

## Занятие 4

**Тема: МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ  
ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА И ДРУГИХ  
МИКОБАКТЕРИОЗОВ.**

# Таксономия микобактерий

- Отдел Firmicutes
- Порядок: Actinomycetales
- Семейство Mycobacteriaceae
- Род Mycobacterium
- Виды: **M. tuberculosis** (tuberculum – бугорок)
- **M. bovis**
- **M. leprae**
- M. kansasii
- M. xenopi
- M. ulcerans

# Возбудители туберкулеза

Семейство *Mycobacteriaceae*

Род *Mycobacterium*

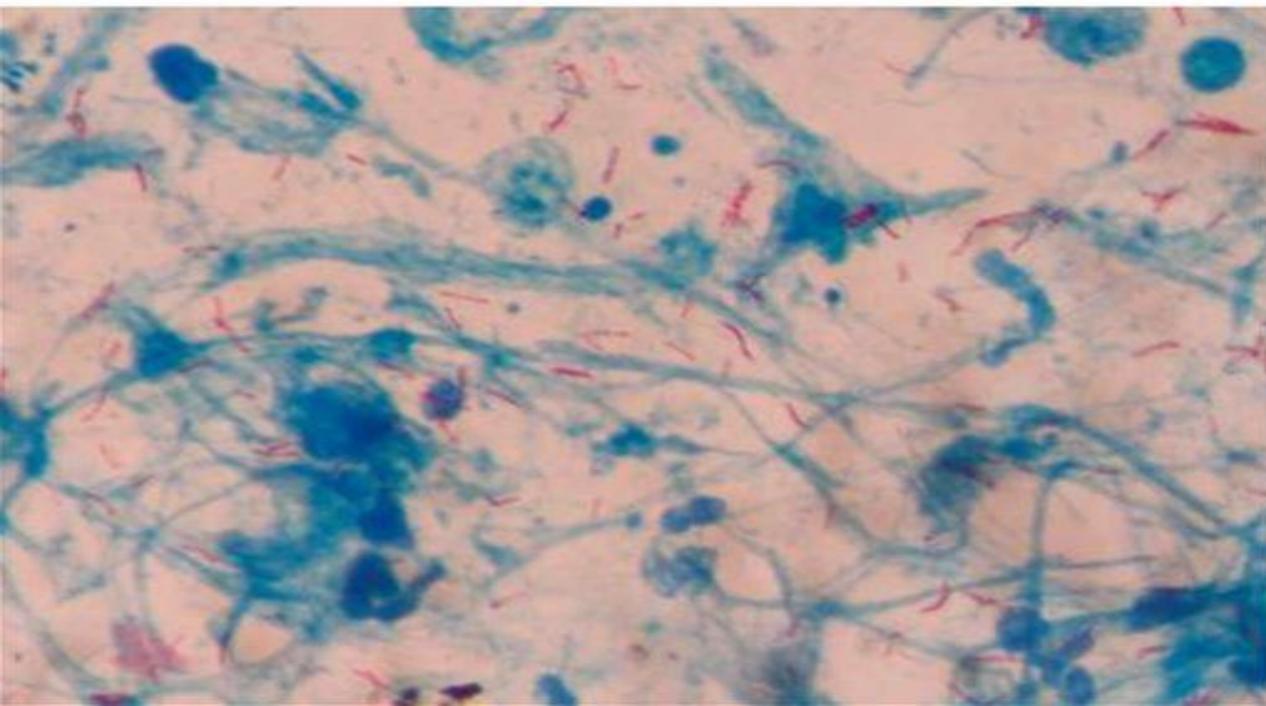
Вызывающие туберкулёз виды микобактерий объединены в комплекс *M.tuberculosis*,

включающий *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*

- ❑ Бактерии, входящие в МТВС (*Mycobacterium tuberculosis complex*), имеют высокую степень родства (порядка 99,9 %) и идентичны по последовательностям 16S рРНК.
- ❑ У человека чаще всего возбудителем является *Mycobacterium tuberculosis*. Второй по частоте является *Mycobacterium bovis* (1-4%).

# Морфология и тинкториальные свойства

- Палочки, слегка изогнутые, размером  $0,3-0,6 * 1,0-4,0$  мкм. **Грамположительные.** Окрашиваются по методу Циля-Нильсена в красный цвет. Характерен выраженный полиморфизм. В основном они имеют форму длинных тонких (*M. tuberculosis*, *M. africanum*) или коротких и толстых (*M. bovis*) палочек с зернистой цитоплазмой, содержащей от 2 до 12 зерен различной величины (зерна метафосфатов – зерна Муха). Иногда они образуют нитевидные структуры, напоминающие мицелий грибов, что и послужило основанием для их названия (*mykes* - гриб и *bacterium* - бактерия). Неподвижные. Спор не образуют. Имеют микрокапсулу.



В клеточной стенке содержится большое количество липидов (миколовая кислота и липоиды – до 40% от сухого веса), что определяет следующие свойства: **кислотоустойчивость** (5-10% кислоты), устойчивость к щелочам и спирту, к высушиванию, УФ, дез. средствам. Вызывают сенсibilизацию организма.

# Этиология

- Туберкулез вызывает микобактерия туберкулеза (**облигатный аэроб**), открытая Кохом в 1882 г. Различают 4 типа микобактерий. Для человека патогенны 2 из них:
  - *Mycobacterium tuberculosis* – воздушно капельный путь передачи;
  - *Mycobacterium bovis* – алиментарный путь передачи.

*Mycobacterium avium* и *Mycobacterium intracellulare* – непатогенны для нормального организма человека, но могут вызвать туберкулёз у больных с иммунодефицитами.

# Эпидемиология туберкулёза

## Источник инфекции:

- Больной человек
- Реже - животное

## Основной механизм (путь) передачи:

- аэрозольный (чаще – воздушно-пылевой)

## Дополнительный механизм (путь) передачи:

- алиментарный (заражение *M. bovis* от крупного рогатого скота через молоко и молочные продукты, чаще наблюдается у детей; однако заражение *M. bovis* от больных животных возможно и аэрогенным путем)

# Культуральные свойства

- ❑ Аэробы;
- ❑ Факультативные внутриклеточные паразиты
- ❑ Растут на средах, содержащих яйца, глицерин, картофель, аспарагин, витамины, соли;
- ❑ Чаще всего применяют яичную среду Левенштейна-Йенсена и синтетическую среду Сотона;
- ❑ растут медленно (рост обнаруживается через 2-3 недели и позднее);
- ❑ Колонии сухие, морщинистые, сероватые;
- ❑ Обладают биохимической активностью, позволяющей дифференцировать виды
- ❑ Основной тест – ниациновая проба (накопление в жидкой среде никотиновой кислоты)



***Среда Левенштейна-Йенсена и рост микобактерий.***

## Среда Финна - II

Среда Финна - II рекомендована в России как вторая стандартная среда для выделения микобактерий. Она отличается от среды Левенштейна-Йенсена тем, что вместо L-аспарагина в ней используется глутаминовокислый натрий и кислотность среды имеет более низкое значение ( $\text{pH} = 6,3-6,5$ ), чем кислотность среды Левенштейна-Йенсена ( $\text{pH} = 7,2-7,4$ ), и большую стабильность. Эти свойства обуславливают более высокую эффективность среды при засеве материала, обработанного щелочными детергентами. Рост микобактерий появляется на этой среде на несколько дней раньше, чем на среде Левенштейна-Йенсена, а процент выделения культур на 6-8% выше.

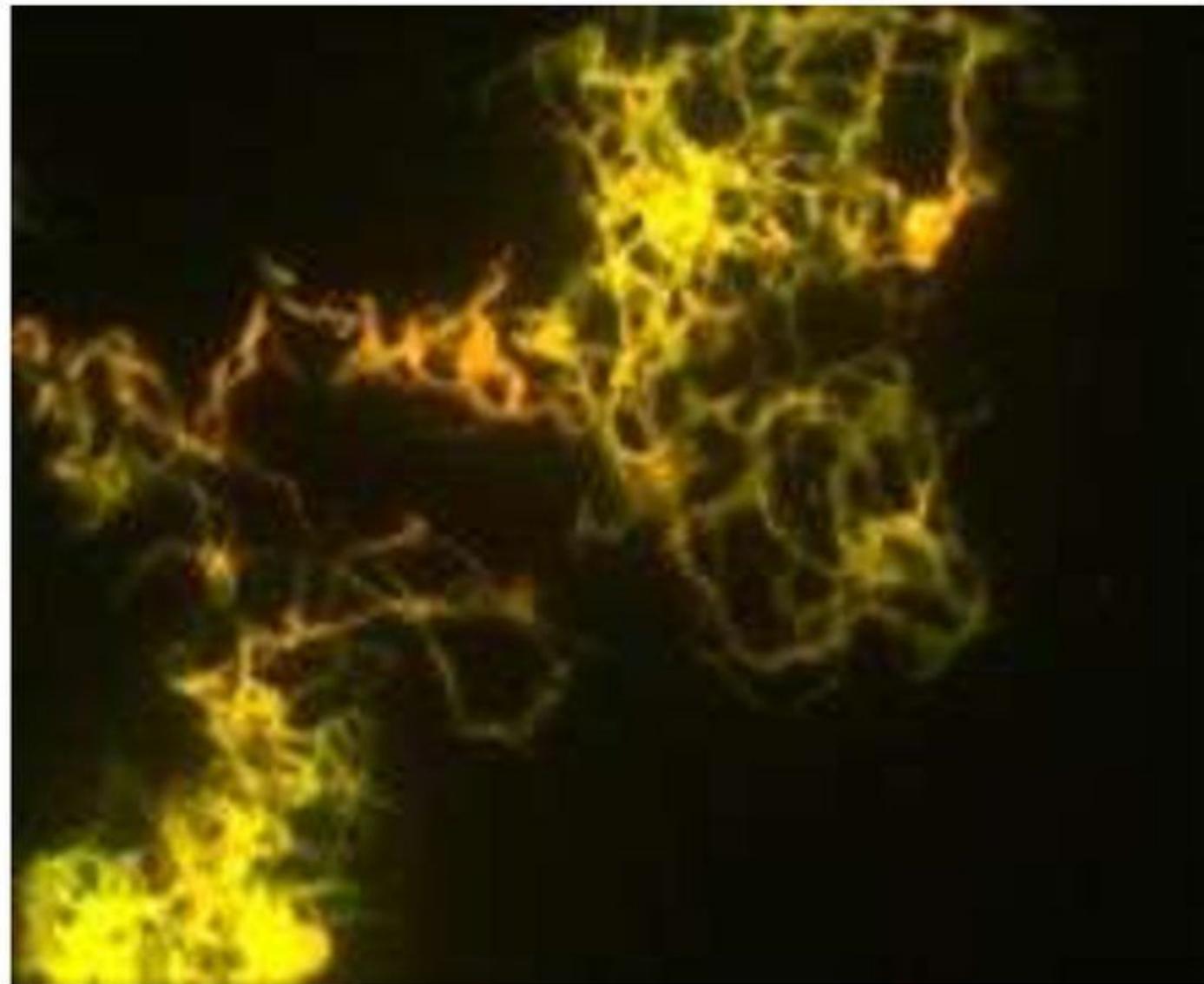
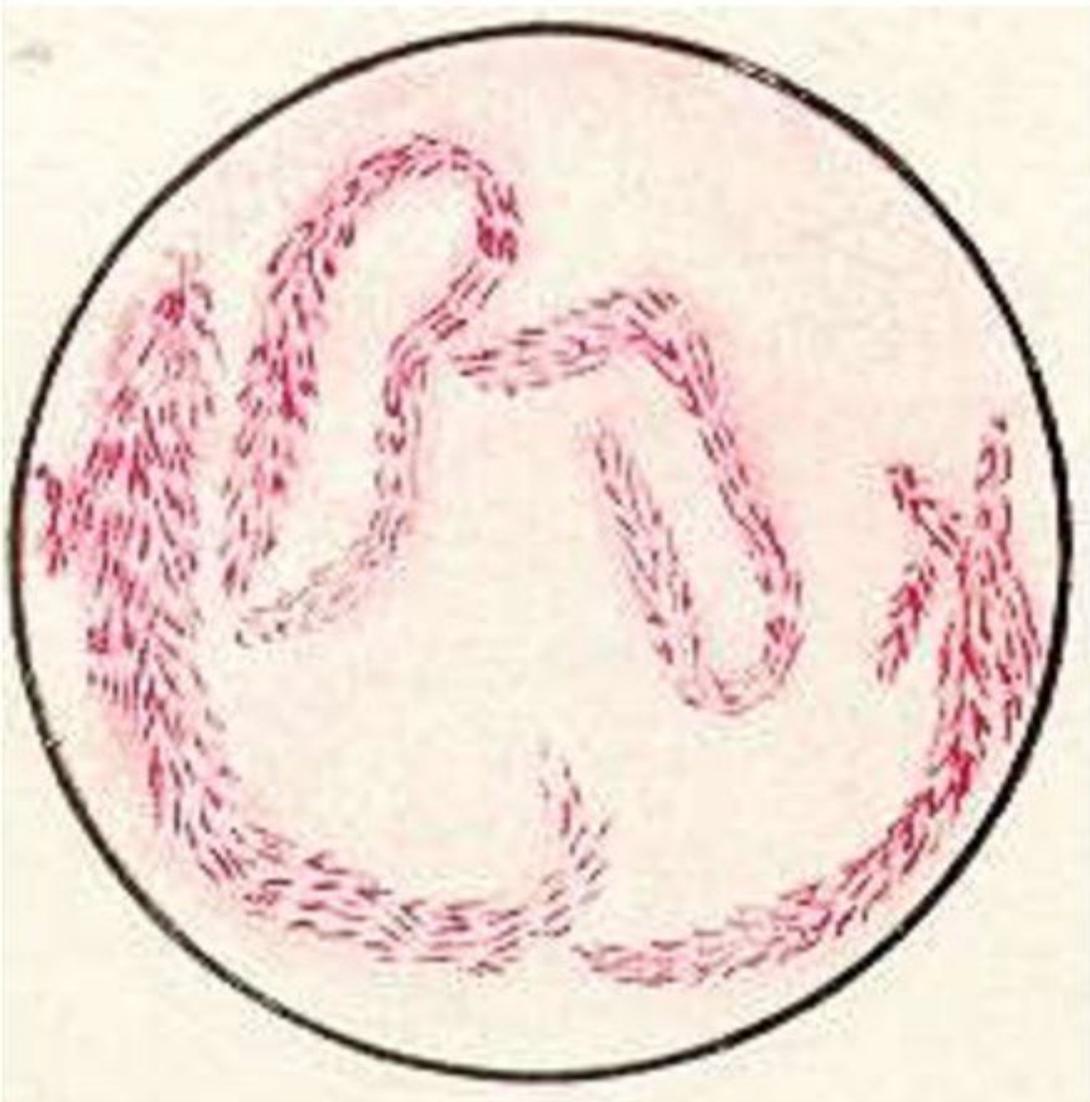


## Факторы патогенности

- **Фактор адгезии - корд – фактор** = сложный эфир трегаллозы и двухостатков миколовой кислоты;
- **Антифагоцитарные:** факторы – воска (особенно воск Д), сульфаты и некоторые другие соединения, препятствующие слиянию фаго- и лизосомы;
- **Сульфолипиды** подавляют активность лизосомальных ферментов;
- **Фосатидная и восковая** фракции липидов вызывают сенсбилизацию организма;
- Ацетон-растворимые липиды усиливают иммуносупрессивные свойства микобактерий и модифицируют мембраны клетки хозяина;
- Липиды обеспечивают устойчивость к комплементу, свободным радикалам фагоцитов
- Основной фактор – туберкулин – обладает токсическими и аллергическими свойствами

Корд-фактор (имеет отношение к вирулентности) *M.tuberculosis*: палочки, расположены в виде "косы", жгутов хорошо виден на жидких средах

- Корд-фактор ( рисунок- слева, люм.микроскопия- справа)



# Микробиологическая диагностика

- **Бактериоскопический метод:** микроскопия мазков (окраска по Цилю—Нильсену) из патологического материала, в том числе из мокроты, обогащенной гомогенизацией или флотацией.
- **Бактериологический метод:** посев на среду Левенштейна—Йенсена, Финн 2 и др., микрокультивирование по Прайсу (рост микроколоний при помещении мазка в жидкую питательную среду).
- **Биологическая проба:** заражение морских свинок и кроликов.
- **Серологический метод:** РНГА, ИФА; определяют антитела против комплекса антигенов клеточной стенки, липоарабиноманнана, гликолипидов, фибронектинсвязывающего антигена.
- **Кожно-аллергические пробы:** внутрикожное введение туберкулина (проба Манту).
- **Молекулярно-генетический метод:** ПЦР; метод генной дактилоскопии возбудителя — Саузерн-блот-гибридизация с использованием инсерционного элемента (IS) в качестве зонда.

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЁЗА

ПАТОЛОГИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ  
(ПРИ ТУБЕРКУЛЁЗЕ ЛЁГКИХ – МОКРОТА)



# Микробиологическое исследование при туберкулёзе

## I этап

Мокрота, экссудат из плевральной полости, спинномозговая жидкость, моча и др.

Деконтаминация, гомогенизация, обогащение

**Бактериоскопическое  
исследование**

Мазок, окраска по  
методу Циля-  
Нильсена и Боя  
(люминесцентный  
метод)

**Предварительный  
ответ**

**Бактериологическое  
исследование**

Посев на  
элективные среды  
(Левенштейна-  
Йенсена и др.),  
коммерческие  
системы

**Экспресс-методы  
диагностики**

Биохимические и  
молекулярно-  
биологические  
исследования:  
**ПЦР**

Кожно-  
аллерги-  
ческая проба  
с туберку-  
лином:  
реакция  
Манту

**Предвари-  
тельный  
ответ**

# Микробиологическое исследование при туберкулёзе

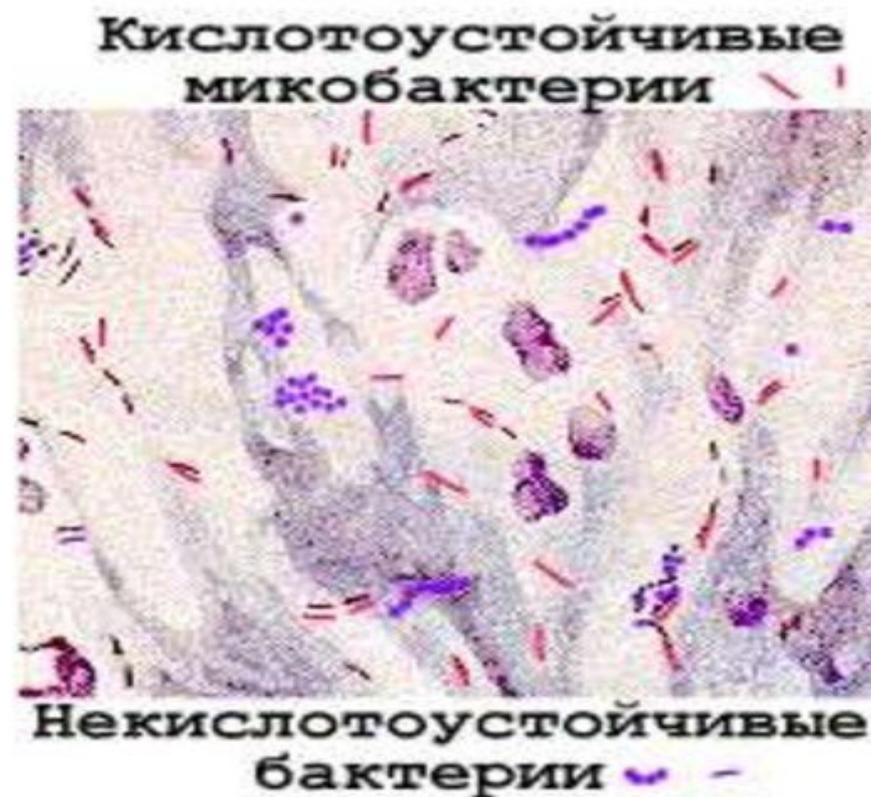
## II-III этапы



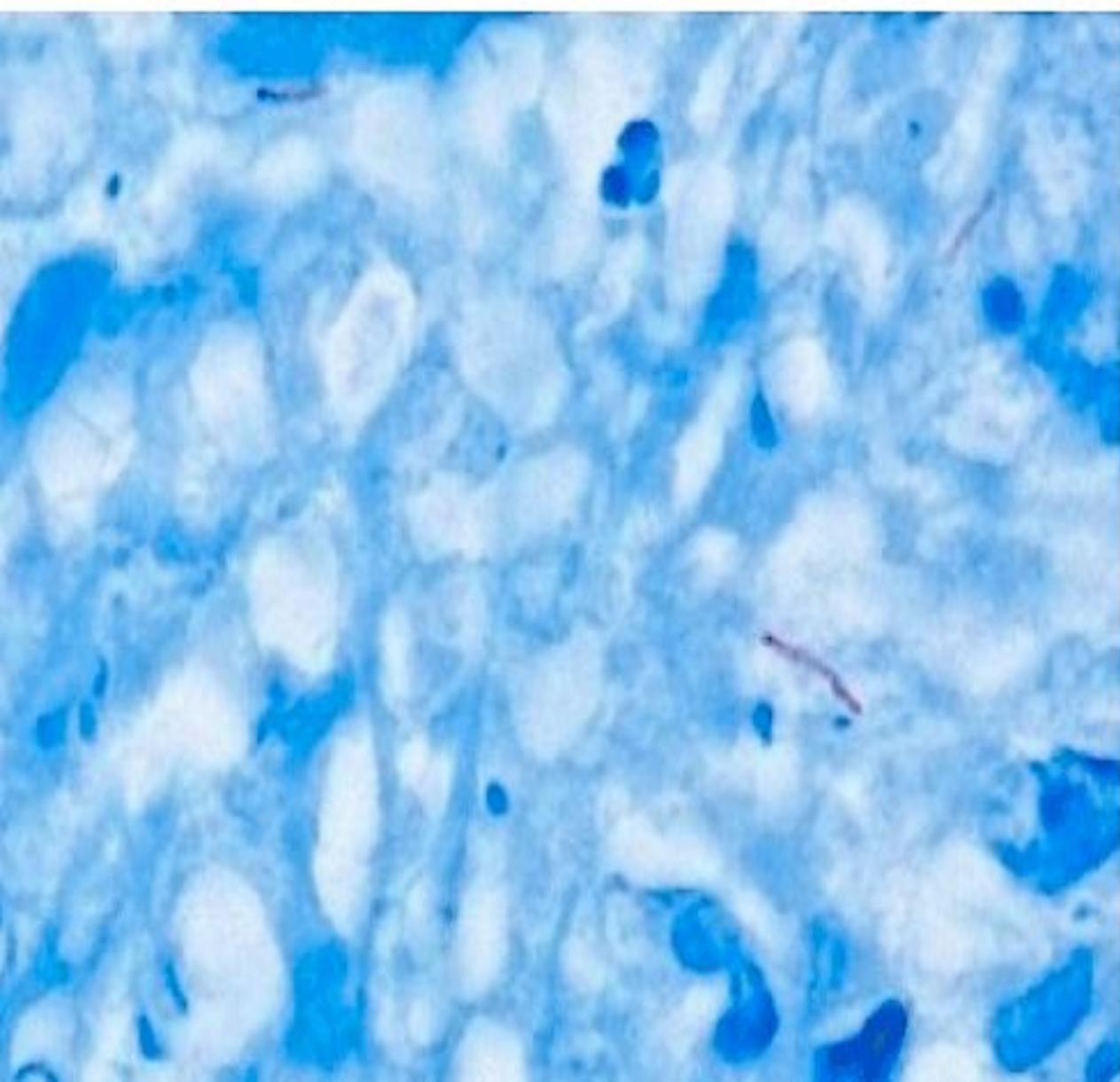
# Бактериоскопия

по методу Циля-Нельсена является основным методом выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУМ).

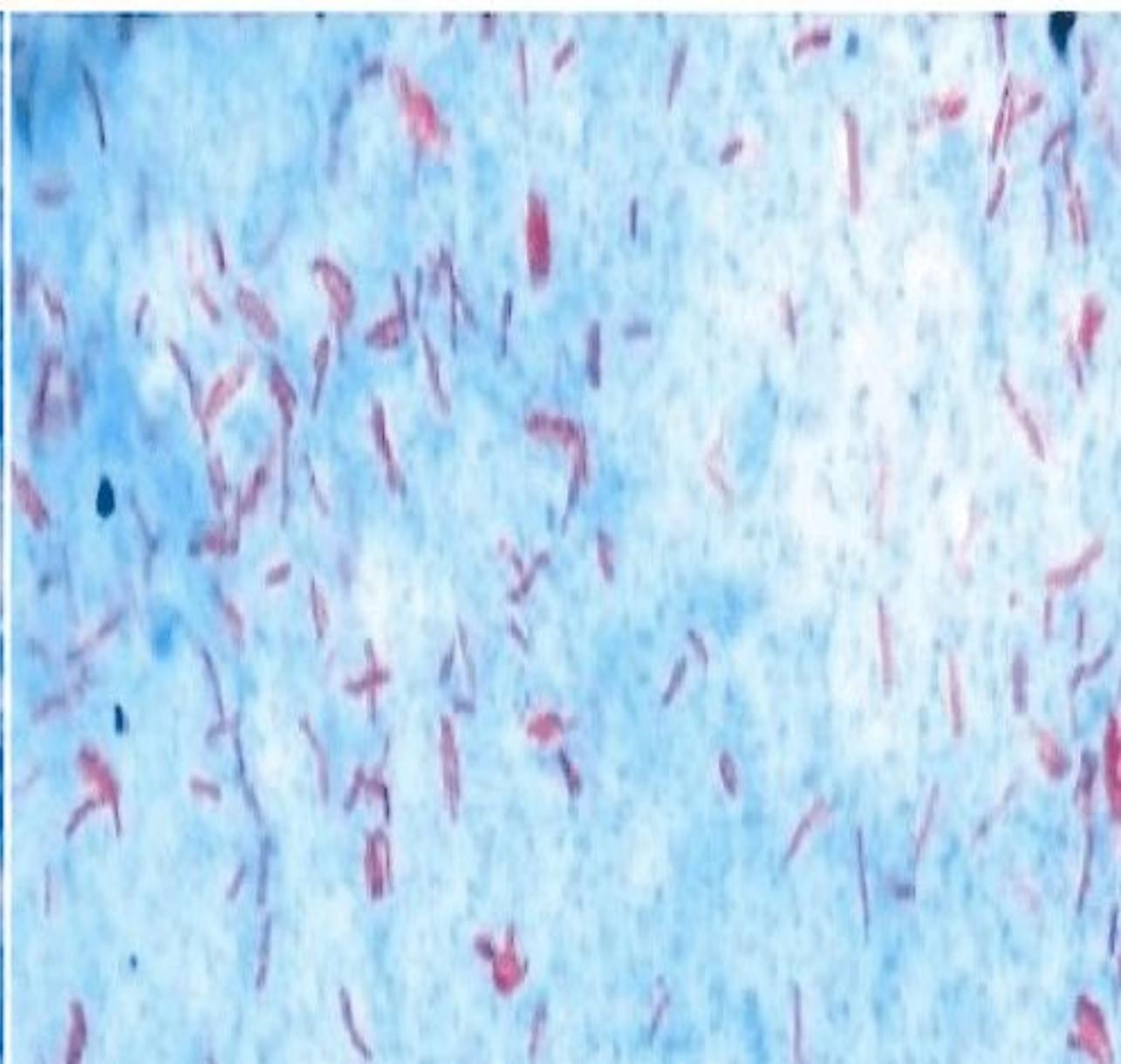
Мазки патологического материала обрабатывают карболовым фуксином, а затем обесцвечивают 5% раствором серной кислоты или 3% раствором солянокислого спирта. Докрашивают мазки 0,25% раствором метиленового синего. Окрашенные препараты просматривают в световом микроскопе с иммерсионной системой. КУМ окрашиваются в красный, а окружающий фон — в синий.

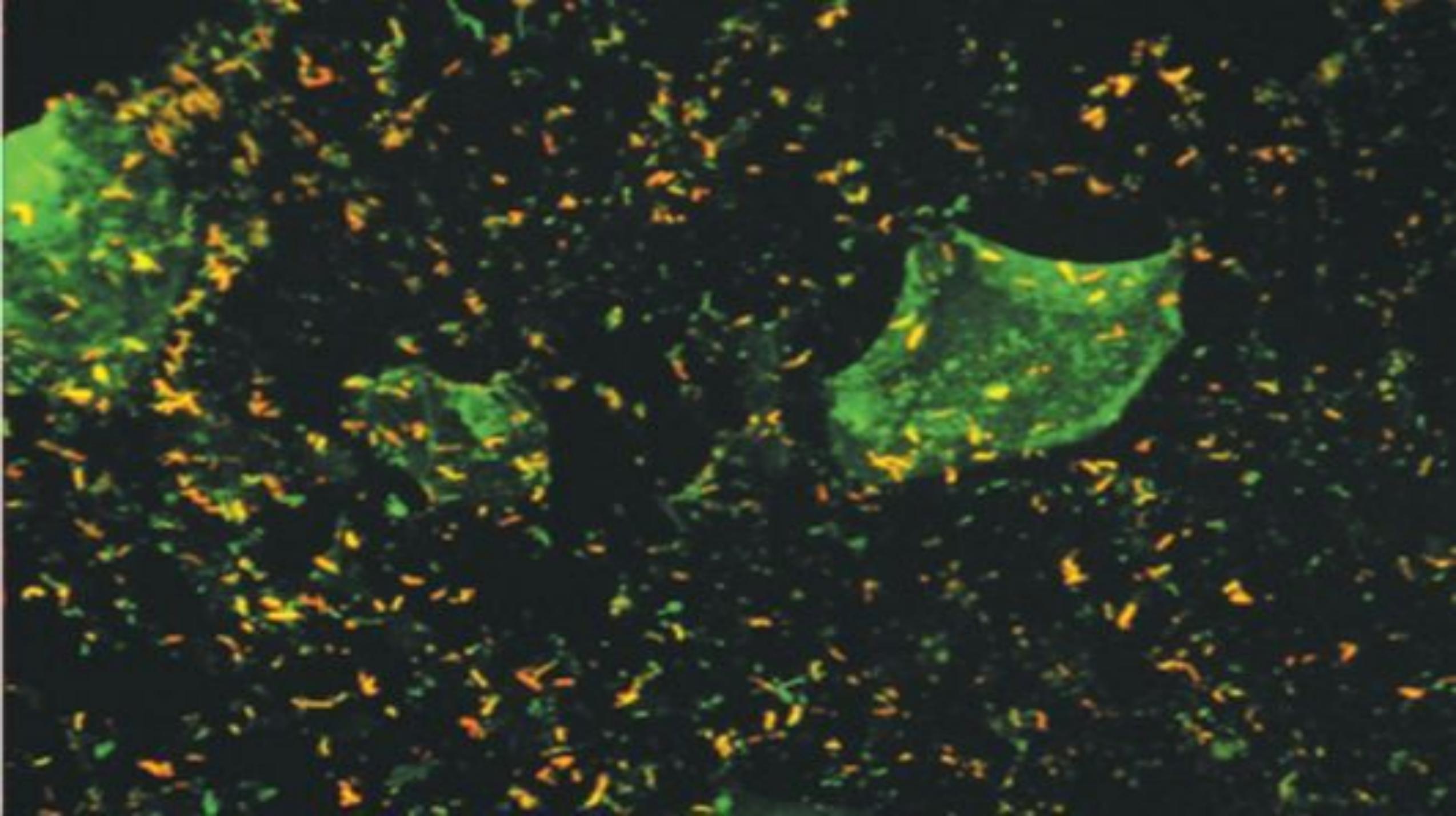


**Прямая окраска мазка мокроты по Цилю-Нильсену**



**Мазок из флотационного слоя по Цилю-Нильсену**





Метод люминесцентной микроскопии позволяет изучать живые нефиксированные бактерии, окрашенные сильно разведенными растворами красителей. Метод с большим эффектом может быть использован для ускорения диагностики туберкулеза.

# Проба Манту: оценка результатов

Результат пробы Манту оценивают через 72 ч. Для этого измеряют и регистрируют поперечный к оси предплечья размер инфильтрата. При отсутствии инфильтрата измеряют и регистрируют гиперемию.

Реакцию на туберкулин при пробе Манту оценивают по следующим критериям:

- отрицательная — инфильтрат и гиперемия отсутствуют;
- сомнительная — инфильтрат диаметром 2—4 мм или гиперемия любого размера;
- положительная — инфильтрат диаметром 5 мм и более.

При инфильтрате диаметром 5—9 мм реакцию считают слабоположительной, 10—14 мм — средней интенсивности, 15—16 мм — выраженной.

У детей и подростков реакцию называют гиперергической при инфильтрате диаметром 17 мм и более, а у взрослых — 21 мм и более.

Другими признаками гиперергической реакции могут быть появление везикулы, изъязвления, лимфангита или регионарного лимфаденита — независимо от размера инфильтрата.

# ДИАСКИНТЕСТ (*DIASKINTEST*)

- ❑ Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении.
- ❑ Представляет собой продуцируемые генетически модифицированной культурой *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT белки.
- ❑ Синтез данных белков кодируется уникальной (отличной от других микобактерий) последовательностью генома *M.tuberculosis*.
- ❑ *Два рекомбинантных белка (ESAT6/CFP10) отсутствуют у вакцинного штамма M.bovis BCG и большинства нетуберкулезных микобактерий, за счет чего тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью.*

# Диаскин-тест

- является дополнительным методом диагностики туберкулеза. Он позволяет определить наличие или отсутствие микобактерий tbc (туберкулеза) в организме. Диаскин-тест является более специфичным тестом, поскольку в его состав входят белки, вызывающие иммунную реакцию в организме только на микобактерии, вызывающие туберкулез.

