

Лабораторная диагностика туберкулёза

МИКОБАКТЕРИИ

ПОРЯДОК	Actinomycetales
СЕМЕЙСТВО	Mycobacteriaceae
РОД	Mycobacterium
ВИДЫ	M. tuberculosis M. bovis M. avium M. africanum M. leprae



МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ

АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ

АЛЛЕРГИЧЕСКИЙ

внутрикожное введение
0,1 мл (2 ТЕ)
туберкулина
учет через 48 – 72 ч

СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ

реакция агглютинации,
РСК, ИФА
реакция преципитации

БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

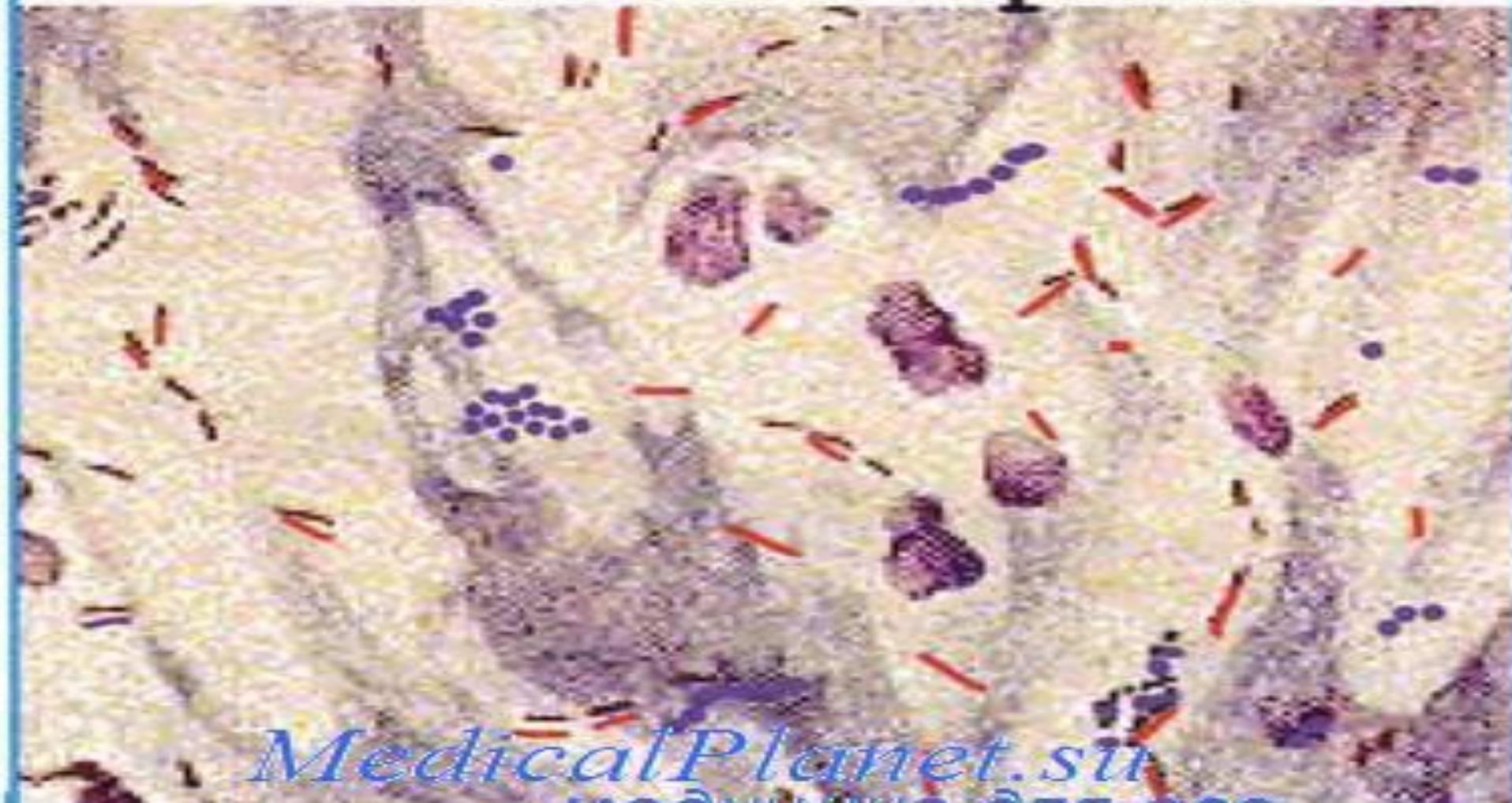
- окраска по Цилю-Нильсену
- люминесцентная микроскопия

Окраска по методу Циля - Нильсена

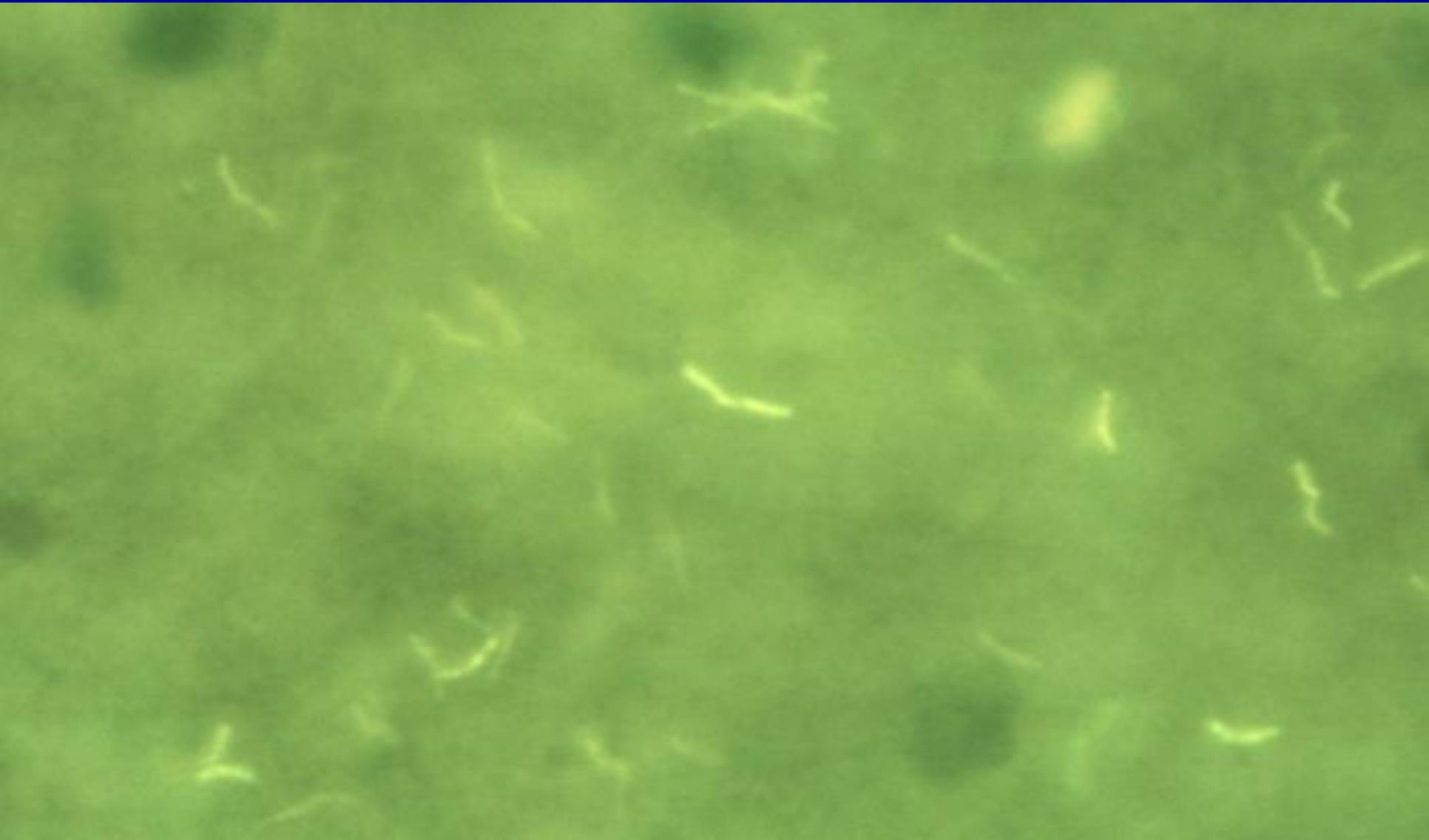
- карболовый фуксин Циля
- подогреть 2-3 раза
- дать остыть, промыть
- серная кислота 5%
- промыть водой
- метиленовая синька 3-5 мин.

M.tuberculosis в мазке из мокроты. Окраска по Цилю-Нильсену.

Кислотоустойчивые микобактерии



Микобактерии туберкулеза в препарате мокроты (люминесцентная микрофотограмма)



НЕДОСТАТКИ БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКОГО МЕТОДА

Чтобы обнаружить микобактерии туберкулеза методами микроскопии, в 1 мл исследуемого материала должно содержаться не менее 10000 микробных клеток.

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕ ИСКЛЮЧАЕТ ДИАГНОЗ ТУБЕРКУЛЕЗА.

Не позволяет дифференцировать возбудителей туберкулеза от нетуберкулезных микобактерий - возбудителей микобактериозов.

Кислотоустойчивость окраски можно наблюдать у:
Rhodococcus, Nocardia, Legionella, а также цисты Cryptosporidium и Isospora.

**НА ОСНОВАНИИ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
ВОЗМОЖНО СДЕЛАТЬ ЗАКЛЮЧЕНИЕ ТОЛЬКО
О НАЛИЧИИ ИЛИ ОТСУТСТВИИ В ПРЕПАРАТЕ
КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ.**

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

*(В отличие от бактериоскопического позволяет на **30 - 50%** увеличить число выявляемых бактериовыделителей)*

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

Идентификация

- **морфология**
- **культуральные свойства**
- **биохимические свойства**

Определение антибиотикорезистентности

Среда Левенштейна-Йенсена

Калий однозамещенный
фосфорнокислый
Магний сернокислый
Магний лимоннокислый
L-аспарагин
Глицерин
Малахитовый зеленый
Яичная масса.
Вода дистиллированная

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

Деконтаминация материала.

Трехзамещенный фосфорнокислый натрий (Na_3PO_4) – **10%**
встряхивание с бусами и **18-20** час **37° С**, нейтрализация -
кислота соляная (**HCl**) концентрированная, промывка
дистиллированной водой.

Посев по **0,5 - 0,6** мл в **2** пробирки с разными плотными
средами;

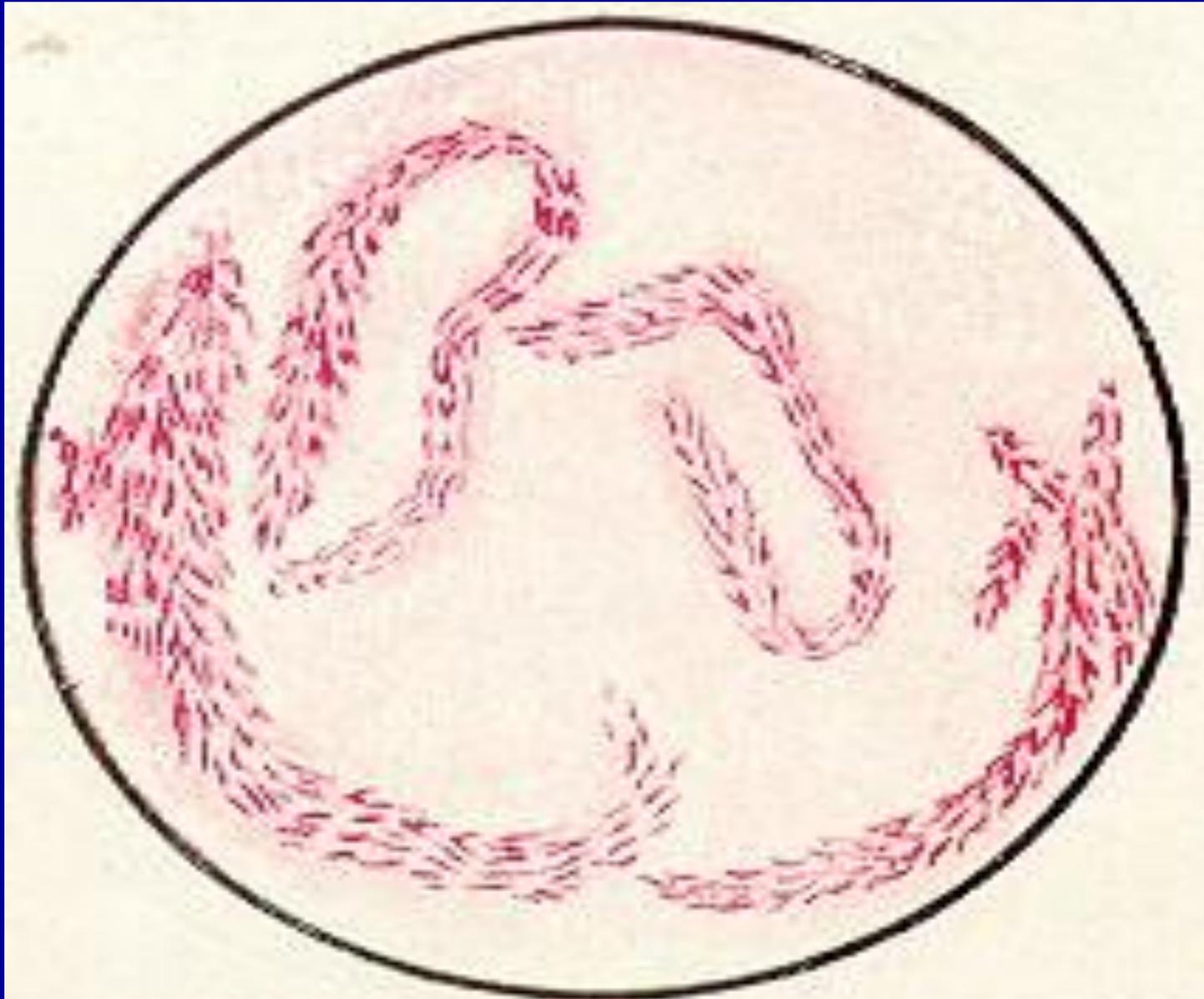
переместить в горизонтальные штативы - "диваны", в
термостат при температуре **37° С**.

Инкубация **12** недель при обязательном еженедельном
просмотре.

Микобактерии на среде Левенштейна-Йенсена



Метод Прайса.



КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ КОМПЛЕКСА M.TUBERCULOSIS

Культуральные признаки	Комплекс M.tuberculosis
Скорость роста	Медленнорастущие > 3 недель
Пигментообразование	Цвет слоновой кости
Морфология колоний	R или S формы
Наличие кислотоустойчивости	Выраженная кислотоустойчивая окраска
Температура роста	Оптимальный рост при 35 - 37° C

ТЕСТЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ КОМПЛЕКСА M. TUBERCULOSIS

T

Дифференциальные тесты		Микобактерии
	+-----T-----+	
		M.tuberculosis нетуберкулезные медленнорастущие
	+-----+	
Основные биохимические тесты на наличие:		
	T-----T-----	
Никотиновой кислоты	+	- <*>
Нитратредуктазы	+	+/-
Термостабильной каталазы	-	+
Рост на среде с натрием салициловокислым (1000 мкг/мл)	-	+ / + / -
Дополнительные тесты: рост на средах, содержащих:		
	T-----T-----	
Паранитробензойную кислоту (500 мкг/мл)	-	+ <***>
Натрия хлорид 5%	-	+ <****>

<*> За исключением M. simae.

<***> За исключением M. gastris.

<****> За исключением M. marinum, M. terrae.

Для дифференциации микобактерий комплекса M. tuberculosis, к

ТЕСТЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ

МИКОБАКТЕРИЙ КОМПЛЕКСА M.TUBERCULOSIS

Дифференциальные тесты	Виды микобактерий комплекса M.tuberculosis			
	M.tuber- culosis	M.bovis	M.af- ricanum	M.mic- roti
-----+-----+-----+-----+-----+				
Основные биохимические тесты на наличие:				
Никотиновой кислоты	+	-	+/-	+/-
Нитратредуктазы	+	-	-	-
Термостабильной каталазы	-	-	-	-/+
Рост на среде с натрием салициловокислым (1000 мкг/мл)	-	-	-	-
-----+-----+-----+-----+-----+				
Дополнительные тесты: рост на средах, содержащих:				
Пиразинамид	+	-	+	+
Мочевина	+/-	+/-	+	+/-
Гидролиз твина в течение 10 дней	-/+	-/+	-	-/+
-----+-----+-----+-----+-----+				
ТСН (2 мкг/мл) гидразидом тиофен-2-карбоксиловой кислоты		+	-	+/-
			+/-	
-----+-----+-----+-----+-----+				

В нашей стране получило распространение определение лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена.

Уровень устойчивости данного штамма в целом выражается той максимальной концентрацией препарата (количество мкг в 1 мл питательной среды), при которой еще наблюдается размножение микобактерий (по числу колоний на плотных средах).

КРИТЕРИЕМ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ НАЗЫВАЮТ ПОКАЗАТЕЛЬ РОСТА МИКОБАКТЕРИАЛЬНОГО ПУЛА, ВЫРАЖЕННЫЙ В АБСОЛЮТНЫХ (ЧИСЛО КОЕ) ИЛИ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ЕДИНИЦАХ (ПРОПОРЦИЯ КОЕ), НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ, СОДЕРЖАЩЕЙ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЙ ПРЕПАРАТ В КРИТИЧЕСКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ, ПРЕВЫШЕНИЕ КОТОРОГО СЧИТАЕТСЯ НАЛИЧИЕМ ПРИЗНАКА УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ.

Для метода абсолютных концентраций появление более 20 КОЕ микобактерий на питательной среде, содержащей лекарственный препарат в критической концентрации, свидетельствует о том, что данный штамм микобактерий обладает лекарственной устойчивостью. При этом необходимо иметь в виду, что объем засеваемой суспензии клеток стандартизован и соответствует 1×10^7 микробных тел.

**КРИТИЧЕСКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
МЕТОДОМ АБСОЛЮТНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ НА СРЕДЕ ЛЕВЕНШТЕЙНА-ЙЕНСЕНА**

Название препарата	Концентрация в мкг/мл
Препараты основного ряда	
Стрептомицин	10
Изониазид	1
Рифампицин	40
Этамбутол	2
Препараты резервного ряда	
Канамицин	30
Протионамид (этионамид)	30
Циклосерин	30
Капреомицин	30
Офлоксацин	2
ПАСК	1
Пиразинамид	200

Протокол. Лабораторная диагностика туберкулёза

Исследуемый материал	Что сделать	Результат
Мазок-препарат из мокроты больного открытой формы туберкулёза, окраска по Цилю- Нильсену	Промикроскопировать, зарисовать	Рисунок
Рост микроколоний туберкулёзной палочки (метод Прайса)	Промикроскопировать, зарисовать	Рисунок
Рост культуры микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена	Описать морфологию колоний, зарисовать	Описание, рисунок

Специфическая профилактика:

- БЦЖ вакцина (BCG = *Bacillus Calmette Guerin vaccine*). Живая, аттенуированная, (тип *bovis*).

Однократно, подкожно новорожденным
3-7 дневного возраста.

Ревакцинация 7 лет, 14 лет.

ТУБЕРКУЛИНОВАЯ ПРОБА МАНТУ

