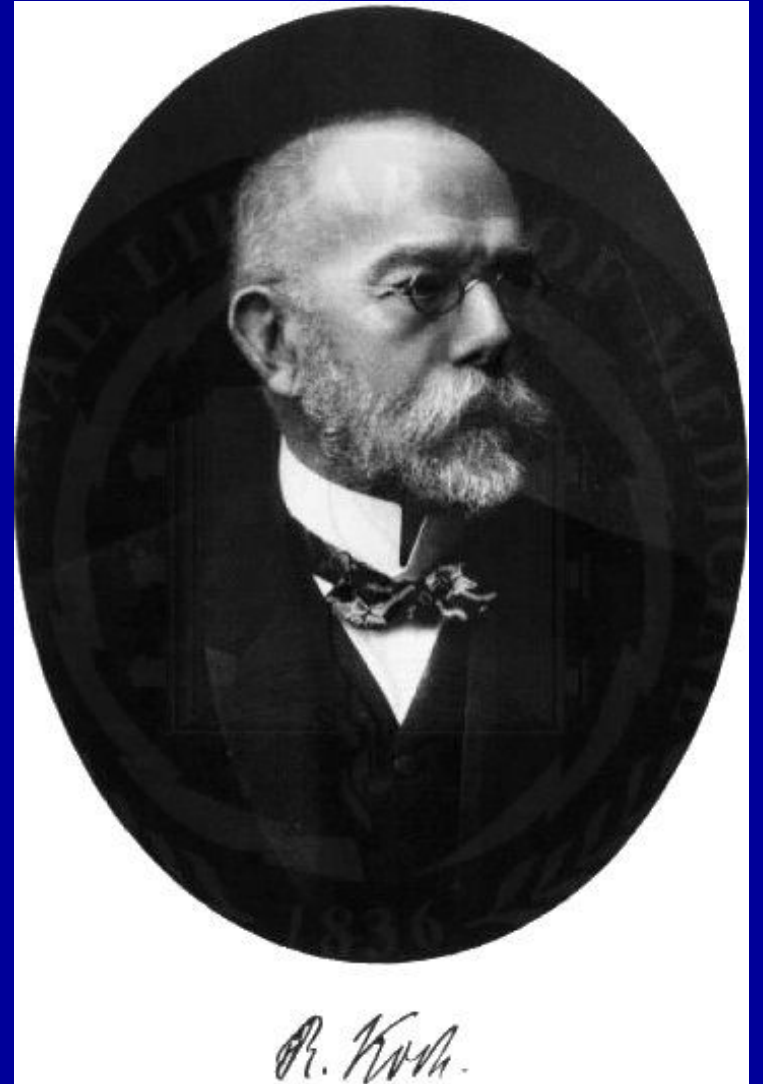


Лабораторная диагностика туберкулёза



МИКОБАКТЕРИИ

ПОРЯДОК Actinomycetales

СЕМЕЙСТВО Mycobacteriaceae

РОД Mycobacterium

(греч. *myces* – гриб, *bacteria* – палочка)

более 160 видов

ВИДЫ *M. tuberculosis*

M. bovis

M. africanum



M.tuberculosis в мазке из мокроты. Окраска по Ziehl-Neelsen .

Кислотоустойчивые микобактерии



Среда Левенштейна-Йенсена

Калий однозамещенный
фосфорнокислый
Магний сернокислый
Магний лимоннокислый
L-аспарагин
Глицерин
Малахитовый зеленый
Яичная масса
Вода дистиллированная
pH = 7,2–7,4

Среда Финн-II

Калий однозамещенный
фосфорнокислый
Магний сернокислый
Натрий лимоннокислый
Квасцы
железоаммонийные
Аммоний лимоннокислый
однозамещенный
Натрий
глутаминовокислый
однозамещенный
Глицерин
Малахитовый зеленый
Яичная масса
Вода дистиллированная
pH = 6,3 - 6,8

Среда Школьниковой

Калий однозамещенный фосфорнокислый

Натрий двузамещенный фосфорнокислый

Магний сернокислый

Натрий лимоннокислый

Лимоннокислое аммиачное железо

L-аспарагин

Глицерин

Вода дистиллированная

Микобактерии на среде Левенштейна-Йенсена



До посева

После посева

Микобактерии на среде Левенштейна-Йенсена



ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

МИКРОКАПСУЛА (АДГЕЗИВНЫЙ, АНТИФАГОЦИТАРНЫЙ ФАКТОР)

ТУБЕРКУЛОПРОТЕИНЫ (ИНИЦИАЦИЯ ГЗТ)

ЛИПИДЫ:

- **КОРД-ФАКТОР** (ТРЕГАЛОЗА-6,6-ДИМИКОЛАТ) (ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ, ПОВРЕЖДЕНИЕ МЕМБРАН МИТОХОНДРИЙ, ТОРМОЖЕНИЕ МИГРАЦИИ ФАГОЦИТОВ)

- **СУЛЬФАТИДЫ (СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ ГЛИКОЛИПИДЫ)**

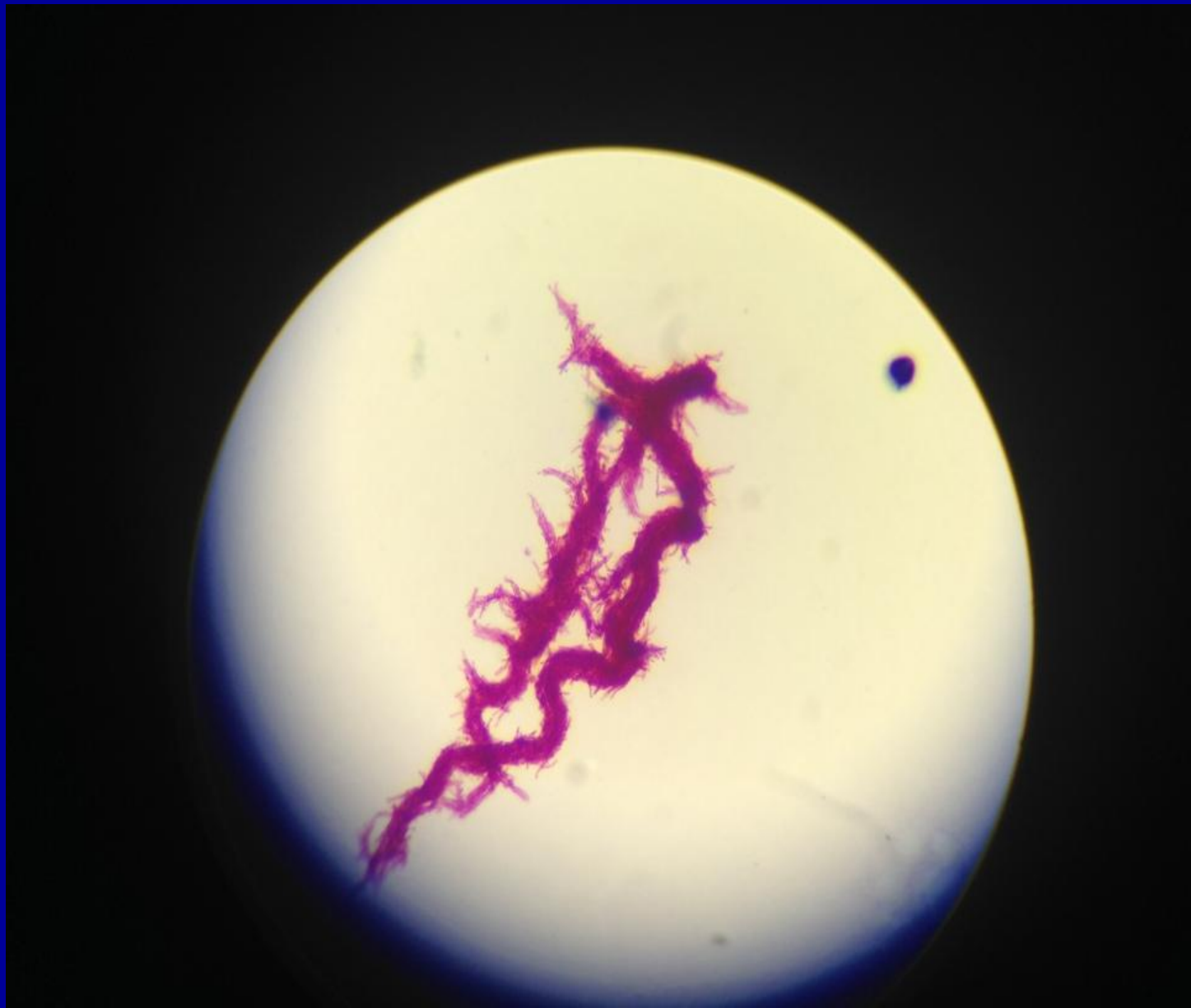
- **ВЖК:** миколовая, фтионовая, туберкулостеариновая

- **ВОСКА:** Д, фтион, миколь

(УСИЛЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КОРД-ФАКТОРА, СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФАГОЦИТОВ И ФАГОСОМОЛИЗОСОМАЛЬНОГО СЛИЯНИЯ, АЛЛЕРГИЗАЦИЯ)

ФЕРМЕНТЫ АГРЕССИИ: ФИБРИНОЛИЗИН, ЛЕЦИТИНАЗА, НЕЙРАМИНИДАЗА, ГИАЛУРОНИДАЗА И ДР.

Корд-фактор.



РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

УЛИЧНАЯ ПЫЛЬ - 10 ДНЕЙ

КНИГИ – 3 МЕСЯЦА

ВОДА – 5 МЕСЯЦЕВ

СОЛНЕЧНЫЙ СВЕТ – 90 МИНУТ

УЛЬТРАФИОЛЕТ – 2-3 МИНУТЫ

ВЛАЖНАЯ МОКРОТА – 100 °С – 5 МИНУТ

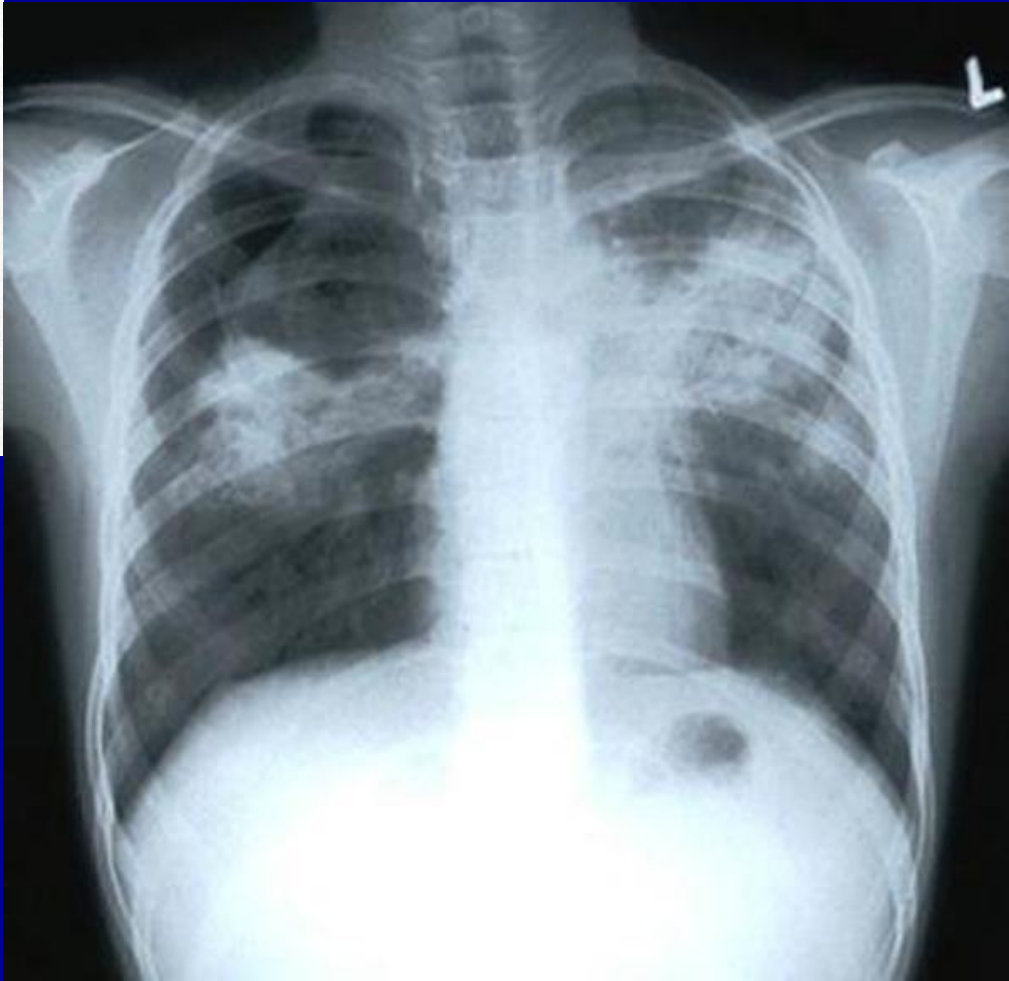
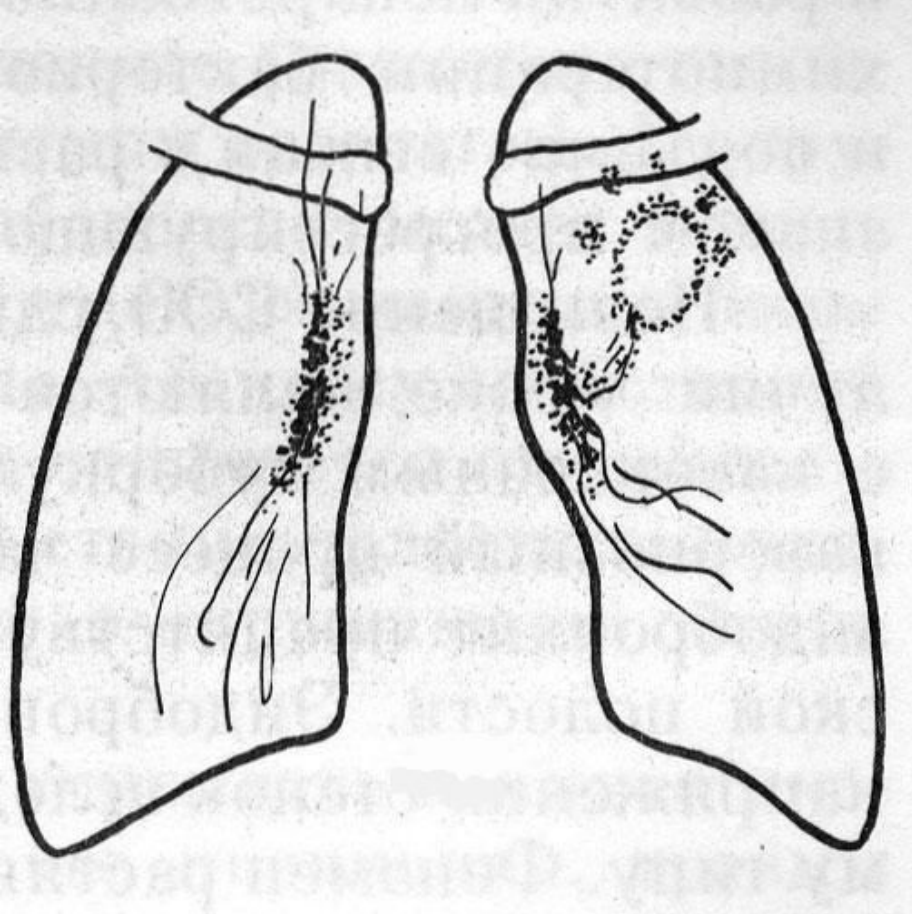
СУХАЯ МОКРОТА – 100 °С – 45 МИНУТ

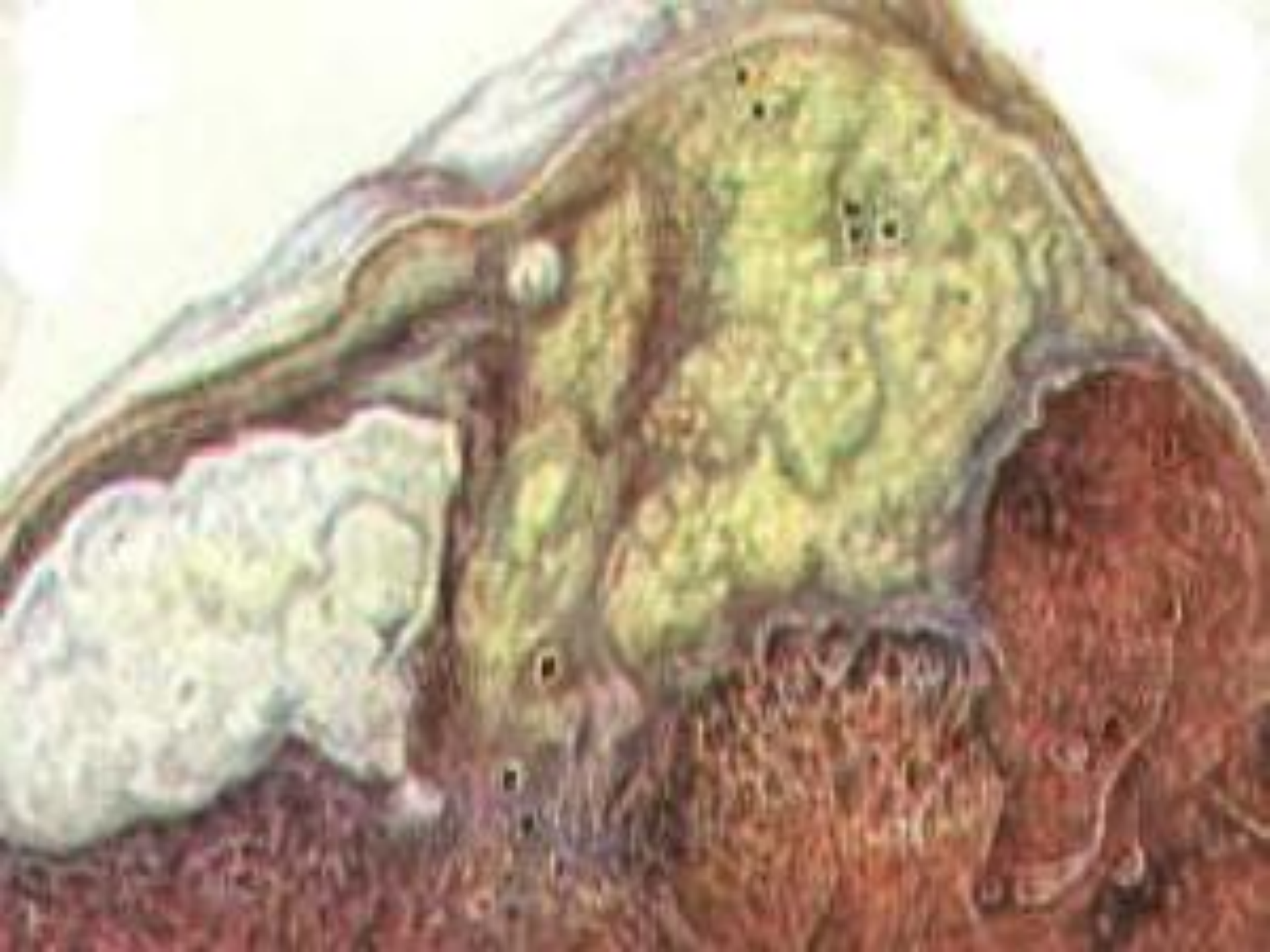
МОЛОКО – 60 °С – 20 МИНУТ

ДЕЗИНФЕКТАНТЫ – 3-6 ЧАСОВ

СПИРТО-, ЩЕЛОЧЕ-,

КИСЛОТОУСТОЙЧИВОСТЬ





ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Препараты основного ряда

Стрептомицин

Изониазид

Рифампицин

Этамбутол

Препараты резервного ряда

Канамицин

Протионамид

Циклосерин

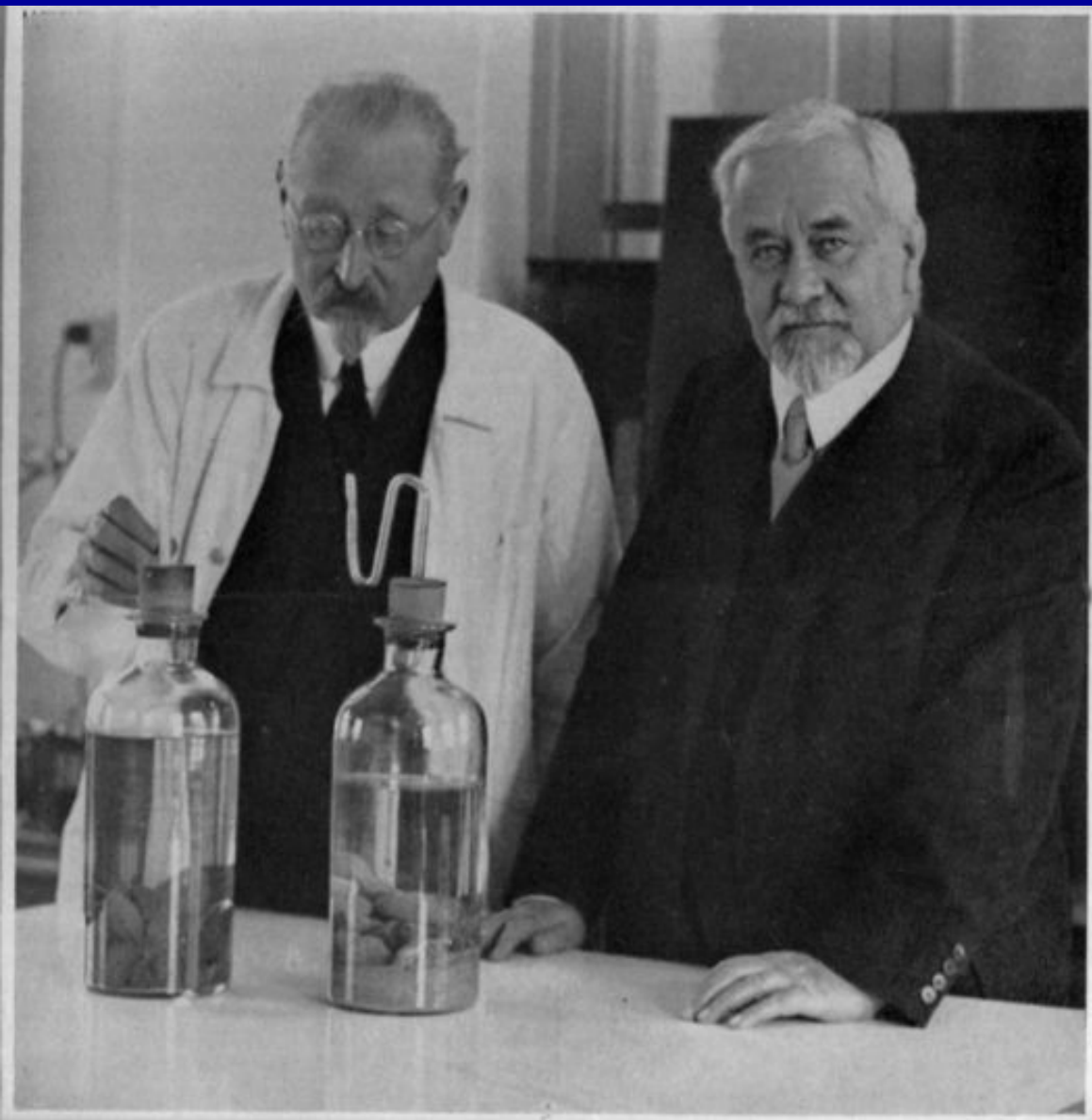
Капреомицин

Офлоксацин

ПАСК

Пиразинамид

Специфическая профилактика



Camille Guerin

Albert Calmette

Вакцина BCG–
живая
аттенуированная
из
штамма *M. bovis*,
1921 г.

С 1925 г. – в СССР
Вакцинация –
3-7 день жизни
Ревакцинация –
7, 14 лет
(по результатам
пробы Манту)

**МЕТОДЫ
ДИАГНОСТИКИ
ТУБЕРКУЛЕЗА**

Деконтаминация материала.

Трехзамещенный фосфорнокислый натрий (Na_3PO_4) нейтрализация - кислота соляная (HCl) концентрированная, промывка дистиллированной водой.

ИЛИ

Метод с использованием **N**-ацетил-**L**-цистеина и гидроокиси натрия (**NALC-NaOH**)

БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

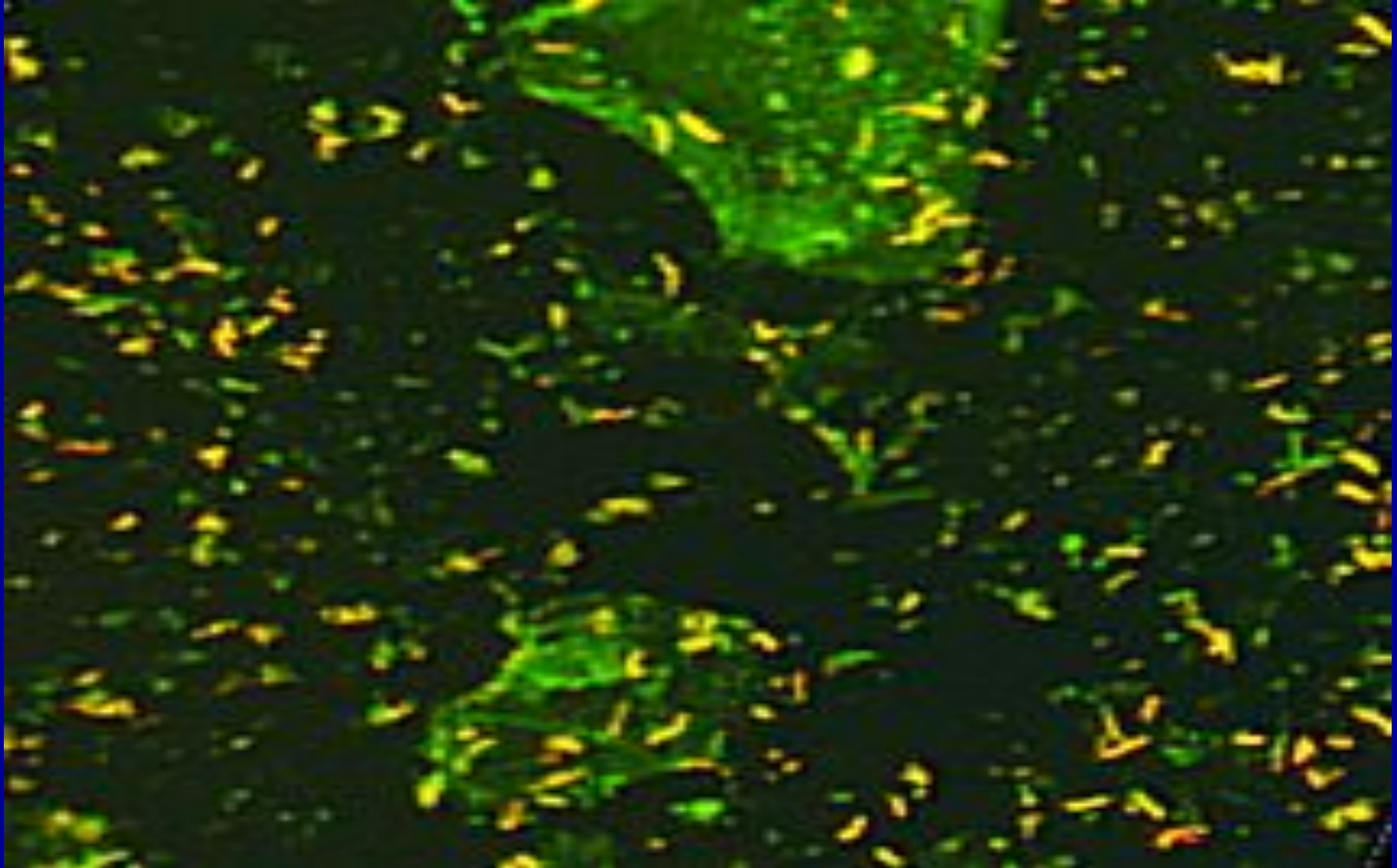
Окраска по методу Циля - Нильсена

- карболовый фуксин Циля
- подогреть 2-3 раза
- дать остыть, промыть
- серная кислота 5%
- промыть водой
- метиленовая синька 3-5 мин.

Люминесцентная микроскопия

- аурамин-родамин

Микобактерии туберкулеза в препарате мокроты (люминесцентная микрофотограмма)



БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

✓ Выделение чистой культуры
(среды Левенштейна-Йенсена, Финн-II и др)

✓ Идентификация

- морфология
- культуральные свойства
- биохимические свойства

✓ Определение чувствительности к противотуберкулезным препаратам

Среда Сотона

<u>Ингредиенты</u>	<u>грамм/литр</u>
Железа аммонийного цитрат	0,0167
L-Аспарагин	1,330
Лимонная кислота	0,660
Магния сульфат	0,166
Калия гидрофосфат	0,287
Натрия дигидрофосфат	0,633
Натрия хлорид	0,400
Твин-80	0,833
Конечное значение pH (при 25°C)	7,2 ± 0,2

Дифференциация микобактерий туберкулезного комплекса

Свойства микобактерий	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis-BCG</i>
Восстановление нитратов	+	–	–
Ниациновый тест	+	–	–
Потребность в кислороде	аэрофил	микро-аэрофил	аэрофил
Рост на среде Левенштейна–Йенсена	пышный	стелющийся	пышный
Чувствительность к пиразинамиду	S	R	R
Чувствительность к ТСН (гидразиду тиафен-2-карбоксилловой кислоты)	R	V	S
Чувствительность к циклосерину	S	S	R

АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ

ТУБЕРКУЛИН

1890 - получен Робертом Кохом

1908 – предложена внутрикожная проба

Шарлем Манту

Очищенный туберкулин представляет собой очищенную смесь фильтратов убитых нагреванием культур микобактерий туберкулеза человеческого и бычьего видов.

Активное вещество препарата — аллерген туберкулопротеин — вызывает при постановке внутрикожной туберкулиновой пробы у инфицированных или вакцинированных лиц специфическую реакцию гиперчувствительности замедленного типа в виде местной реакции — гиперемии и инфильтрата (папулы).

Препарат предназначен для массовой туберкулинодиагностики с целью:

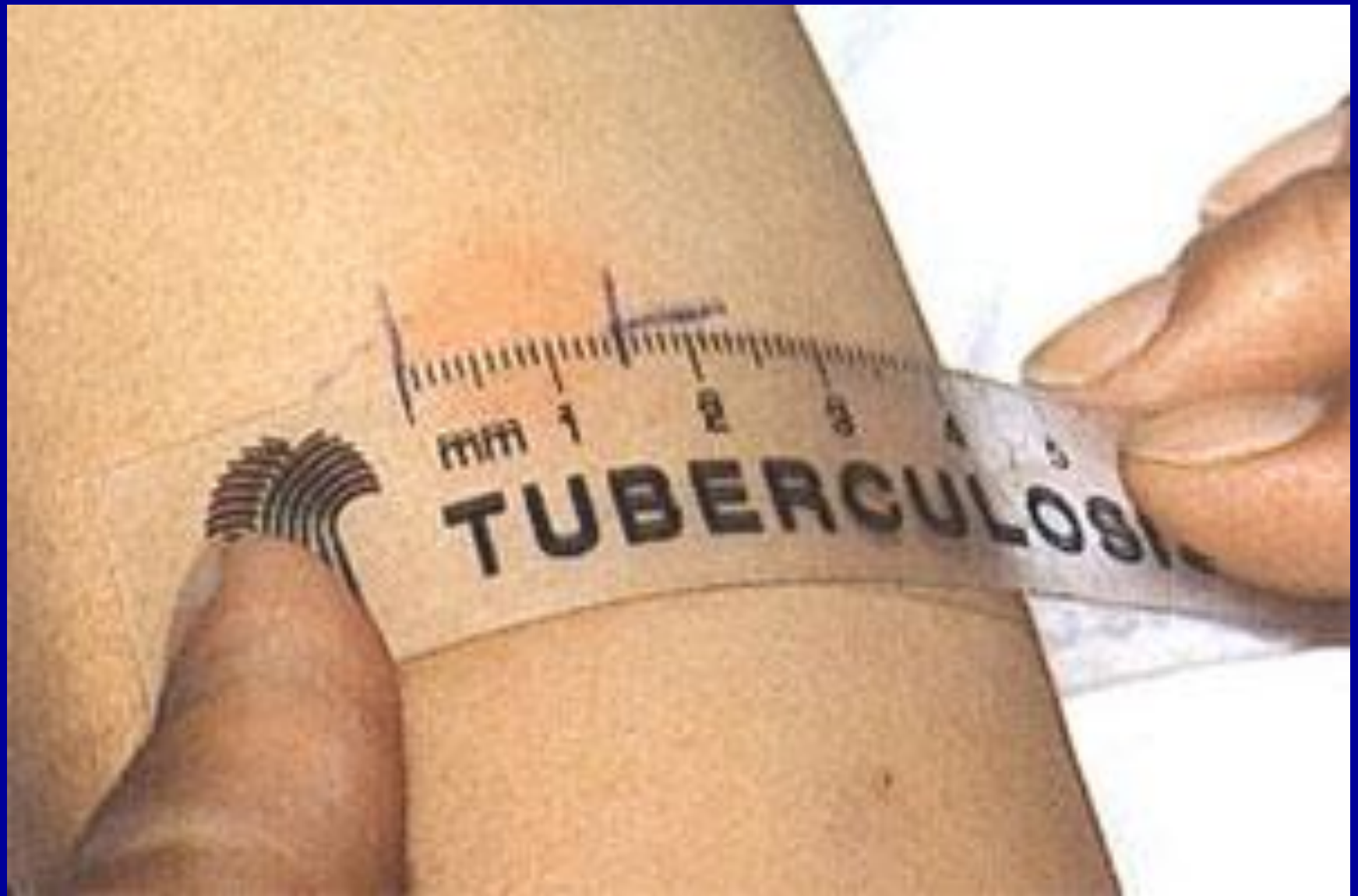
- отбора контингента для ревакцинации БЦЖ, а также перед первичной вакцинацией детей в возрасте 2 месяца и более;
- диагностики туберкулеза, в том числе для раннего выявления начальных и локальных форм туберкулеза у детей и подростков;
- определения инфицирования микобактериями туберкулеза.

Реакцию оценивают по следующим критериям:

- **отрицательная** — отсутствие инфильтрата и гиперемии;
- **сомнительная** — инфильтрат диаметром 2—4 мм или только гиперемия любого размера;
- **положительная** — наличие инфильтрата диаметром 5 мм и более;
- **гиперергическая (резко положительная)** — инфильтрат диаметром 17 мм и более у детей и подростков и 21 мм и более у взрослых, а также при появлении везикулы, лимфангита или регионарного лимфаденита независимо от размера инфильтрата.



ТУБЕРКУЛИНОВАЯ ПРОБА МАНТУ





ДИАСКИНТЕСТ

Аллерген туберкулезный для внутрикожного введения.

Представляет собой рекомбинантный белок, который продуцируют генетически модифицированные культуры *Escherichia coli* BL21(DE3)/**pCFP-ESAT**, - содержит два антигена, которые присутствуют в вирулентных штаммах **Mycobacterium tuberculosis** и отсутствуют в вакцинном штамме БЦЖ.

Показания

Предназначен для постановки внутрикожной пробы во всех возрастных группах с целью:

- диагностики туберкулеза, оценки активности процесса и выявления лиц с высоким риском развития активного туберкулеза;
- дифференциальной диагностики туберкулеза;
- дифференциальной диагностики поствакцинальной и инфекционной аллергии (гиперчувствительности замедленного типа);
- оценки эффективности противотуберкулезного лечения в комплексе с другими методами.

В связи с тем, что препарат не вызывает реакцию гиперчувствительности замедленного типа, связанную с вакцинацией БЦЖ, проба с препаратом Диаскинтест не может быть использована вместо туберкулинового теста для отбора лиц на первичную вакцинацию и ревакцинацию БЦЖ.

Учет результатов

Ответная реакция на пробу считается:

отрицательной - при полном отсутствии инфильтрата и гиперемии или при наличии "уколочной реакции" до 2 мм;

сомнительной - при наличии гиперемии без инфильтрата;

положительной - при наличии инфильтрата (папулы) любого размера.

Положительные реакции на Диаскинтест условно различаются по степени выраженности:

слабо выраженная реакция - при наличии инфильтрата размером до 5 мм;

умеренно выраженная реакция - при размере инфильтрата 5-9 мм;

выраженная реакция - при размере инфильтрата 10-14 мм;

гиперергическая реакция - при размере инфильтрата 15 мм и более, при везикуло-некротических изменениях и (или) лимфангите, лимфадените независимо от размера инфильтрата.

Лица с сомнительной и положительной реакцией на Диаскинтест обследуются на туберкулез.

Реакция на Диаскинтест, как правило, отсутствует:

— у лиц, не инфицированных *Mycobacterium tuberculosis*;

— у лиц, ранее инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* с неактивной туберкулезной инфекцией;

— у больных туберкулезом в период завершения инволюции туберкулезных изменений при отсутствии клинических, рентгено-томографических, инструментальных и лабораторных признаков активности процесса;

— у лиц, излечившихся от туберкулеза.

Проба с препаратом Диаскинтест может быть отрицательной у больных туберкулезом с выраженными иммунопатологическими нарушениями.

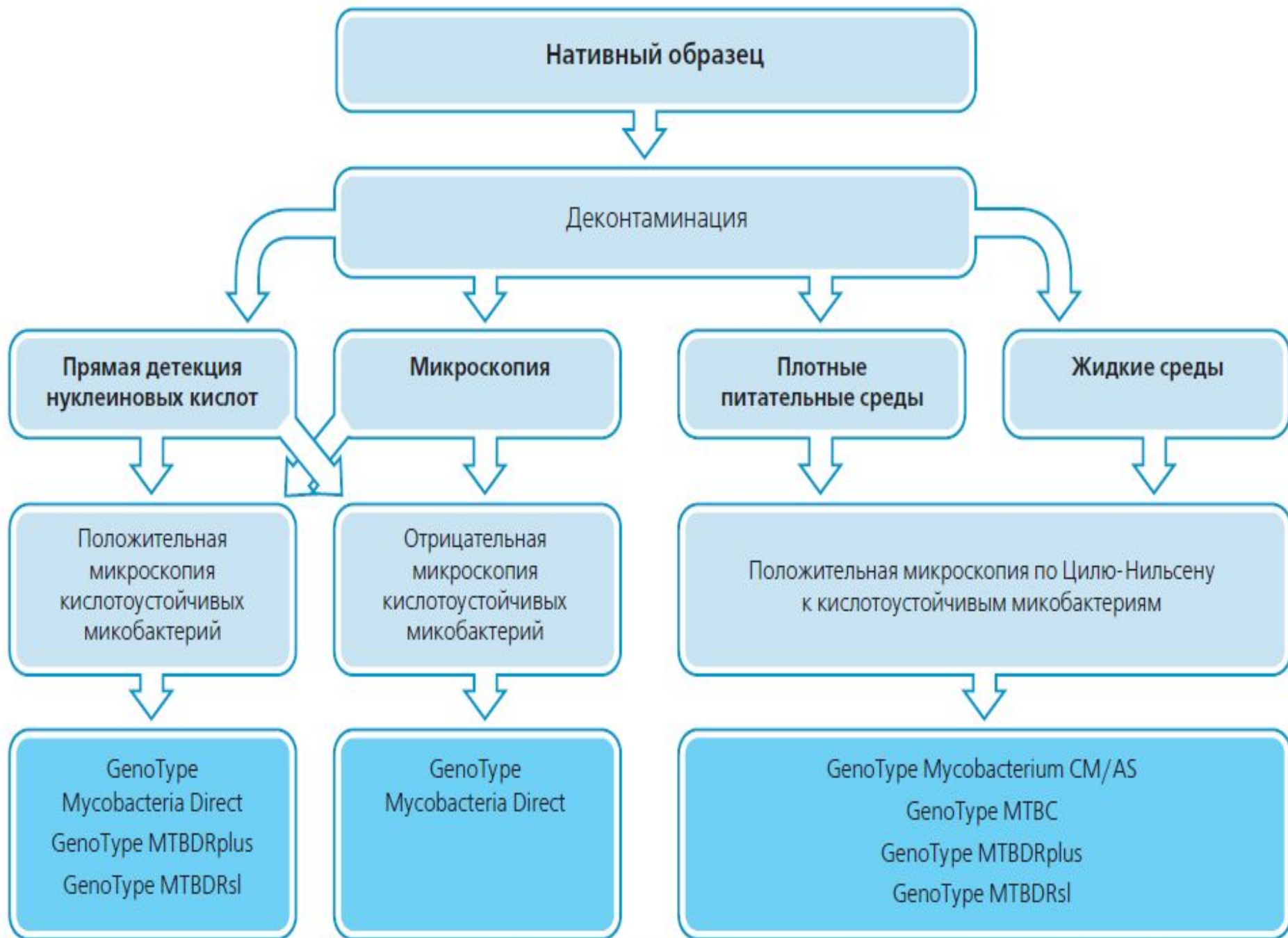
БИОЛОГИЧЕСКИЙ

морские свинки – *M. tuberculosis*
кролики – *M. bovis*

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ

реакция агглютинации, РСК, ИФА,
РНГА, реакция преципитации в
геле

МЕСТО ГЕНОДИАГНОСТИКИ В ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ



ПЦР позволяет:

- . Дифференцировать виды внутри комплекса *M.tuberculosis***
- . Определить устойчивость комплекса *M.tuberculosis* к антибиотикам**
- . Идентифицировать виды нетуберкулезных микобактерий**

СХЕМА УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

ДЕКОНТАМИНАЦИЯ МАТЕРИАЛА



БАКТЕРИОСКОПИЯ , ПОСЕВ НА ЖИДКУЮ И 2 ПЛОТНЫЕ СРЕДЫ



РОСТ НА СРЕДАХ



БАКТЕРИОСКОПИЯ (+/- КОРД-ФАКТОР)



ИММУНОХРОМОТОГРАФИЯ (+/- ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ К МТВС)



ПЦР

Автоматизированная система ВАСТЕС MGIT 960



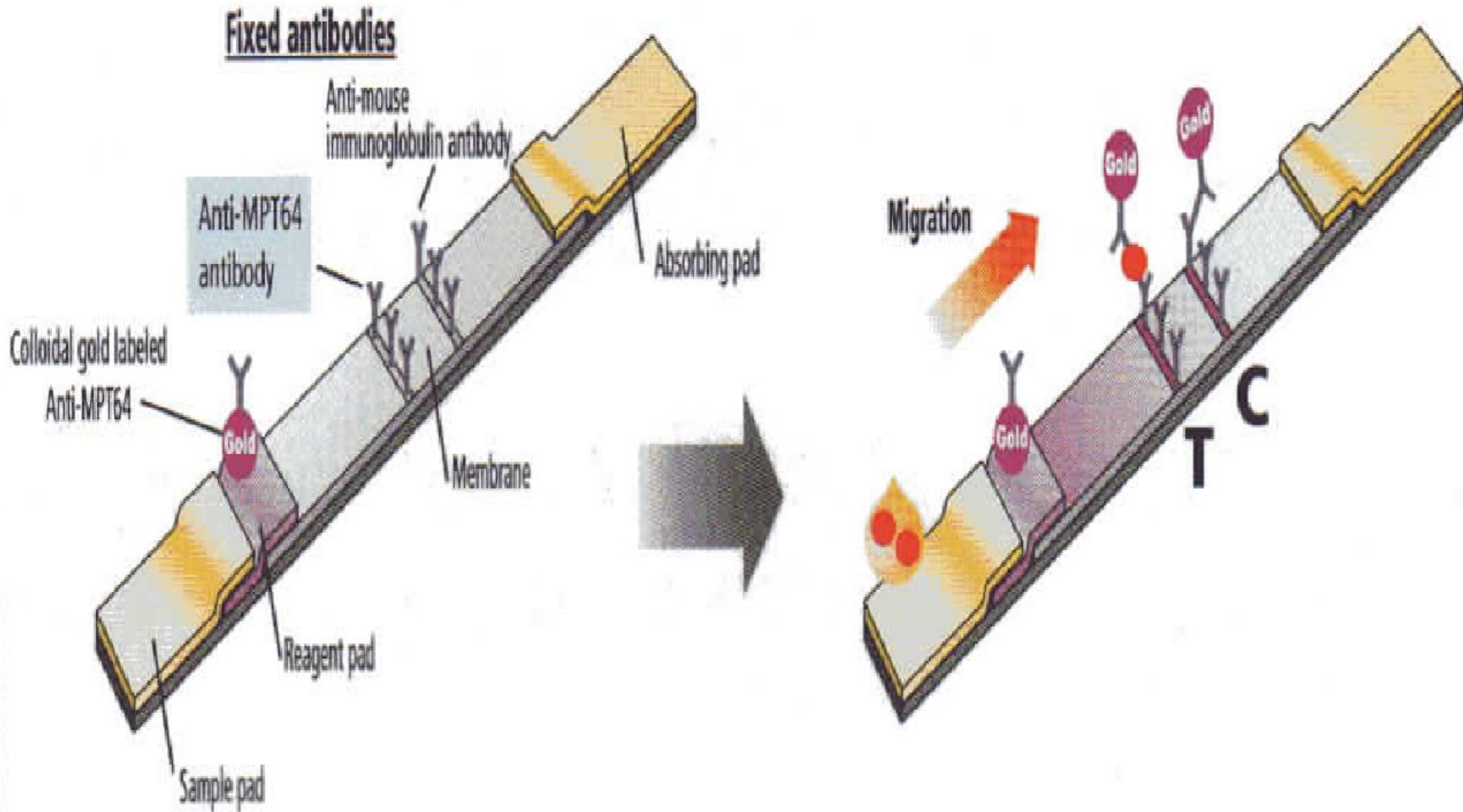
Флуоресценция пробирок MGIT

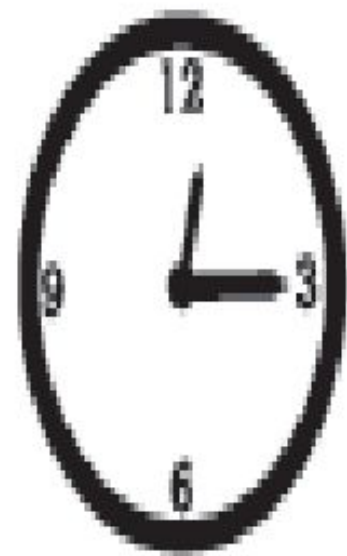
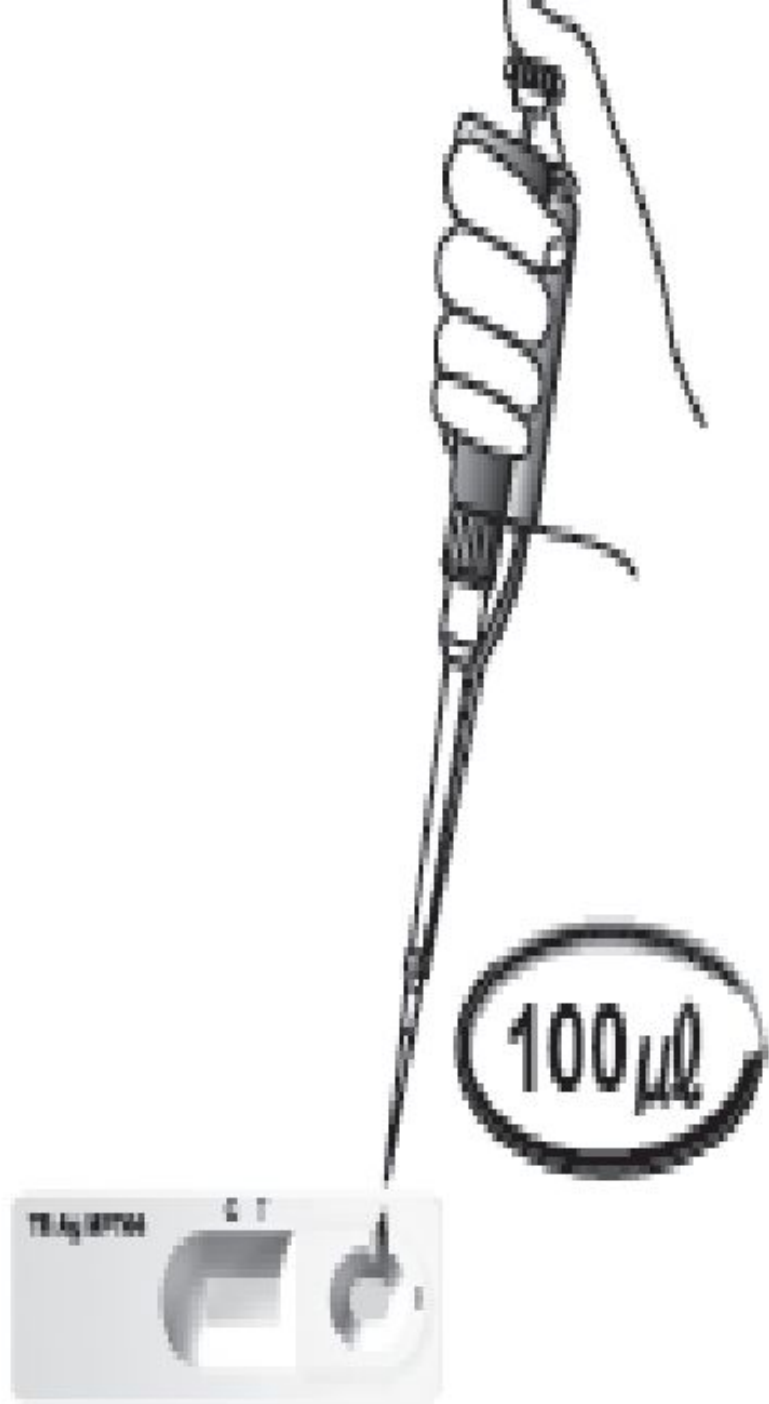
Для определения роста микобактерий в системе MB/VacT используется технология колориметрического CO₂-детектирования. Уникальные MB/VacT-флаконы со штрих-кодом содержат придонный сенсор, изменение цвета которого наблюдается при закислении среды вследствие микробного метаболизма, что регистрируется компьютером, который анализирует и интерпретирует данные.



Сканирование штрих-кода

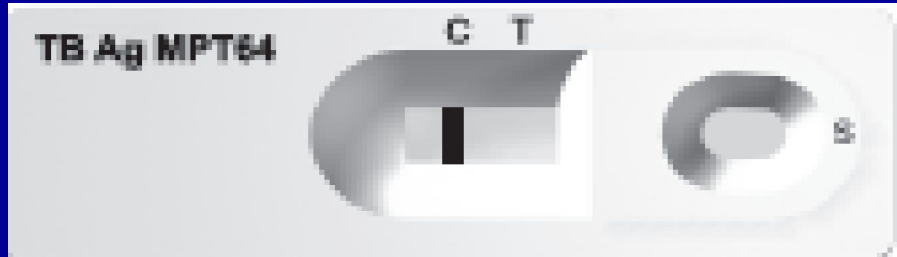
**Одностадийный иммунохроматографический тест для
качественного определения
антигена MPT64 *Mycobacterium tuberculosis*
после культивирования на питательных средах.**





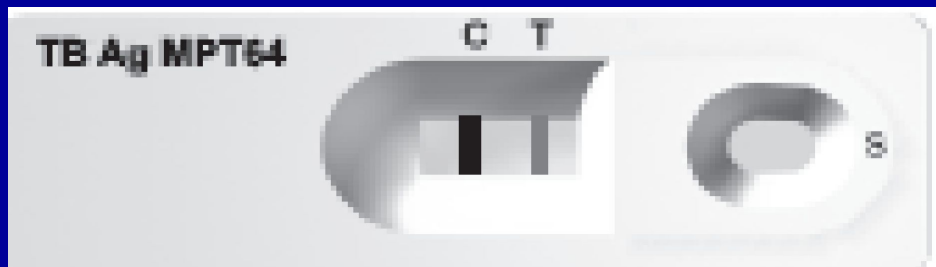
Отрицательный результат

Присутствие только одной контрольной полосы (С) указывает на отрицательный результат.

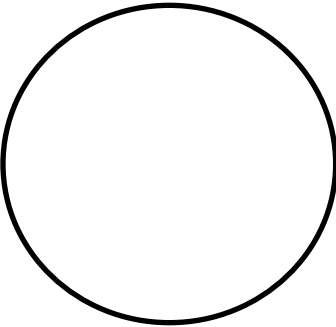


Положительный результат

Присутствие двух окрашенных полос (Т и С) в окне результатов указывает на положительный результат, независимо от того, какая полоса появилась первой.



Протокол. Лабораторная диагностика туберкулёза

Исследуемый материал	Что сделать	Результат
Мазок-препарат из мокроты больного открытой формой туберкулёза, окраска по Цилю-Нильсену	Промикроскопировать, зарисовать	
Рост культуры микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена	Описать морфологию колоний, зарисовать	