МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

ЦЕНТР ГОССАНЭПИДНАДЗОРА В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы.

Лабораторная диагностика столбняка

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУ 4.2.01-02

gost.e-ecolog.ru

Утверждаю:
Главный Государственный
санитарный врач
по Ростовской области
Айдинов Г.Т.
«13» марта 2002 года

4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы.

Лабораторная диагностика столбняка

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
МУ 4.2.01-02

г.Ростов-на-Дону
2002г.

Подготовили:

Главный государственный санитарный врач по Ростовской области, д.м.н., проф.	Г.Т. Айдинов
Зам. главного врача по эпидвопросам	М.М. Швагер
Зав. отделом эпиднадзора за инфекционными и паразитарными болезнями, к.м.н.	В.Ю. Рыжков
Зав. отделением микробиологического обеспечения эпиднадзора	Т.В. Митрофанова
Врачи-бактериологи	О.В. Карнаухова Н.Т. Николова
Зав. отделом информационных технологий	О.И. Симоненко

1. Общие положения.

1.1. Настоящие методические указания предназначены для проведения лабораторной диагностики столбняка и подлежат обязательному внедрению во всех городских и «зональных» центрах госсанэпиднадзора области.

Исследование на присутствие возбудителя столбняка – C.tetani проводят в следующих случаях:

- для подтверждения клинического диагноза столбняка у больного или умершего;
- для проверки на стерильность перевязочного, шовного материала, изделий медицинского назначения, применяемых для парентерального введения;
- для оценки состояния окружающей среды и эпидзначимых объектов (почва, пыль, воздух в операционных и перевязочных и др.).

Так как клиническая картина столбняка бывает весьма характерна, лабораторная диагностика может служить для подтверждения диагноза чаще всего ретроспективно, поскольку манифестная клиника обычно свидетельствует о далеко зашедшем процессе.

Серологические исследования материала от больных столбняком не имеют диагностического значения.

При типичной клинической картине лабораторная диагностика может не требоваться. Необходимость в ней возникает при спорных и неясных случаях, и когда требуется подтверждение диагноза после операций, абортов, родов на дому без медицинской помощи.

2. Основные свойства возбудителя столбняка.

Возбудителем столбняка является Clostridium tetani, прямая палочка длиной 2,4 – 5,0 мкм, диаметром 0,5 – 1,1 мкм, иногда образующая длинные нити. Большинство штаммов подвижны. Споры круглые, располагаются терминально, придавая возбудителю вид булавки или барабанной палочки. Грамположительна, но в старых культурах становится грамотрицательной. Капсулы не образует. Оптимальная температура для роста 37°С (диапазон роста 14-45°С). На среде Китта-Тароцци рост медленный, с равномерным помутнением и редким газообразованием (с сахоролитическими свойствами не обладает, лишь редкие штаммы ферментируют глюкозу). Культура издает своеобразный неприятный запах выгребной ямы. На кровяном агаре колонии размером 4 – 6 мм, круглые, плоские с неровными краями, полупрозрачные, серые, нередко в виде переплетающихся нитей напоминающих паучков; вокруг колоний – зона гемолиза. В столбике агара колонии в виде комочков ваты. С. tetani обладает слабыми протеолитическими свойствами, медленно гидролизуют желатин, молоко свертывают к 4-7 дню в виде мелких хлопьев, затем наступает его пептонизация; не образует индола, восстанавливает нитраты в нитриты.

Главным фактором патогенности C. tetani определяющим патогенез и клинику столбняка, является вырабатываемый им сильнейший экзотоксин. Экзотоксин состоит из двух фракций тетраноспазмина (нейротоксина) и тетанолизина (разрушает эритроциты).

Резистентность. Вегетативные формы C. tetani не отличаются особой устойчивостью. При кипячении они разрушаются в течение 5 мин. Напротив, споры C. tetani обладают исключительно высокой резистентностью к различным физическим и химическим воздействиям. Для их разрушения требуется кипячение в течение 1-3 часов; автоклавирование при 120°С они переносят до 40 мин. Споры нечувствительны к низким температурам, к рассеянному солнечному свету. Они практически нечувствительны к химиотерапевтическим препаратам. В высушенном состоянии споры сохраняют жизнеспособность несколько десятков лет, в почве сохраняются длительное время, а при благоприятных условиях могут в ней прорастать и размножаться. Поэтому почва, особенно загрязненная испражнениями животных и человека, является неиссякаемым резервуаром C.tetani и постоянным потенциальным источником заражения людей и животных столбняком.

3. Особенности эпидемиологии.

Возбудитель столбняка распространен повсеместно в почве и других объектах внешней среды, поэтому проблема столбняка имеет глобальное значение. Больной столбняком человек неконтагиозен – передачи возбудителя столбняка от больного не происходит. Основным путем заражения является проникновение возбудителя через поврежденные кожные покровы и слизистые оболочки. Местом входных ворот служат различные раны: огнестрельные, колотые, резаные, занозы, потертости, ожоги, обморожения, травмированные родовые пути (послеродовый или послеабортный столбняк), операционные раны при инфицировании их руками, инструментами или перевязочным материалом. Иногда травмы настолько ничтожные, что входные ворота остаются необнаруженными (криптогенный столбняк). Особенно серьезную глобальную проблему представляет столбняк новорожденных (tetanus neonatorum). Он связан с тем, что в целом ряде развивающихся стран при обработке пуповины применяют такие традиционные методы (при родах на дому), как использование золы, земли, глины, навоза, помета птиц, порошков, приготовленных из различных растительных продуктов и других субстратов, которые часто содержат споры C.tetani. Попадая через пупочный канатик, они и служат причиной столбняка новорожденных. Летальность при этой форме столбняка составляет в среднем 85% и достигает максимальных значений на 6-8 день жизни больного ребенка. По оценке ВОЗ, в 80-х годах XX в. ежегодно в развивающихся странах от столбняка новорожденных умерло более 1 млн. детей, а общее число случаев столбняка в них составляло более 2,5 млн.

4. Лабораторная диагностика.

4.1. Материал для исследования.

Соответственно данным о патогенезе столбнячной инфекции, возбудителя можно обнаружить на месте проникновения в организм. Исследованию подвергают ткани вокруг предполагаемых входных ворот, а также гнойной, перевязочный материал (тампоны), лоскуты одежды, попавшие в рану, и пр. При столбняке у женщин после родов или аборта исследуют выделения из матки, у новорожденных берут выделения из пупка. Гной при большом его количестве (5-7 мл.) транспортируют непосредственно в шприце или помещают в стерильную пробирку. Для взятия материала из глубины раны используют стерильные ватные тампоны. Материал для исследования стерильного перевязочного материала и почвы берут как обычно.

При сборе материала от трупа рекомендуется, кроме сказанного, обратить внимание на старые рубцы и воспалительные очаги, а также взять кровь (5 мл) и кусочки печени и селезенки (по 20 г).

4.2. Подготовка проб к исследованию.

Микробиологическая диагностика включает в себя следующие 3 этапа:

1) бактериоскопия исходного материала;
2) посев для выделения возбудителя и его идентификации;
3) обнаружение столбнячного токсина.

На первом этапе исследования производят микроскопию нативного материала. Приготовить из растертого материала, а также из гноя и отделяемого ран мазки и окрасить их по Граму. Наличие типичных бацилл с терминальной спорой (барабанные палочки), окрашивающихся по Граму положительно, заставляет настойчиво искать подтверждение бактериологическим методом. Изучение мазка позволяет также ориентироваться в наличии и составе сопутствующей флоры.

Целью второго этапа бактериологического исследования является выделение возбудителя. Для этого собранный для исследования материал, кроме жидкого, переводят в жидкую фазу путем растирания его физиологическим раствором в стерильной фарфоровой ступке. Посев производят в регенерированную среду Китта-Тароцци – в двойное количество пробирок и один ряд пробирок прогревают при 80°С 20 минут. Эта процедура позволяет избавиться от находящихся в пробе вегетативных форм бактерий и существенно упрощает выделение спорообразующих анаэробов. Исследование гретого и негретого материала в дальнейшем ведут параллельно.

Посевы культивируют при 37°С. Через 2, 4, 6 и 10 дней приготовляют мазок и микроскопируют после окраски по Граму. Наличие типичных микробов позволяет произвести высев на кровяной агар в чашках (инкубирование в условиях анаэростата) или в высокий столбик агара в пробирках, где наблюдают появление типичных колоний.

На поверхности кровяного агара клостридии столбняка растут в виде нежных прозрачных колоний, похожих на капельки росы, которые быстро распространяются и образуют нежную сетчатую пленку, покрывающую всю чашку и плохо видимую невооруженным глазом. Полезно воспользоваться нейтрализацией гемолизина при помощи антитоксической сыворотки. С этой целью перед

посевом половину поверхности агара в чашке смачивают сывороткой, дают подсохнуть и производят посев на всей чашке. Сравнение роста на обеих половинах позволяет обнаружить специфическое угнетение гемолиза на той части чашки, где был нанесен антитоксин (Антитоксическая сыворотка не должна содержать консерванта, который может задержать рост клостридий столбняка).

В пробирки с высоким столбиком агара бульонную культуру высевают из пробирки, которая была предварительно прогрета, чтобы избежать загрязнения аэробами. Для посева агар растапливают и охлаждают до 45°С. Чтобы получить рост отдельных колоний, посев производят запаянной пастеровской пипеткой, которую смачивают в посевной жидкости, а затем последовательно переносят в 2-3 пробирки расплавленного агара, после чего быстро опускают последние в холодную воду, чтобы задержать распространение подвижных клостридий. Через 1-2 дня пребывания засеянных пробирок в термостате палочка столбняка вырастает в виде плотных чечевицеобразных колоний или в виде колоний пушинок.

Решающим признаком для диагностики столбняка является обнаружение токсина. Для выявления токсического действия культуры или первичного материала ставят биологический опыт-реакцию нейтрализации на белых мышах. Исходный материал, полученный от больного или трупа, после растирания и посева оставляют в ступке на 1 час для экстрагирования токсина. Экстракт или культуру на жидкой среде фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Часть приготовленного фильтрата смешивают с антитоксической сывороткой таким образом, чтобы на каждый мл экстракта приходилось 0,5 мл антитоксической сыворотки, разведенной до содержания 400 АЕ в 1 мл. Двум мышам внутримышечно в бедро задней лапки вводят по 0,5 или по 1 мл фильтрата, а двум – 0,75 или 1,5 мл смеси фильтрата с антитоксином.

Симптомы столбняка развиваются у животных на 2-3 сутки в мышцах той стороны, на которой введен токсин (ригидность хвоста, взъерошивание шерсти). Затем быстро наступает паралич, сначала конечностей, а вслед за ними остальных мышц тела. Гибель животного наступает при общем параличе мышц. Мыши погибают в характерной позе, вытянув задние лапки (поза тюленя). У животных, получивших смесь фильтрата с антитоксином, заболевание не наступает. Зараженных животных наблюдают 4-5 дней, инкубационный период равен 2-4 дням.

Таким образом, наиболее простым и эффективным методом лабораторной диагностики столбняка является биологическая проба на белых мышах.

Перечень нормативно-методической документации:

- Приказ минздрава области и центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Ростовской области от 07.07.99г. №101/92 «Об усилении мероприятий по борьбе со столбняком в области и выполнении приказа Минздрава РФ от 17.05.99г. №174 «О мерах по дальнейшему совершенствованию профилактики столбняка»;
- А.И. Коротяеев, С.А. Бабичев «Медицинская микробиология, иммунология и вирусология», 1998 год;
- А.М. Королюк, В.Б. Сбойчаков «Медицинская микробиология», 1999 год.
- М.Х. Турьянов «Микробиологическая и вирусологическая диагностика», 1995 год.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СТОЛБНЯКА

Гл. редактор Айдинов Г.Т.

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован отделом информационных технологий центра Госсанэпиднадзора в Ростовской области
тел. (8632) 51-05-85, факс (8632) 51-04-92, E-MAIL gost.e-ecolog.ru

344019, г. Ростов-на-Дону, 7-я линия, 67
Министерство здравоохранения Российской Федерации
Центр Госсанэпиднадзора в Ростовской области

\Lena\\LENA\C\Мои документы\метод. указания\По лаб. диагностике столбняка.doc

gost.e-ecolog.ru