



Difteeria diagnostika

Kliinilise mikrobioloogia sektsiooni seminar

Rita Peetso, Jelena Viktorova

12.04.2022 Tallinn



TERVISEAMET

Difteeria ehk kurgutõbi

Difteeria on äge bakteriaalne nakkushaigus, mis kahjustab põhiliselt ülemisi hingamisteid ja nahka. Tekitajaks on mitteliikuv, eoseid mittemoodustav, grampositiivne batsill ja mõnede liikide produtseeritav eksotoksiini toime.

- *Corynebacterium diphtheriae* v. *mitis*, *gravis*, *intermedius*, *belfanti*
- *Corynebacterium ulcerans*
- *Corynebacterium pseudotuberculosis*
- *Corynebacterium rouxii*

Mittetoksigeensete *C. diphtheriae* ja *C. ulcerans* kliiniline ja epidemioloogiline tähtsus on ebaselge. Nahavormide väljakülvis sageli *Streptococcus pyogenes* ja *Staphylococcus aureus*.



Nakkuse allikas, levik, kliiniline pilt

- ▶ Nakkuse allikaks on haige inimene või bakterikandja. Haigus levib otsese kontakti kaudu inimeselt inimesele, samuti piisknakkusena köhimisel ja aevastamisel.
- ▶ Kliinilised sümptomid: • tursunud lümfisõlmed • kurguvalu • häälekaotus • köha • hingamispuudulikkus • neelamisraskused • neuropaatia
- ▶ Klassikaline hingamisteede difteeria algab katulise mandlipõletikuga, mis võib levida sügavamale hingamisteedesse tekitades hingamisteede sulguse. Palavik ei ole tavaliselt kõrge.
- ▶ Eksotoksiin põhjustab lokaalset kudede nekroosi ja vereringesse imendudes tokseemiat ja süsteemseid tüsistusi, sealhulgas perifeersesest neuriidist tingitud halvatust ja müokardiidist tingitud südamepuudulikkust. Haigus võib lõppeda surmaga.
- ▶ Inkubatsiooniperiood: 2-5 päeva. Ravita haige on nakkusohtlik: 2-3 nädalat.



Difteeria-positiivsed juhud Ida-Tallinna Keskhaiglas

- ▶ 42 a mees
 - Diagnoos: septiline endokardiit
 - Isolaat verekylvist (02.02.2022):
 - *Corynebacter diphtheriae* variant *gravis* mittetoksigeenne
- ▶ Ravimresistentsuse määramise kõigil isolaatidel saarnased tulemused:
 - ❖ Penitsilliin R
 - ❖ Klindamütsiin T
 - ❖ Linesoliid T
 - ❖ Vankomütsiin T

- ▶ 42 a mees
 - Diagnoos: mädane pleuriit, kopsu empüeem
 - Isolaat haavamaterjalist (09.02.2022)
 - *C. diphtheriae* v *gravis* (tox -)
- ▶ 60 a mees
 - Diagnoos: tselluliit
 - Isolaat haavamaterjalist (16.02.2022)
 - *C. diphtheriae* v *gravis* (tox -)



Epidemioloogiline olukord

- ▶ Enne difteeria immuniseerimise laialdast kasutamist oli see haigus laste peamine surmapõhjus.
- ▶ Viimane suurim haiguspuhang leidis aset Vene Föderatsioonis 1990. aastal. Aastatel 1990–1997 teatati enam kui 115 000 juhtumist ja 3000 surmajuhtumist.
- ▶ Euroopa piirkonnas teatatakse jätkuvalt üksikjuhtumitest. Aastatel 2015–2016 teatati kolm surmaga lõppenud difteeria juhtumit, millest kaks olid vaksineerimata lastel.
- ▶ Eestis diagnoositi difteeria viimati 2000. a ja 2000.a kummalgi 2 juhtu.
- ▶ Kagu-Aasia, Lõuna-Ameerika ja Aafrika riikides on haigus endiselt tõsine probleem.
- ▶ Difteerial on potentsiaal uuesti esile kerkida piirkondades, kus elanikkonna vaksineerimise kaudu saavutatav immuunsus ei ole piisav.
- ▶ Euroopas on riike, kus vaksineerituse hõlmatus <90%. Samuti difteeria antitoksiini üldine kättesaadavuse puudumine on tekitanud muret.



Suurenev difteeriaoht

- ▶ Cambridge'i ülikooli teadlaste Robert C Will ja Ankur Mureja viide The Conversation veergudel.
- ▶ Hinnang põhineb difteeriatekitaja *Corynebacterium diphtheriae* genoomi uuringutel.
- ▶ Ringluses on rohkelt mikroobi muteerunud variante, mis kannavad difteeriatoksiini mutatsioone.
- ▶ Seega kasutusel olev difteeriavaktsiin ei anna piisavat kaitset muteerunud mikroobitüvedega nakatumise korral.
- ▶ Paljud muteerunud tüved on resistentsed antibiootikumidele.
- ▶ Ringluses on difteeriatekitajate muteerunud variante, mis on teataval määral kohanenud difteeriavaktsiini ja antibiootikumidega. Nende tekitatud haiguse sümptomaatika on erinev seni tuntud difteeria sümptomaatikast, haigus on raskemini diagnoositav ja allub vähem difteeria anatoksiinile ja antibiootikumidele.



Kliinilise diagnoosi kinnitamine

- Difteeriat on mõnikord raske kliiniliselt diagnoosida, eriti riikides, kus seda haigust esineb harva.
- Difteeriat võib sageli segi ajada teiste haigusvormidega, nagu raskekujuline tonsillit, streptokokkidest põhjustatud kurguvalu, Vincenti stenokardia või näärmepalavik.
- Diagnostika- kui ka referentlaborite mikrobioloogiline tulemus on ülioluline õige kliinilise diagnoosi panemisel või täiendamisel.
- Labor aitab välistada kahtlasi juhtumeid või kontakte edasisest kliinilisest uuringust, vältides nii tarbetuid ravi- või kontrollimeetmeid.



Uuritav materjal

- Materjal külviks tuleb võtta enne ravi alustamist (nasofarüngeaal-, kurgu-, haava- või nahakahjustused).
- Võimalusel võtta tampooniga pseudomembraani alt või eemaldada membraani tükk.
- Kui antibiootikumiraviga on juba alustatud, tuleks siiski võtta külvi jaoks proovid.
- Difteeria kahtlusest peaks eelnevalt laborit teavitama.



Laboratoorne diagnostika

- Kylvimeetodil difteeriatekitaja isoleerimiseks külvatakse materjal:

- Veriagarile

Hallikasvalged kumerad pesad, teralise pinna ja poolläbipaistvate servadega

- Veritelluriitagarile

Hallid või mustad ühtlaselt ümarad pesad

- Külve inkubeeritakse aeroobsetes tingimustes $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ juures 24-48 tundi.

- MALDI-TOF samastab liigi tasemel: *Corynebacterium diphtheriae*,
Corynebacterium ulcerans, *Corynebacterium striatum*

- *C. diphtheriae* biovariantide tuvastamist teostatakse biokeemilise testiga.



Corynebacter diphtheriae külvid

veritelluriitagaril



veriagaril



Corynebacterium spp biokeemiline identifitseerimine

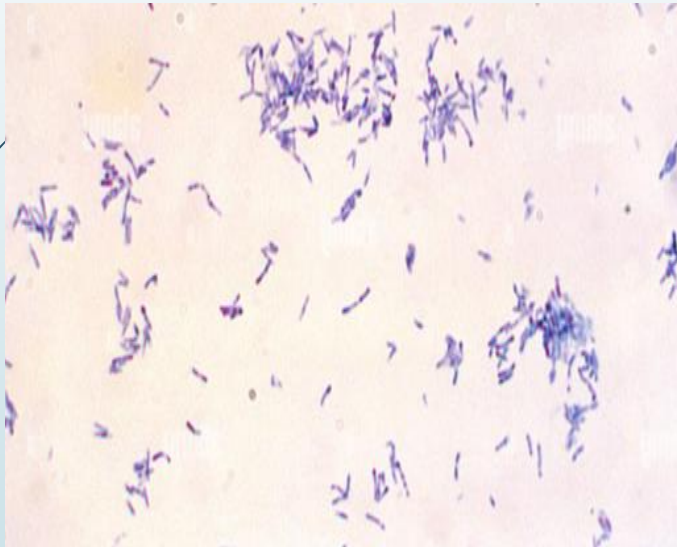
Liik	Tsüst	Püras	Glük	Malt	Sahh	Tärk	NO ₃	Ure
<i>C. diphtheriae</i>								
var. <i>gravis</i>	+	-	+	+	-	+	+	-
var. <i>mitis</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
var. <i>belfanti</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
var. <i>intermedius</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>C. ulcerans</i>	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>C. xerosis</i>	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>C. striatum</i>	-	+	+	-	v	-	+	-
<i>C. amycolatum</i>	-	+	+	v	v	-	v	v

Lühendid: tsüst - tsüsteini moodustumine; püras - pürasiinamidaasi aktiivsus; glük - glükoos; malt - maltoos; sahh - sahharoos; tärk - tärklis; NO₃ - nitraadi taandamine; ure - ureaas.





Difteeria isolaadi samastamine MALDI-TOF'i puudumisel

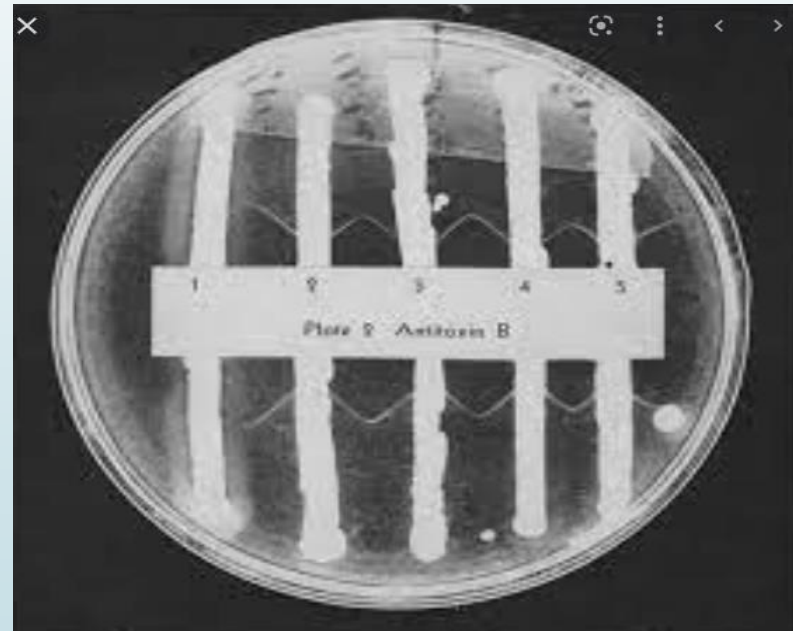
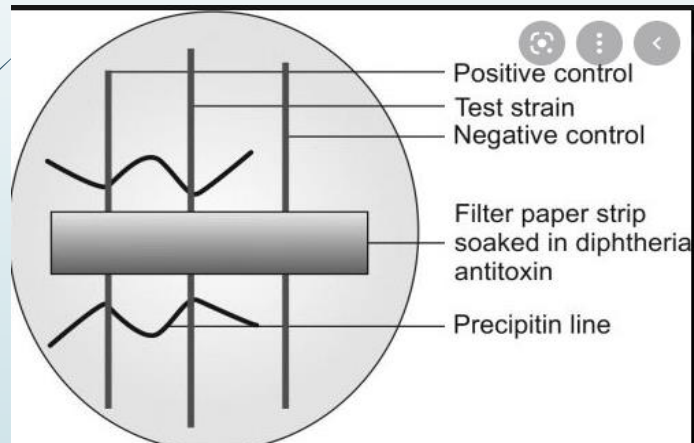


- ▶ API CORYNE Test
- ▶ mikroskoobis grampositiivsed difteroidid, katalaas positiivne
- ▶ tsüsteinaas-test positiivne
- ▶ pürasiinamidiaas-test negatiivne



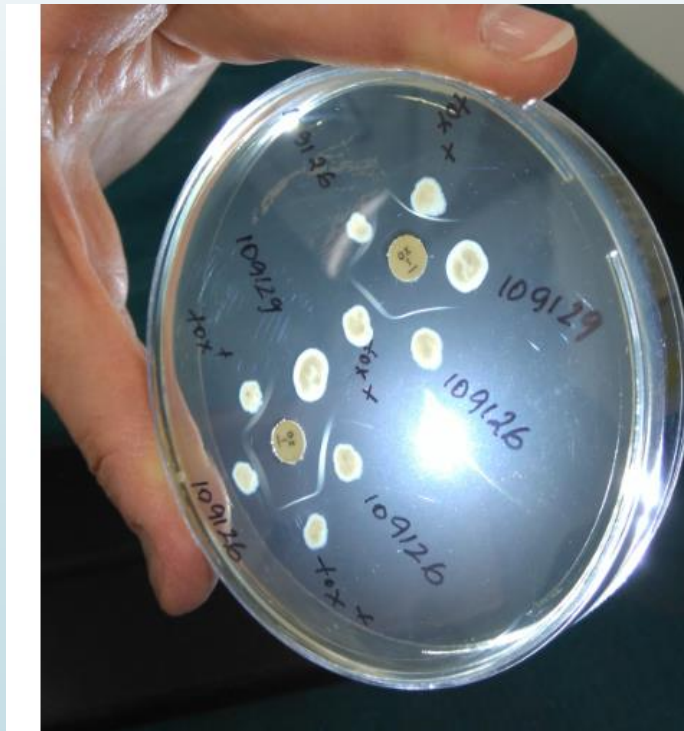
Difteeria toksigeensuse määramine

- ELEK test (traditsiooniline)



Modifitseeritud ELEK test

Värskelt valmistatud Elek-agarile asetatakse difteeria antitoksiiniga immutatud ketas.



Test töötab immunodifusiooni põhimõttel:

- ▶ Uuritav kultuur külvatakse väikese laiguna vastavalt šabloonile ümber ketta.
- ▶ Kõrvuti uuritava teha külvid negatiivse (mittetoksigeense) ja positiivse (toksigeense) kultuuriga.
- ▶ Tasse inkubeeritakse 18-48 tundi 37°C juures.
- ▶ Positiivse (toksigeensus) tulemuse korral tekib antitoksiiniketta ja uuritava kultuuri vahele pretsipitatsiooni liin.



Difteeria diagnostika molekulaarmedetoditel

- Identifitseerimis-, kinnitus- ja toksigeensustesti saab algsest läbi viia PCR'I või reaalaajas PCR-iga (qPCR)4 isolaadist eraldatud DNA põhjal.
- Isolaadid, mis on qPCR-positiivsed toksiinigeeni (tox+) suhtes, tuleb kinnitada Elek-testiga.
- *C. diphtheriae* isolaadid võivad PCR-I olla tox-geeni suhtes positiivsed, kuid toksiini mitte toota; st Elek testi annab negatiivse tulemuse.
- Need tüved ei põhjusta difteeriat ja seetõttu ei vaja ravi antitoksiiniga.
- Kui tuvastatakse sümptomaatilistel patsientidel või asümptomaatilisel kandjatel, tuleb need siiski elimineerida antibiootikumidega sarnaselt toksigeensete tüvede leiu puhul.



Difteeria diagnostika molekulaarmedetoditel

- ▶ Toksiinigeeni PCR-i negatiivne tulemus on lõplik.
- ▶ Toksiinpositiivse PCR tulemuse korral alustada meetmetega ootamata Elek-testi tulemusi.
- ▶ Elek-test võtab aega 24 tundi.
- ▶ Liigiidentsuse kinnitamine traditsiooniliste fenotüübimeetoditega võib kesta ≥ 48 tundi.
- ▶ PCR-analüüsid võimaldavad tuvastada toksiini kandvat geeni DNA ekstraktides 4 tunni jooksul.



Difteeria-võrgustik

- WHO ettevõtmisel loodi 1993. aastal Difteeria Euroopa laborite tööühm (ELWGD) reageerimaks difteeria epideemiatele endises NL-s. ELWGD eesmärk oli hinnata labori võimekust, välja töötada laborijuhised ja visandada tulevased uuringuvajadused.
- 2003. a asutati difteeria epidemioloogiline-seirevõrgustik (DIPNET), mis 2010. aastal läks üle ECDC-le Euroopa difteeria seirevõrgustikuna (EDSN).
- 2009. a loodud Euroopa difteeria seirevõrgustiku (EDSN) laboritegevust määrati koordineerima Inglismaa rahvatervise büroo (PHE).
- EDSN viis läbi väliseid kvaliteedikontrolltöid (EQA) ja laboridiagnostika koolitusi, et parandada ja tugevdada laboripõhise järelevalve suutlikkust.
- EDSN jätkas edukalt kuni 2012. aastani, mil ECDC tegevuste rahastamise lõpetas.
- 2018. a tegevus jätkub koolituste ja pädevustestide (2021. a) näol.





TERVISEAMET

Tänu kuulamast!

