

Микробиологическая диагностика туберкулеза и других микобактериозов

Туберкулез

1. **Этиология** – инфекционное заболевание вызываемое различными видами микобактерий из группы *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis* и другими близкородственными видами) или иначе палочками Коха. Туберкулёз обычно поражает лёгкие, реже затрагивая другие органы и системы.

2. **Источник инфекции** – человек, животное.

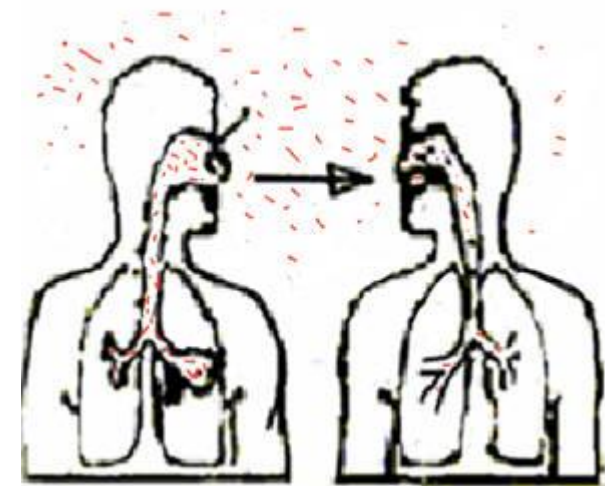
3. **Механизм и пути передачи**

1) воздушно-капельный (чихание, кашель);

2) алиментарный (через пищеварительный тракт);

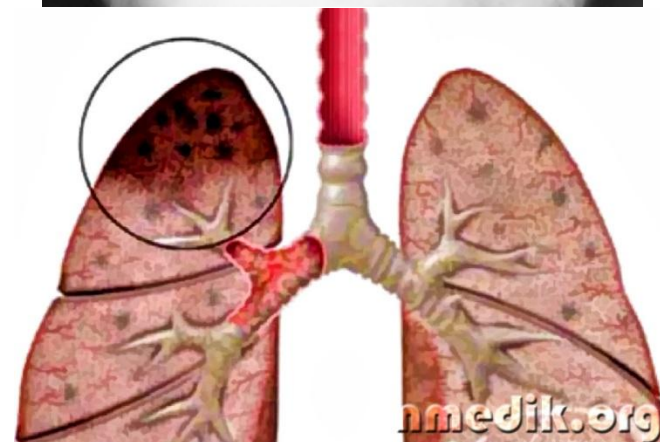
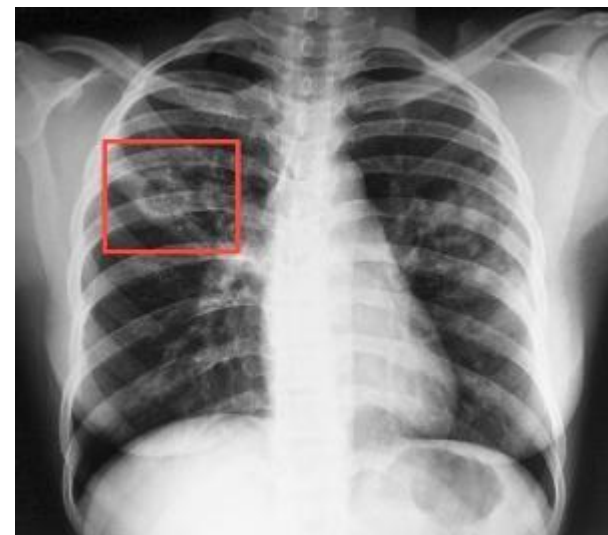
3) контактный;

4) внутриутробное заражение туберкулезом.



4. **Основные клинические формы.** Чаще всего после инфицирования микобактериями заболевание протекает в бессимптомной, скрытой форме (тубинфицированность), но примерно один из десяти случаев скрытой инфекции, в конце концов, переходит в активную форму.

- Туберкулёз поражает органы дыхательной (главным образом лёгкие и бронхи) и мочеполовой систем. При костно-суставных формах туберкулёза наиболее часто встречаются поражения позвоночника и костей таза.
- **Ввиду этого различают два основных вида туберкулёза: туберкулёз лёгких и внелёгочный туберкулёз.**



Лабораторная диагностика туберкулеза

1. Исследуемый материал – мокрота.

Мокроту лучше собирать утром. Предварительно больной должен прополоскать рот, чтобы в мокроте было меньше слюны. При малом количестве мокроты ее собирают в течение суток. При отсутствии мокроты следует вызвать ее появление раздражающими ингаляциями аэрозоля гипертонического раствора поваренной соли с содой. Исследуют также промывные воды бронхов, получаемые после введения через трахею 10–12 мл теплого изотонического раствора хлорида натрия.



Бактериоскопия

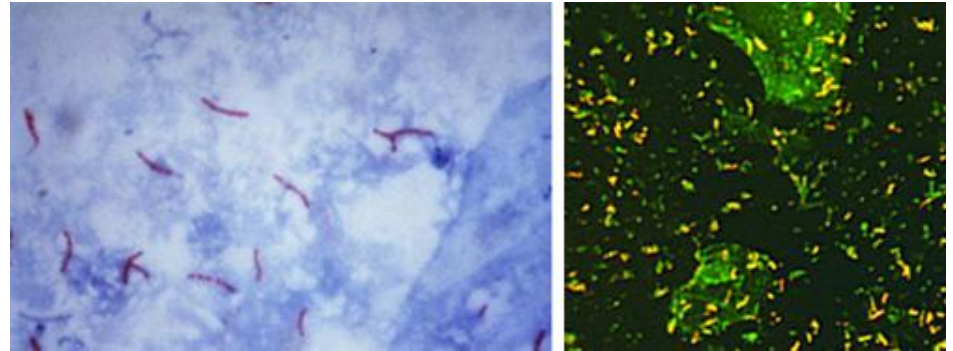
по методу Циля-Нельсена является основным методом выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУМ).

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.



Бактериоскопия мазок мокроты в люминесцентном микроскопе

- микобактерии светятся золотисто-желтым цветом на темном фоне. Количество КУМ, обнаруживаемых при микроскопическом исследовании, является очень важным информационным показателем, так как характеризует степень эпидемической опасности больного и тяжесть заболевания.



- Микроскопическое исследование должно быть не только качественным, но обязательно и количественным. При использовании объектива 90х-100х и окуляра микроскопии мазка мокроты 7х— 10х(общее увеличение — 630х— 1000х) принята следующая градация результатов световой иммерсионной микроскопии по методу Циля-Нельсена, представленная в таблице:

Таблица 5.1. Градация результатов микроскопического исследования при окраске по методу Циля-Нельсена

Результат исследования	Необходимое для просмотра число полей зрения	Интерпретация результата исследования
КУМ не обнаружены	300	Отрицательный
1-9 КУМ в 100 полях зрения	100	Положительный
10-99 КУМ в 100 полях зрения	100	Положительный (+)
1—10 КУМ в 1 поле зрения	50	Положительный (++)
Более 10 КУМ в 1 поле зрения	20	Положительный (+++)

Бактериологический метод

Мокрота (промывание водой, лаваж)
Гомогенизация и обработка 10% Na_3PO_4 в течении 18-24 ч
или NaOH в течении 10 мин



Посев на среду Левенштейна-Иенсана и Финна (от 3 нед. до 3 мес. при 37°C)

Интенсивность роста МБТ определяют по трехбалльной системе:

«+» 1 — 20 колоний (скудное бактериовыделение);

«++» 21—100 колоний (умеренное бактериовыделение);

«+++» более 100 колоний (обильное бактериовыделение).

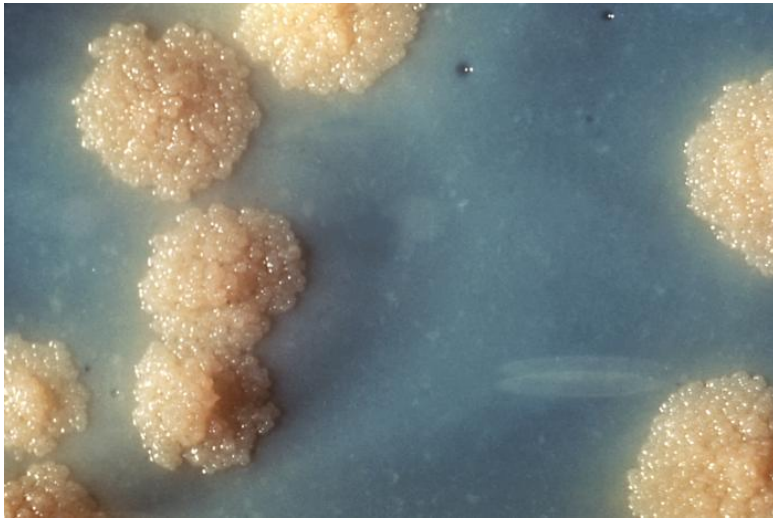
Культуральные свойства: Вирулентные культуры МБТ обычно растут на плотных

питательных средах в виде R-колоний (от англ. rough — грубый, шершавый) различной величины и вида, имеют желтоватый или слегка кремовый оттенок (цвет слоновой кости), шероховатую поверхность, напоминающую манную крупу или цветную капусту.

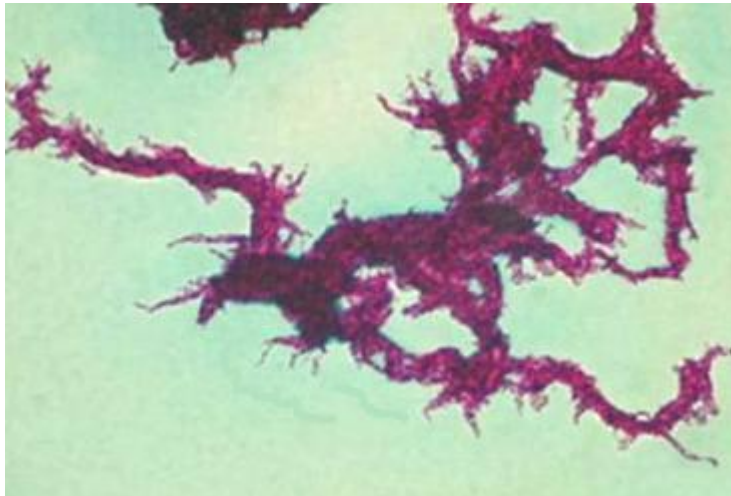
Лекарственную устойчивость МБТ определяют методом абсолютных концентраций

на плотной яичной питательной среде Левенштейна— Йенсена, основанной на добавлении определенных стандартных концентраций

противотуберкулезных



Колонии *M. tuberculosis*



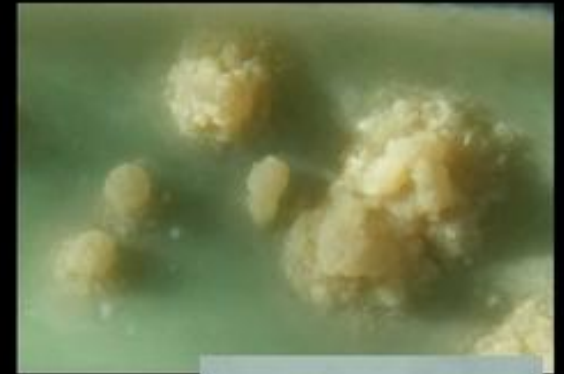
Проявление корд-фактора (рост колонии МБТ, напоминающий мицелий грибницы)



Среда Левенштейна — Йенсена

©

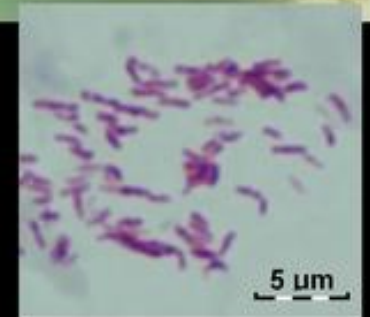
www.microbiologyinpictures.com



Mycobacterium tuberculosis
Löwenstein-Jensen medium
cultivation 6 weeks, 37°C



Ziehl-Neelsen stain
(acid-fast rods)



Han et al.

Критические концентрации противотуберкулезных препаратов при определении лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена составляют для:

- изониазида 1 мкг/мл;
- рифампицина — 40 мкг/мл;
- пиразинамида — 200 мкг/мл;
- этамбутола — 2 мкг/мл;
- стрептомицина — 10 мкг/мл;
- канамицина — 30 мкг/мл;
- капреомицина — 30 мкг/мл;
- протионамида (этионамида) — 30 мкг/мл;
- циклосерина — 30 мкг/мл;
- ПАСК — 1 мкг/мл;
- офлоксацина — 2 мкг/мл.

В большинстве случаев метод абсолютных концентраций применяется для непрямого определения лекарственной устойчивости. Вначале производят посеvy мокроты на твердые питательные среды и получают чистую культуру МБТ, которую пересевают на питательные среды, содержащие определенные концентрации противотуберкулезных препаратов.

Аллергодиагностика

Реакция Манту (туберкулиновая проба) - представляет собой внутрикожную или накожную пробу, направленную на выявление наличия специфического иммунного ответа на введение туберкулина. Наличие выраженной кожной реакции свидетельствует о наличии напряжённого иммунитета, то есть, что организм активно взаимодействует с возбудителем. Реакция Манту — это своего рода иммунологический тест, который показывает, есть ли в организме туберкулёзная инфекция.

Диагностический препарат:
туберкулин

(экстракты микобактерий *M. tuberculosis*, *M. bovis* или *M. avium*);



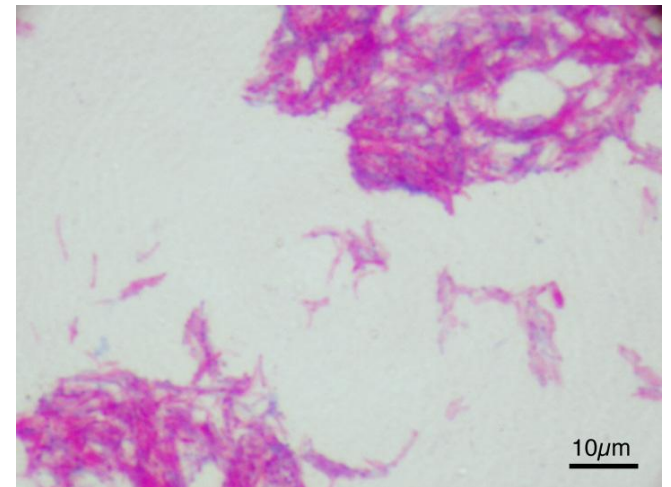
Оценка результатов:

- Проверка результата пробы производится на повторном визите не ранее чем через 48 часов, лучше всего на третий день, самое позднее — через одну неделю после аппликации, что, несомненно, является неудобством в сравнении с альтернативными квантифероновым тестом и тестом Т-СПОТ.ТБ (T-SPOT®.TB). Индурация отмечается, измеряется, документируется и оценивается.
- Индурация < 5 мм в основном не имеет значения;
- **10 мм** указывает на возможное заражение туберкулёзом в группах риска и при контакте с пациентами с открытыми формами туберкулёза
- при индурации **15 мм** или язвенной реакции кожи (образование гнойников) очень вероятно заражение туберкулёзом.

Туберкулиновая проба Манту не даёт сведений о распространении, инфекционности или локализации заболевания, однако показывает реакцию организма — антиген-антитело на возбудителя туберкулёза. Позитивная реакция кожи показывает, что исследуемый пациент имел контакт с возбудителями туберкулёза. **Это, однако, не означает, что данный пациент болен туберкулёзом.**

Профилактика вакциной БЦЖ

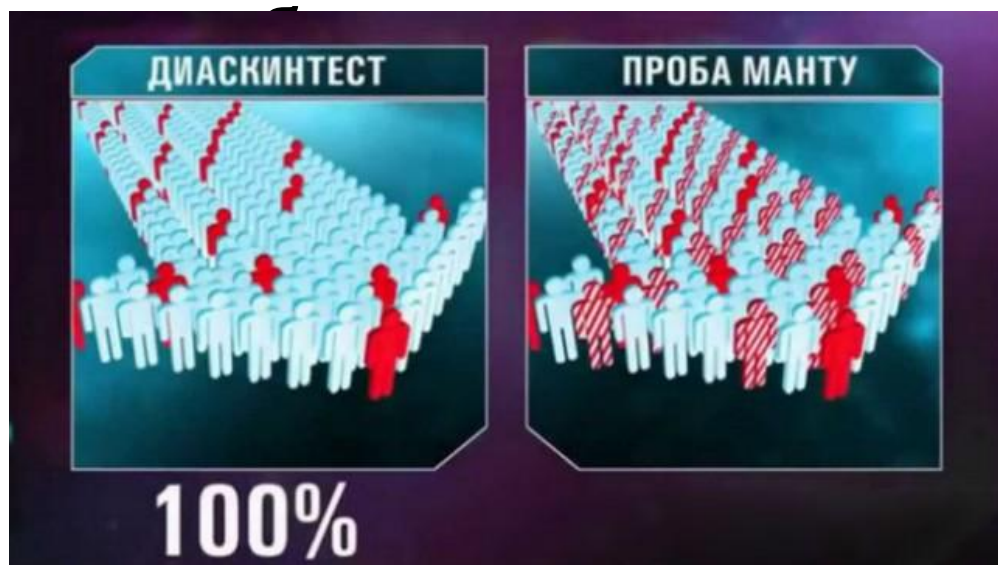
вакцина против туберкулёза, приготовленная из штамма ослабленной живой коровьей туберкулёзной палочки, которая практически утратила вирулентность для человека, будучи специально выращенной в искусственной среде.



Бацилла Кальметта—
Герена при
микроскопическом
увеличении (БЦЖ,
Японский субштамм).
Окрашивание по методу
Циля — Нельсена.

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



Молекулярная диагностика

ПЦР используются для выявления, видовой дифференциации и определении лекарственной устойчивости микобактерий туберкулезного комплекса.

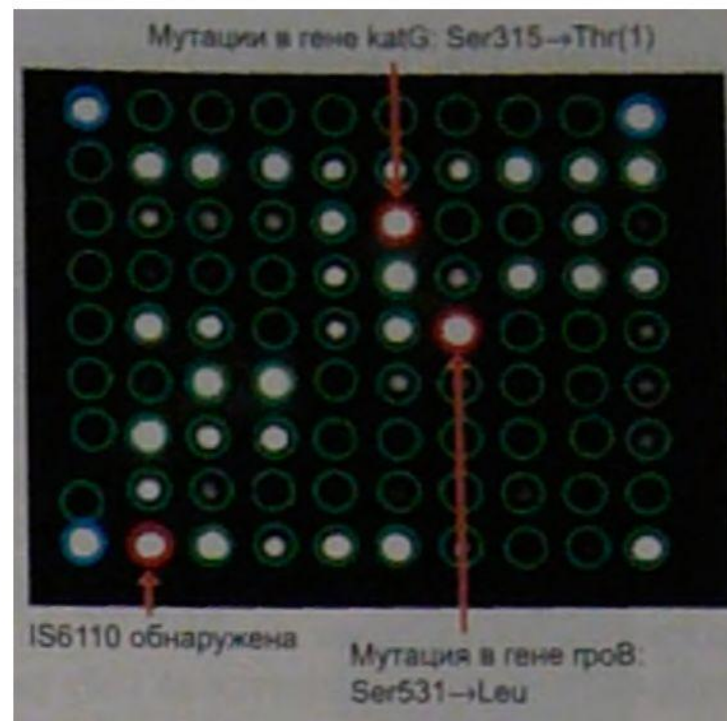
- Возбудители туберкулеза могут быть обнаружены в различных биоматериалах, природа которых определяет выбор наборов реагентов для экстракции ДНК. Ключевой принцип выбора биоматериала для диагностики туберкулеза методом ПЦР: необходимо выбирать биоматериал, соответствующий клинической форме туберкулезной инфекции.
- Например, для диагностики туберкулеза мочеполовой системы нужно исследовать мочу или менструальную кровь, рекомендуется также исследовать биоптаты из подозрительного очага.

Молекулярная гибридизация

Высокочувствительный метод выявления специфической последовательности нуклеотидов.

А) Биочипы предназначены для определения точного типа мутации, приводящей к устойчивости возбудителя туберкулеза к рифампицину или изониазиду.

Рис. 13-12. Определение лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду методом микробиочипов. Стрелками показана флюоресценция в точке определения специфической ДНК микобактерий туберкулёза, в точках, фиксирующих гибридизацию с ДНК-зондами для обнаружения специфических локусов мутации в генах *groV* и *katG*. Рисунок предоставлен доктором медицинских наук Л.Н. Черноусовой (Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза РАМН).



б) Гибридизация на мембранах

На мембрану иммобилизируют олигонуклеотиды. Процессы гибридизации происходят между одинаковыми цепями, если они комплементарны.

Hain-test Стрип-тест осуществляет детекцию ДНК МТБ и генетические мутации, ассоциированные с лекарственной резистентностью в мокроте с положительным мазком или культуре после экстракции ДНК и ПЦР-ампликации. Существуют следующие виды стрип-тестов:

- GenoType MTBDRplus – идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к рифампицину, иозинамиду в мокроте с положительным мазком и культуре.
- GenoType MTBDRsl - идентификация комплекса *M. tuberculosis* и его резистентности к фторхинолонам, аминогликозидам и этамбутолу.