщательно перемешивают (содержит 0,075 Lf/мл).

3. Рабочие разведения коъюгата, 5-АС и субстратной смеси готовятся непосредственно перед внесением в лунки планшетов (см. раздел «Постановка ИФА»).

## **Постановка ИФА**

### 1. Промывание лунок планшетов после адсорбции МкАт.

Планшеты, сенсibiliзирoванные накануне МкАт, трижды промывают раствором 2. Сначала содержимое лунок удаляют в емкость с дезраствором (5-6%-ный раствор перекиси водорода) путем встряхивания планшета, а затем заполняют лунки раствором 2 не менее, чем на 3/4 их объема и оставляют на 2-3 минуты, каждый раз удаляя содержимое встряхиванием планшета. Планшеты просушивают фильтровальной бумагой. На данном этапе заразный материал отсутствует.

## 2. Внесение контрольных и исследуемых проб (см. схему).

Лунки от А до Н первого и второго рядов планшетов предназначены для внесения отрицательного и всех положительных контролей.

В лунки А1 и А2 каждого планшета вносят по 0,1 мл содержимого ампулы из набора «Отрицательный контроль» (проверка специфичности реакции, на схеме «К-»).

В остальные лунки рядов 1 и 2 (от В до Н включительно) вносят по 0,1 мл раствора 2.

В лунку В1 вносят 0,1 мл рабочего разведения положительного контроля - раствора 3, содержимое лунки перемешивают и титруют с двукратным шагом в направлении к лунке Н1, получая таким образом разведения анатоксина от 1:8000 в лунке В1 до 1:512000 в лунке Н1 с содержанием Lf/мл в лунках: В1 - 0,0375; С1 - 0,018; D1 - 0,009; E1 - 0,004; F1 - 0,002; G1 - 0,001; H1 - 0,0005 (на схеме «К+»). В лунку В2 внося 0,1 мл верхнего слоя среды культивирования контрольного токсигенного штамма (положительный контроль среды культивирования) и титруют с двукратным шагом от 1:2 до 1:128 (на схеме - «К+сп»).

Исследуемый материал (на схеме - «X, Y и т.д.») вносят по две лунки в 3-12 ряды по 0,1 мл верхнего слоя среды культивирования. При инструментальном учете исследуемые пробы разводят в 4 раза перед внесением в лунки.

Планшеты накрывают сухими крышками и помещают в термостат на 1 час при температуре 37<sup>0</sup> С.

## 3. Промывание лунок планшетов, содержащих патогенный материал.

Промывание осуществляют с соблюдением правил работы с инфекционным материалом. После инкубирования планшетов в термостате содержимое лунок удаляют либо пипеткой (с грушей), либо с помощью насоса (водоструйного или типа ОХ-10). Поверхность планшетов промокают тампоном или сложенной в 4-5 слоев фильтровальной бумагой, увлажненной тем же дезраствором. Не допускается попадания дезраствора в лунки! Планшеты промывают трижды раствором 2, удаляя содержимое лунок как указано выше.

Планшеты промокают фильтровальной бумагой для удаления промывающего раствора.

Схема расположения на планшете контрольных и исследуемых проб при постановке ИФА

Титр анатоксина (в тысячах)	в Lf/мл	Титр среды культивир. токсигенн. штамма	Буквенное обозначение рядов	Цифровые обозначения рядов			
				1	2	3	4...12
			A	K-	K-	X	Y
1:8	0,0375	1:2	B	K+	K+cp	X	Y
1:16	0,018	1:4	C	K+	K+cp	и т.д.	
1:32	0,009	1:8	D	K+	K+cp		
1:64	0,004	1:16	E	K+	K+cp		
1:128	0,002	1:32	F	K+	K+cp		
1:256	0,001	1:64	G	K+	K+cp		
1:512	0,0005	1:128	H	K+	K+cp		

Обозначения: K- - отрицательный контроль из набора; K+ - положительный контроль из набора; K+cp - положительный контроль среды культивирования; X, Y - исследуемые пробы.

4. Приготовление рабочего разведения конъюгата - раствора 4.

Используют рабочее разведение конъюгата 1:500, для чего в ампулу из набора «Конъюгат антитоксический поликлональный» вносят 0,54 мл раствора 2, тщательно перемешивают (разведение 1:10 при необходимости можно хранить при 4<sup>0</sup> С до 2-х недель); затем полученное разведение переносят (0,6 мл) в мерную емкость и доводят объем до 30 мл раствором 2 (разведение 1:500 хранению не подлежит!).

5. Внесение конъюгата в лунки планшетов.

Во все лунки промытых планшетов вносят по 0,1 мл конъюгата в рабочем разведении - раствора 4. Планшеты накрывают сухими крышками и помещают в термостат на 1 час при температуре 37<sup>0</sup> С. После инкубирования планшеты промывают не менее 5 раз, стряхивая содержимое в емкость с дезраствором.

Планшеты промокают фильтровальной бумагой для удаления промывающего раствора.

6. Приготовление рабочего разведения 5-АС - раствора 5.

Готовят 0,08% раствор 5-АС, для чего содержимое флакона (24 мг) растворяют в 30 мл дистиллированной воды, подогретой до 80° С; раствор охлаждают. При необходимости его можно хранить при 4° С до 2-х недель. Перед употреблением 0,08% раствор 5-АС подщелачивают под контролем ионметра 4%-ным раствором гидроксида натрия (NaOH) до pH 5,9-6,0 (подщелоченный раствор 5-АС хранению не подлежит!).

7. Приготовление 0,05%-ного раствора перекиси водорода - раствора 6.

Готовят из 3%-ного раствора перекиси водорода путем разведения его в 60 раз свежеперегнанной холодной дистиллированной водой. Например, для получения 3,6 мл 0,05%-ного раствора к 0,06 мл перекиси водорода 3%-ной концентрации добавляют 3,54 мл дистиллированной воды. Раствор можно хранить при 4° С в полиэтиленовой или парафинированной посуде не более 2-х недель.

8. Приготовление субстратной смеси - раствора 7.

Готовится за 5-10 мин до внесения в лунки планшетов (!) путем смешивания 9 частей раствора 5 (5-АС) pH5,9-6,0 с 1 частью раствора 6 (0,05%-ный раствор перекиси водорода). Для приготовления 30 мл субстратной смеси к 27 мл раствора 5 добавляю 3 мл раствора 6. Цвет субстратной смеси - желтовато-золотистый. Этот раствор хранению не подлежит!

9. Внесение субстратной смеси в лунки планшетов.

Во все лунки планшетов вносят по 0,1 мл раствора 7, планшеты накрывают сухими крышками и оставляют при комнатной температуре. Через 25-35 мин приступают к учету реакции.

### **Учет и интерпретация результатов**

Реакцию учитывают визуально и инструментально.

### *Визуальный учет*

При оценке результатов сравнивают интенсивность окраски в лунках исследуемого материала с интенсивностью окраски в лунках отрицательного и положительного контролей.

Минимальная интенсивность окраски должна быть в лунках А1 и А2 с «отрицательным контролем» и может вариировать от практически бесцветной до желтовато-золотистого цвета субстратной смеси.

Окраска в лунках разведений дифтерийного анатоксина (В1-Н1) изменяется от красновато-коричневого в первых лунках до бесцветного или желтовато-золотистого - в последних.

Положительными считаются пробы, давшие окраску отчетливо отличную от окраски лунок с отрицательным контролем.

Сравнивая интенсивность окраски лунок исследуемых проб с интенсивностью окраски лунок последовательного разведения дифтерийного анатоксина (в каждой лунке соответствующее содержание анатоксина в Lf/мл, см. схему), можно судить об относительном количестве токсина в тестируемой пробе.

### *Инструментальный учет*

При учете реакции с использованием фотометра (длина волны 450 нм) предварительно строится калибровочная кривая, где на оси ординат откладывают значения оптической плотности (ОП) в лунках «положительного контроля» - анатоксина (В1-Н1), а по оси абсцисс - соответствующие значения количества дифтерийного анатоксина в этих лунках (см. схему).

Если «положительный контроль» ставится на 2-х или более планшетах, то на оси ординат откладывают среднее значение ОП для каждой лунки, полученное путем деления суммы значений ОП лунки каждого планшета на количество показателей. Например, ОП лунки В1, содержащей 0,0375 Lf/мл или 1:8000 анатоксина, на первом планшете = 0,87, на втором = 0,862 и на третьем = 0,855; на оси ординат среднее значение ОП будет  $0,861 [(0,87 + 0,862 + 0,855):3 = 0,861]$ , и

так просчитывают для каждой лунки разведенного анатоксина среднее значение ОП.

Каждая точка графика (калибровочной кривой) откладывается по значению ОП, соответствующей своей лунке: В1, С1, D1, E1, F1, G1, H1, и т.о. вычерчивается калибровочная кривая.

Затем высчитывают средние значения ОП из 2-х лунок каждой исследуемой пробы и по калибровочной кривой определяют какой лунке соответствует значение ОП, и, следовательно, узнают количество анатоксина в лунке (в Lf/мл). Это значение (количество анатоксина в соответствующей лунке в Lf/мл) умножают на величину разведения исследуемой пробы, получая таким образом значение количества токсина в 1 мл пробы. Например, ОП пробы «Х» = 0,51 и 0,49, среднее значение ОП=0,5; по калибровочной кривой этому значению ОП соответствует содержание анатоксина 0,018 Lf/мл в лунке С1 (см. рис. 3).

Учитывая, что исследуемая проба была разведена в 4 раза, необходимо показатель 0,018 Lf/мл увеличить в 4 раза ( $0,018 \times 4 = 0,072$ ), таким образом, в исследуемом материале (в пробе «Х») содержится 0,072 Lf/мл токсина.

Калибровочную кривую строят в каждом опыте.





Положительными считаются пробы, ОП которых превосходит ОП «отрицательного контроля» не менее, чем на 0,1 единицы ОП. Например, ОП «отрицательного контроля» = 0,029 и 0,031; средняя величина ОП = 0,03, тогда положительными считаются все пробы, ОП которых выше 0,13 ( $0,03+0,1=0,13$ ).

При получении значения ОП в исследуемой пробе выше значения ОП анатоксина лунки В1, в случае определения степени токсинообразования штамма, исследование следует повторить, при этом разведение пробы должно быть увеличено.

При существенном различии ОП в лунках-дубликатах одной пробы результат тестирования считать сомнительным и исследование пробы повторить.

Тест-система удовлетворяет требованиям специфичности, если окраска в лунках с «отрицательным контролем» варьирует от практически бесцветной до желтовато-золотистой, а в лунках с «положительным контролем» - от красновато-коричневой до бесцветной или желтовато-золотистой.

Тест-система удовлетворяет требованиям по чувствительности если положительная реакция (визуально или инструментально) выявляется в лунке «положительного контроля», содержащей анатоксин в разведении не ниже 1:128000 (лунка G1 с концентрацией анатоксина 0,002 Lf/мл).

Об удовлетворительном качестве жидкой питательной среды, используемой для культивирования коринебактерий дифтерии или патологического материала, свидетельствует положительная реакция верхнего слоя среды культивирования контрольного токсигенного штамма коринебактерий дифтерии в разведении не ниже 1:32.

### *Реакция непрямой агглютинации*

Для проведения РНГА необходимы:

1. коммерческий набор «Диагностикум эритроцитарный дифтерийный антительный жидкий для определения токсина в РНГА» (изготовитель - НИИЭМ им. Л.Пастера, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, тел. 233-20-92);
2. капельницы, петли из набора Такачи объемом 0,025 мл (возможна постановка реакции петлями объемом 0,05 мл, что предполагает увеличение расхода диагностикума и других компонентов реакции в 2 раза), или автоматические пипетки, установленные на объем 25 мкл (50 мкл);
3. мерная посуда;
4. дистиллированная вода;
5. 0,85% раствор хлорида натрия с 0,5% -ным содержанием нейтрального формалина, рН 7,2 (раствор 1);
6. планшеты «U»-образные (сферическое дно) из набора Такачи или отечественного производства для иммунологических реакций.

Набор диагностикума содержит:

- 1) диагностикум эритроцитарный жидкий 3%-ный;
- 2) положительный контроль - дифтерийный анатоксин, жидкий, 10 Лf/мл;
- 3) нормальная кроличья сыворотка (НКС), сухая, 10%-ная.

### **Подготовительные работы при исследовании материала в РНГА**

*Накануне тестирования исследуемого материала.*

1. Приготовление раствора 1.

К 79 мл 0,85% раствор хлорида натрия с рН 7,2 добавляют 1 мл нейтрального 40% -ного раствора формалина, размешивают. Хранят при температуре 4<sup>0</sup> С без ограничения срока.

### 1.1. Приготовление 0,85% раствор хлорида натрия с рН 7,2.

Навеску хлорида натрия 8,5 г растворяют в 1000 мл свежеперегнанной дистиллированной воды, тщательно перемешивают. Доводят рН до 7,2 с помощью гидроксида натрия 4%-ной концентрации.

### 1.2. Приготовление 4%-ного раствора гидроксида натрия (NaOH).

4 г гидроксида натрия растворяют в 96 мл дистиллированной воды. Хранят в плотно закрытой склянке или полиэтиленовом флаконе при температуре 4° С в течение 1 месяца.

### 1.3. Приготовление нейтрального формалина.

Коммерческий 40%-ный раствор формалина нейтрализуют добавлением углекислого кальция ( $\text{CaCO}_3$ ) или углекислого магния ( $\text{MgCO}_3$ ) в соотношении 3:1. Оставляют в темном месте при комнатной температуре на 2-3 дня, периодически взбалтывая. Затем дают раствору отстояться. Перед употреблением с помощью индикатора бромтимоловый синий проводят контроль рН, значение которого должно быть 7,0. Надосадочную жидкость по мере надобности разводят в 80 раз для получения 0.5%-ной концентрации.

2. Подготовка исследуемого материала, положительного и отрицательного контролей.

Накануне постановки РНГА исследуемый материал, контрольные токсигенные и нетоксигенные штаммы коринебактерий дифтерии засевают в жидкую питательную среду (см. раздел «Питательные среды») и инкубируют при 37° С в течение 18 часов. Параллельно инкубируют пробу жидкой питательной среды без материала.

*В день постановки реакции* готовят рабочие разведения всех компонентов реакции.

#### 1. Приготовление рабочего разведения дифтерийного анатоксина 1:100.

Раствор готовят методом последовательных разведений. Разведение анатоксина 1:10 - из флакона, содержащего 10 Лf/мл, переносят 0,2 мл в пробирку, содержащую 1,8 мл раствора 1, тщательно перемешивают; разведение анатоксина 1:100 - 0,1 мл анатоксина в разведении 1:10 вносят в 0,9 мл раствора

1, тщательно перемешивают (содержит 0,1 Lf/мл). Раствор хранению не подлежит!

2. Приготовление нормальной кроличьей сыворотки 1%-ной концентрации - раствора 2 (используется только для разведения диагностикума).

Во флакон «Нормальная кроличья сыворотка, 10%-ная, сухая» вносят 2 мл раствора 1, тщательно перемешивают (раствор 10%-ной концентрации можно хранить при 4<sup>0</sup> С до 1 мес), затем переносят в мерную емкость и доводят объем раствором 1 до 20 мл. Раствор НКС 1%-ной концентрации имеет вид слегка опалесцирующей жидкости, который можно хранить при комнатной температуре не более 10 часов.

3. Приготовление раствора диагностикума в рабочем разведении (0,5%-ной концентрации).

Диагностикум эритроцитарный 3%-ной концентрации при хранении образует 2 слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и осадок коричневого цвета, разбивающийся при встряхивании. Разгерметизированный 3%-ный раствор диагностикума можно хранить при 4<sup>0</sup> С в течение месяца. Для приготовления 0,5% раствора диагностикума к содержимому флакона (после встряхивания) добавляют 4 мл раствора 2, тщательно перемешивают, переносят в мерную емкость, добавляют еще 6 мл раствора 2, получая т.о. рабочее разведение диагностикума. Раствор 0,5%-ной концентрации при комнатной температуре не более 10 часов.

4. Подготовка планшетов и петель.

Лунки планшетов протирают тампоном, смоченным раствором 1; петли прожигают. В дальнейшем обработку петель проводят в соответствии с «Наставлением к аппарату Такачи».

### Постановка РНГА

1. Во все лунки планшетов вносят по 0,025 мл раствора 1.

2. Внесение раствора дифтерийного анатоксина в рабочем разведении.

В первую лунку первого вертикального ряда планшета (А1) вносят 0,025 мл дифтерийного анатоксина (в разведении 1:100 или 0,1 Lf/мл) и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки (Н1) включительно. Разведение анатоксина в лунках: 1-ой - 1:200 или 0,05 Lf/мл, 2-ой - 1:400 или 0,025 Lf/мл, 3-ей - 1:800 или 0,012 Lf/мл, 4-ой - 1:1600 или 0,006 Lf/мл, 5-ой - 1:3200 или 0,003 Lf/мл, 6-ой - 1:6400 или 0,0015 Lf/мл, 7-ой - 1:12800 или 0,0007 Lf/мл, 8-ой - 1:25600 или 0,0003 Lf/мл.

3. Внесение надосадочной жидкости среды культивирования контрольного токсигенного штамма коринебактерии дифтерии.

В 1-ую лунку 2-го вертикального ряда (А2) вносят 0,025 мл этой пробы и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки (Н2) включительно (от 1:2 до 1:256).

4. Внесение надосадочной жидкости среды культивирования контрольного нетоксигенного штамма коринебактерии дифтерии.

В 1-ую лунку 3-го вертикального ряда (А3) вносят 0,025 мл этой пробы и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки (Н3) включительно (от 1:2 до 1:256).

5. Внесение пробы жидкой питательной среды.

В 1-ую лунку 4-го вертикального ряда (А4) вносят 0,025 мл среды культивирования без материала и титруют с двукратным шагом до 5-ой лунки (Е3) включительно (от 1:2 до 1:32).

6. Внесение исследуемых проб

В первые лунки оставшихся рядов (с 5 по 12) вносят по 0,025 мл надосадка среды культивирования исследуемого материала и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки включительно (от 1:2 до 1:256).

7. Внесение диагностикума 0,5% концентрации.

А) Для контроля отсутствия неспецифической агрегации диагностикума, в 2-3 лунки, содержащие только раствор 1, вносят по 0,025 мл диагностикума. Такой контроль ставят на каждом планшете.

Б) Во все лунки с исследуемым материалом (см. пункт 6), положительными (см. пп. 2,3) и отрицательными (см. пп. 4,5) контролями вносят 0,025 мл диагностикума.

8. Содержимое лунок перемешивают легким постукиванием пальца по краю планшета, закрывают крышками и оставляют при комнатной температуре на 1,5-2 часа. При невозможности учета реакции в день постановки опыта планшеты рекомендуется сохранять в холодильнике при 4° С до следующего дня. Перемещение планшетов до учета реакции исключается.

### **Учет и интерпретация результатов**

Учет результатов осуществляется визуально - по степени агрегации эритроцитов.

++++ - гемагрегат тонким слоем выстилает все дно лунки;

+++ - агрегировавшие эритроциты ровным слоем выстилают дно лунки, но размер агрегата меньше, может наблюдаться фестончатое утолщение края осадка;

++ - агрегировавшие эритроциты располагаются в центральной части лунки, окружены слоем эритроцитов в виде кольца;

+ - на дне лунки образуется широкое, плотное кольцо с незначительной агрегацией по краю;

- - осадок в центральной части лунки в виде диска или кольца с ровным краем.

Чувствительность диагностикума определяется тем максимальным разведением дифтерийного токсина, которое еще вызывает агрегацию sensibilized эритроцитов не менее, чем на три плюса (+++). Диагностикум должен быть по чувствительности не ниже 0,003 lf/мл (титр

анатоксина не ниже 1:3200 - 5-я лунка). При более низкой чувствительности (4-я лунка и менее) диагностикум бракуется.

Диагностикум не должен давать реакции агглютинации с раствором 1, надосадочной жидкостью среды культивирования контрольного нетоксигенного штамма, средой культивирования без материала.

Качество жидкой питательной среды, используемой для культивирования исследуемого материала и контрольных штаммов, считается удовлетворительным, если положительная реакция (на ++ ) в ряду разведений контрольного токсигенного штамма коринебактерии дифтерии наблюдается в лунке с разведением не менее 1:32 (5-я лунка, E2).

Положительными считаются пробы, давшие реакцию агглютинации с сенсibilизированными эритроцитами не менее, чем на два плюса (++) .

Содержание токсина в исследуемой пробе выражается величиной титра (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и т.д.).

Метод позволяет определить относительное содержание токсина в исследуемых пробах путем умножения значения чувствительности тест-системы, выраженное в lf/мл, на обратную величину титра исследуемой пробы. Например, чувствительность тест-системы 0,0015 lf/мл (реакция агглютинации на +++ в 6-ой лунке ряда разведений дифтерийного анатоксина, или F1). Титр исследуемой пробы 1:4 (реакция агглютинации ++). Относительное количество токсина в этой пробе равно 0,0006 lf/мл ( $0,0015 \text{ Lf/мл} \times 4 = 0,006 \text{ Lf/мл}$ ).

### **Неспецифическая агглютинация**

1. В случае появления агглютинации (положительной реакции) в лунках контроля неспецифической реакции диагностикума с раствором 1 следует обратить внимание на правильность приготовления и хранения этого раствора.

2. В случае регистрации положительной реакции в лунках ряда разведений контроля жидкой питательной среды без материала (A4-E4) следует проверить среду культивирования (рецептура, pH, сроки хранения), качество сыворотки крупного рогатого скота (СРКС) и изучить их в РНГА для исключения



неспецифической реакции диагностикума с компонентами среды культивирования. Для этого готовят ряд серийных разведений питательного бульона от 1:2 до 1:32. Затем в лунки вносят по 0,025 мл диагностикума в рабочем разведении. При регистрации положительной реакции (агглютинации) в лунках питательная среда бракуется. Также готовят ряд серийных разведений от 1:2 до 1:32 раствора 1, содержащего 10-20% СРКС, используемой в опыте. В лунки вносят по 0,025 мл диагностикума в рабочем разведении. При регистрации положительной реакции (агглютинации) данная серия СРКС бракуется.

3. В случае регистрации положительной реакции в ряду разведений контрольного нетоксигенного штамма коринебактерий дифтерии (АЗ-НЗ), но при отрицательной реакции диагностикума с раствором 1 и жидкой питательной средой данная серия диагностикума бракуется.

При проведении повторных исследований, в всех случаях обязательна постановка положительных и отрицательных контролей.

### **Меры безопасности при постановке ИФА и РНГА**

1. Все ингредиенты тест-систем для ИФА и РНГА неинфекционны.
2. Работа с исследуемым патогенным материалом, контрольными токсигенным и нетоксигенным штаммами проводятся согласно требованиям эпидрежима бактериологических лабораторий при работе с микроорганизмами III группы.
3. При постановке ИФА удаление материала из лунок производится при помощи пипеток с грушами, насоса водоструйного или типа ОХ-10, или стряхивания содержимого планшета в емкость с дезинфицирующим раствором (избегать разбрызгивания!). Поверхность планшетов промокают тампоном или сложенной в 4-5 слоев фильтровальной бумагой, пропитанной тем же дезраствором.
4. При работе с автоматическими пипетками использованные наконечники помещают в дезраствор на ночь, затем выдерживают в течение суток в мыльном растворе или «Моющем средстве» (жидком), промывают проточной водой в

течение 8-10 часов. После этого промывают в дистиллированной воде в течение 1 часа. Сушат в сушильном шкафу при 37<sup>0</sup> С.

5. Использованные петли помещают в дезраствор на 15-20 минут, затем промывают в смеси Никифорова. Перед употреблением - прожигают.

6. Обработка планшетов. Планшеты для ИФА однократного пользования после работы помещают на ночь в дезраствор или автоклавируют и больше не используют. Планшеты для РНГА после работы помещают в 3%-ный раствор перекиси водорода на 2-3 часа, затем промывают водопроводной водой. Ватно-марлевым тампоном, смоченным мыльной пеной, вращательными движениями промывают каждую лунку планшета. Ополаскивают планшеты теплой водой, затем погружают на 30 минут в дистиллированную воду. Планшеты вынимают, встряхивают и высушивают в термостате при 37<sup>0</sup> С. Планшеты пригодны для повторных исследований.

*Варианты использования ускоренных методов диагностики  
дифтерийной инфекции - ИФА и РНГА*

*I вариант*

Патологический материал, взятый сухим стерильным тампоном, засевают в жидкую питательную среду, которая используется как транспортная (полужидкие агары не применяются). Через 5-18 часов инкубирования в термостате при 37<sup>0</sup> С, исследуют культуральную жидкость методом ИФА. При получении положительного результата может быть выдан предварительный ответ.

Через 18 часов инкубирования материала производят пересев с жидкой на плотную питательную среду для дальнейшего исследования традиционными методами.

*II вариант*

Патологический материал, взятый тампоном, засевают на плотную питательную среду, инкубируют в термостате при 37<sup>0</sup> С и через 24 часа (или 48 часов) изучают выросшие колонии традиционными методами; отбирают 1-3

колонии, засевают в жидкую питательную среду и через 5-18 часов инкубирования в термостате при 37<sup>0</sup> С, исследуют пробу в ИФА или РНГА.

В случае регистрации положительной реакции в ИФА или РНГА и отрицательной реакции преципитации в агаре проба считается положительной на наличие токсина.

### *III вариант*

Применяют при массовых исследованиях, проводимых по эпидемиологическим показаниям или с профилактической целью. Патологический материал, взятый сухим стерильным тампоном, засевают в жидкую питательную среду и через 18 часов инкубации в термостате при 37<sup>0</sup> С, исследуют пробу в ИФА или РНГА. Положительный результат в ИФА или РНГА свидетельствует о наличии в пробе токсина. Для дальнейшего исследования с использованием традиционных методов (пересев материала с жидкой на плотную питательную среду и т.д.) отбирают только положительные пробы.

## ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ТЕКУЩЕЙ И ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ В ОЧАГАХ ДИФТЕРИИ

Объект обеззараживания	Текущая дезинфекция	Заключительная дезинфекция
1	2	3
<p><b>Помещение и мебель: комната больного и мебель, места общего пользования ( учебные классы, коридоры, помещение столовой, умывальники, туалеты)</b></p>	<p>Ежедневная влажная уборка с применением 2% горячего раствора соды, 0,5% осветленного раствора хлорной извести или 1% раствора хлорамина. В случае загрязнения отдельных мест мокротой или смывами из зева больного их протирают ветошью, обильно смоченной 3% раствором хлорамина.</p> <p>Мебель обрабатывают так же, как и помещение.</p>	<p>Стены (на высоту 2м), двери, окна и мебель орошают 1% раствором хлорамина, 0,5% осветленным раствором хлорной извести. Оштукатуренные стены можно обработать путем побелки известковым молоком. Вещи, не подлежащие влажной дезинфекции (книги, картины, плакаты, стенды и т.д.) обеззараживаются механическим способом.</p> <p>Дезинфекция помещений считается законченной через 1 ч после их обработки.</p>
<p><b>Белье нательное, постельное, полотенца, носовые платки, обмундирование: больного</b></p>	<p>Независимо от степени загрязнения выделениями больного можно обеззараживать кипячением в течение 20 мин.</p> <p>Белье и обмундирование, не имеющее следов загрязнения, можно дезинфицировать в 1% растворе хлорамина на 1 ч ( в 3% растворе на 20 мин) или в 3% растворе лизола на 30 мин.</p> <p>Белье и обмундирование, загрязненное выделениями больного, замачивают в 3% растворе хлорамина или в 5% горячем растворе лизола на 1 ч.</p> <p>При камерной дезинфекции (паровой, паровоздушной, пароформалиновой метод) устанавливается режим для уничтожения вегетативных форм микробов.</p>	<p>Так же, как и при текущей дезинфекции</p>
<p><b>Постельные</b></p>		<p>Обрабатывают камерным</p>

<p><b>принадлежности (подушки, одеяла, матрацы):</b> <b>больного и лиц окружавших больного</b></p>	<p>После приема пищи посуду, освобожденную от остатков пищи, моют в 2% растворе гидрокарбоната натрия, затем сушат. Один раз в сутки ее кипятят в течение 20 мин.</p> <p>Смывные воды и остатки пищи удаляют в канализацию, а при отсутствии канализации- в помойную яму с предварительным их обеззараживанием двумя объемами 10% хлорно-известкового молока в течение 1 ч.</p> <p>Ополоски из зева и мокроту обеззараживают 10% хлорно-известковым молоком в течение 1 ч и удаляют в канализацию, а посуду промывают горячей водой.</p> <p>При совместном хранении с посудой, которой пользовался больной, подлежит обеззараживанию при первичной обработке очага таким же способом, как и посуда больного.</p>	<p>способом.</p> <p>Можно орошать из гидропульта или автомакса 1-3% (в зависимости от загрязненности выделениями больного) растворами хлорамина или 3-5% горячими растворами лизола с последующей чисткой щетками, смоченными дезинфицирующим раствором.</p> <p>Кипятят вместе с остатками пищи в течение 20 мин. Посуду, освобожденную от остатков пищи, можно дезинфицировать замачиванием в 1% растворе хлорамина на 1 ч с последующим обмыванием горячей водой и сушкой. В этом случае остатки пищи и выделения обеззараживаются так же, как и при текущей дезинфекции.</p> <p>При отдельном хранении с посудой больного обеззараживанию не подлежит.</p>
<p><b>Посуда:</b> <b>больного (для приема пищи и сбора выделений)</b></p>		
<p><b>лиц, окружавших больного (для приема пищи).</b></p>		

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Введение.....	2
Краткие сведения об этиологии и патогенезе дифтерии .....	4
Клиника дифтерии .....	10
Классификация.....	-
Дифтерия зева .....	11
Дифтерия носа .....	19
Дифтерия гортани.....	21
Дифтерия глаза .....	22
Дифтерия кожи.....	23
Дифтерия раны.....	24
Осложнения дифтерии .....	-
Диагноз и дифференциальный диагноз дифтерии .....	26
Лечение .....	32
Эпидемиология дифтерии .....	51
Источник инфекции .....	-
Механизм передачи .....	54
Иммунитет .....	55
Профилактические и противоэпидемические мероприятия .....	59
Приложение 1. Инструкция по бактериологическому обследованию на дифтерию.....	65
Приложение 2. Порядок проведения текущей и заключительной дезинфекции в очагах дифтерии .....	118