

Инфекции
дыхательных путей.
Лабораторная
диагностика

Биологическая характеристика отдельных возбудителей.

Pod Streptococcus

■ Морфологические свойства стрептококков:

- клетки стрептококков овоидной формы, могут принимать ланцетовидную форму размером 2,0 мкм, располагаются короткими цепочками или парами; неподвижные;
- спор не образуют, некоторые имеют капсулу (*S. pneumoniae*).

■ Культуральные свойства стрептококков:

- лучше растут в присутствии 5 % CO₂ микроаэрофилы;
- растут в интервале 25 - 45⁰С, температурный оптимум 37⁰С;
- способны образовывать L – формы.

По характеру роста на кровяном агаре выделяют:

α- гемолитические стрептококки – частичный гемолиз и позеленение среды;

β-гемолитические стрептококки – полный гемолиз;

γ-гемолитические стрептококки - невидимый гемолиз;

- каталазоотрицательные; факультативные анаэробы.



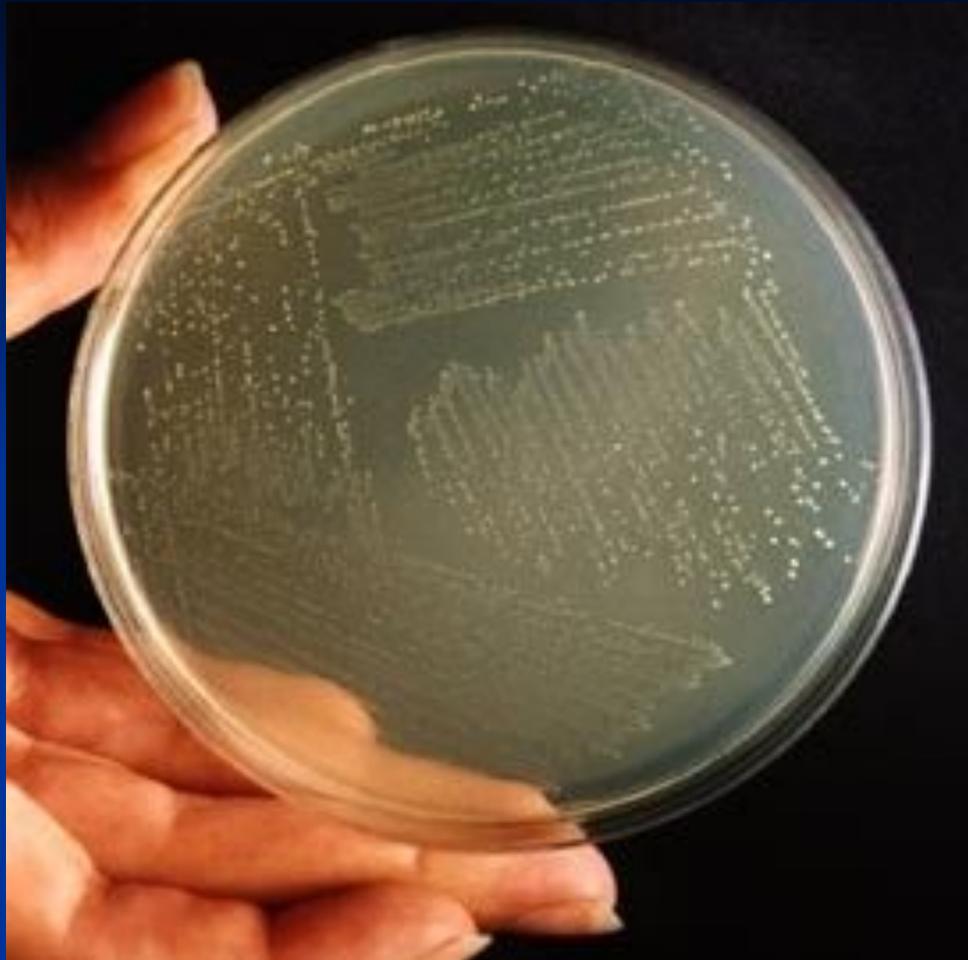
Streptococcus pyogenes (Group A strep) Г +
кокки обычно в цепях



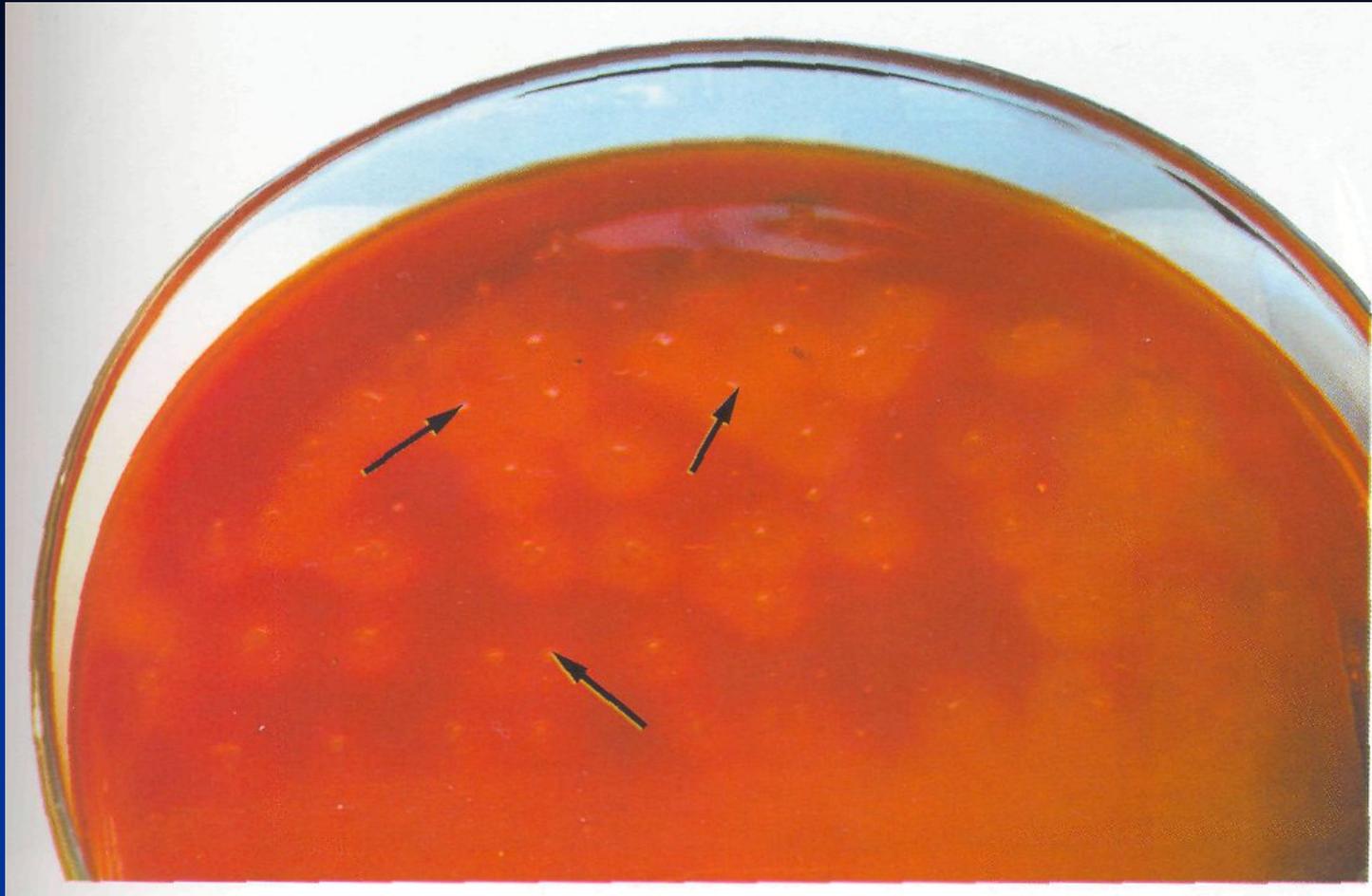
Streptococcus pyogenes
Окраска метиленовым синим.



Streptococcus pneumoniae
Г + кокки обычно в цепях



Streptococcus pyogenes



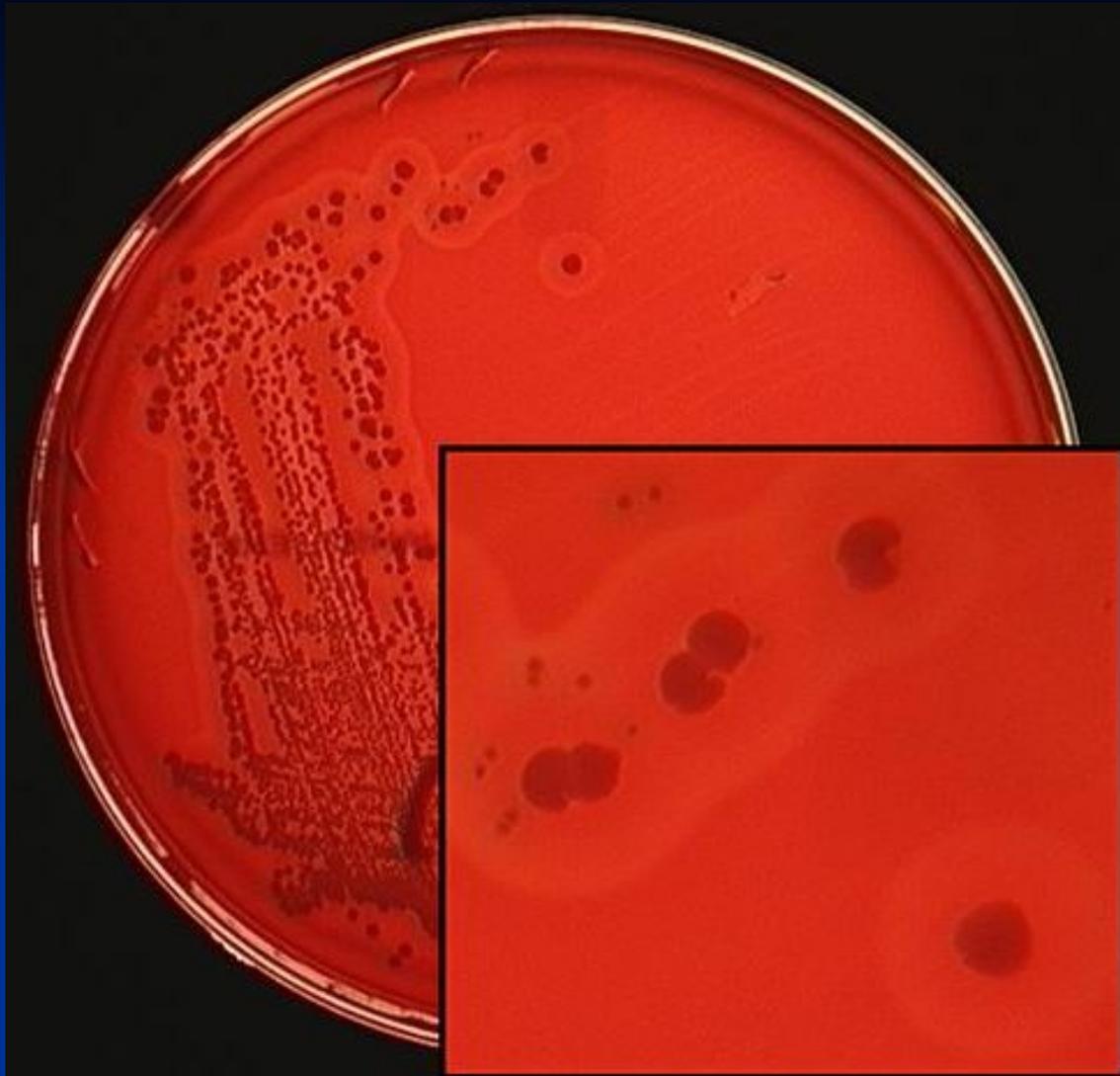
Колонии *Streptococcus pyogenes* на КА.

Видны характерные гладкие блестящие полупрозрачные колонии с ровными краями (отмечены стрелками), окружённые зонами гемолиза.

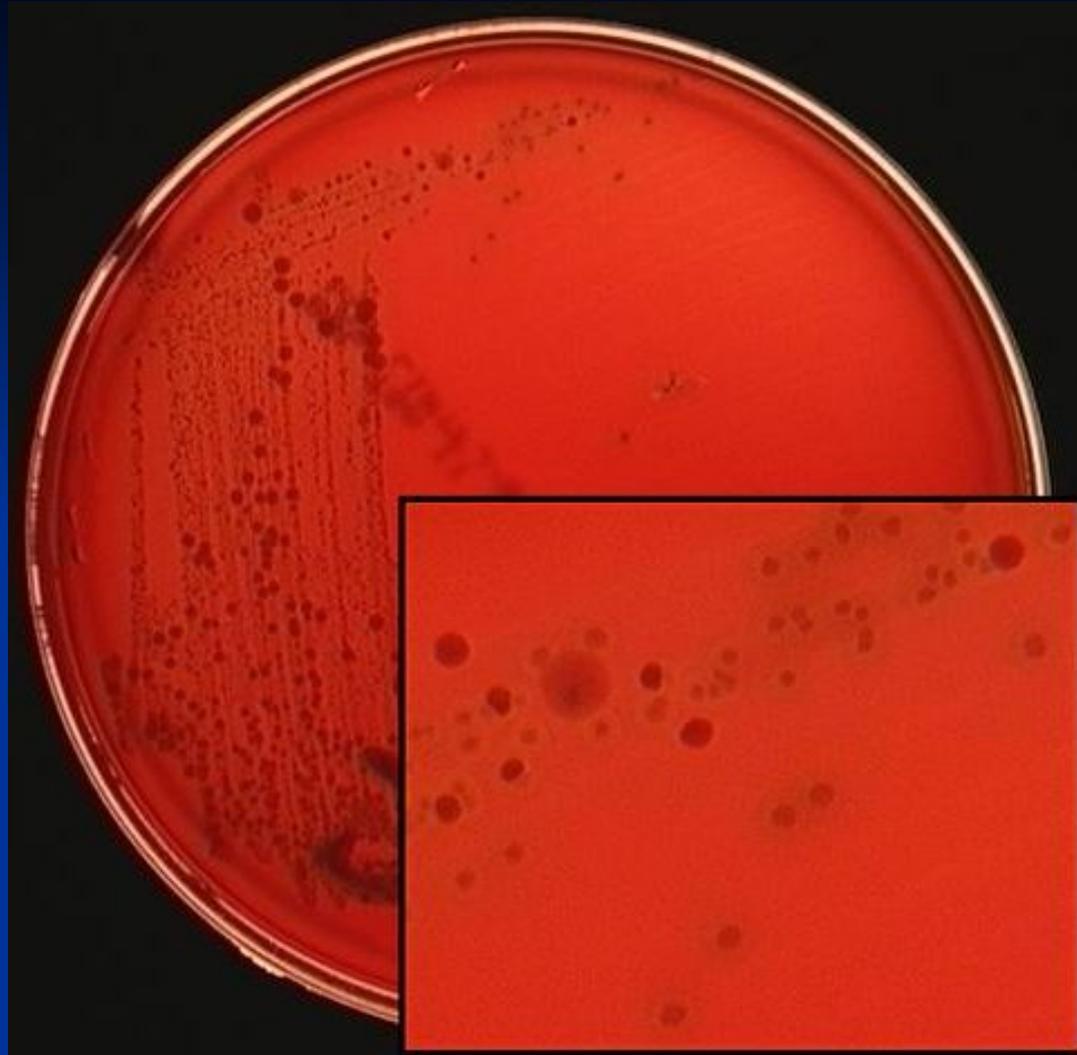


Колонии зеленыящих стрептококков на КА.

В культуру внесен диск с пенициллином, ингибирующим их рост.



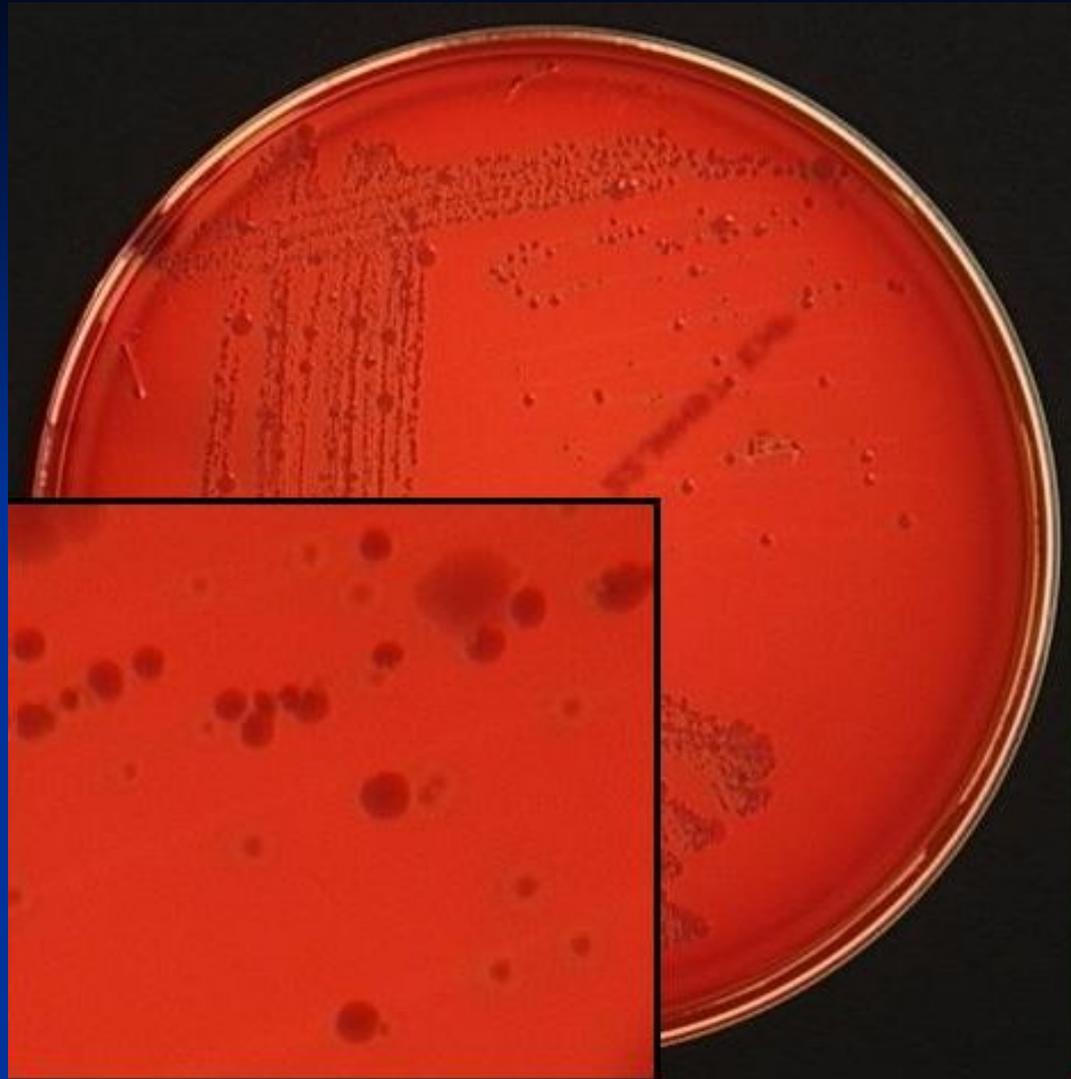
- Большие β -гемолитические колонии
- небольшие α -гемолитические колонии



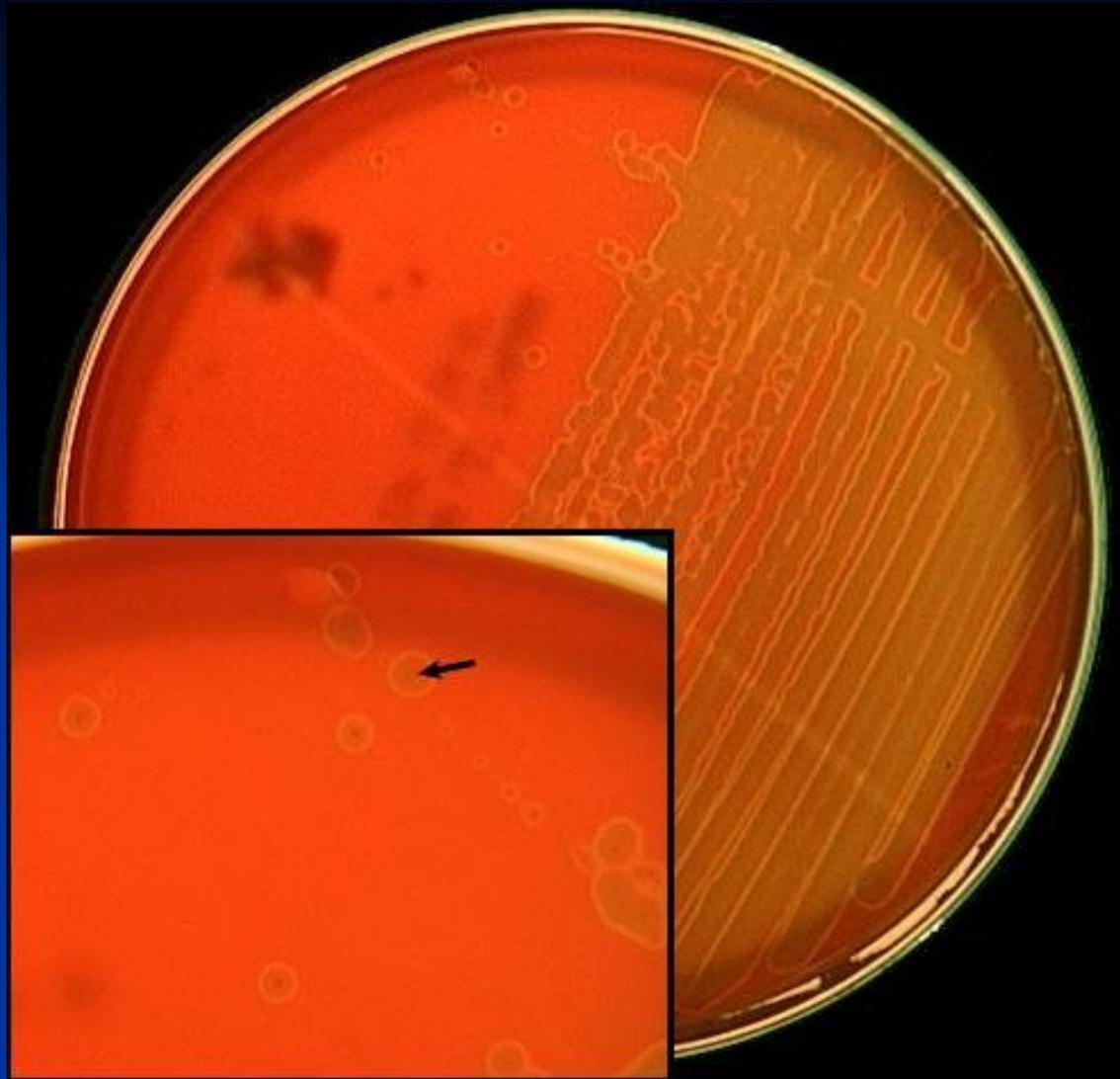
- небольшие, белые non-hemolytic колонии
- небольшие α -гемолитические колонии



- маленький β -гемолитические колонии
- небольшие, белые non-hemolytic колонии



небольшие, белые non-hemolytic колонии
небольшие α -гемолитические колонии



- α -гемолиз (*Streptococcus pneumoniae* на пластинке с кровяным агаром)
- стрелка показывает очень небольшую колонию, окруженную оливковым зеленым обесцвечиванием и тонким, более легким ореолом гемолиза

Биологические свойства стрептококков

	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.agalactiae</i>	Стрептококки группы С и G
Гемолиз на кровяном агаре	В	В, а	В
Гидролиз гиппурата Na	-	+	-
САМР-тест	-	+	-
Наличие PYR	+	-	-
Желточно-эскулиновый тест	-	-	-
Рост в бульоне с 6,5 % NaCl	-	+	-
Чувств. к бацитрацину	+	-	-
Чувств. к сульфаниламидам	-	-	+

■ САМР-тест

Принцип. Выращивание на кровяном агаре *S. agalactiae* совместно со стафилококком, продуцентом токсина, ведет к усилению лизиса эритроцитов и соответственно - увеличению образуемых зон гемолиза.

■ PΥR(L-Pyrrolidonyl-b-Naphthylamide)-тест.

Принцип. Пирролидонил пептидаза (PΥR-аза) катализирует гидролиз L-пирролидонил-б-нафтиламида (PΥR) с высвобождением не связанной L-пирролидон карбоксилловой кислоты и б-нафтиламида. Реакция выявляется добавлением специфического цветного индикатора, N,N,-диметил-амино-циннамальдегида, вызывающего красное окрашивание.

■ Тест с желчью основан на способности 10% желчи и 2% раствора оксихолатов лизировать пневмококк.



Тест на чувствительность стрептококков к бацитрацину.
(Видна зона задержки роста стрептококков группы А вокруг диска с бацитрацином)

Факторы патогенности

1. Фимбриальный белок (белок М) – антитела к нему обеспечивают невосприимчивость к повторному заражению, препятствуют фагоцитозу, связывают фибриноген, проявляет свойства суперантигена.
2. Капсула - защищает стрептококк от фагоцитоза, облегчает адгезию к эпителию, проявляет иммунологическую активность.
3. С 5 а-пептидаза - фермент расщепляет и инактивирует С5а компонент комплемента, который является хемоаттрактантом.
4. Гиалуронидаза - облегчает перемещение бактерий по соединительной ткани, осуществляет процессы инвазии.
5. Ферменты -
 - а) стрептолизины S и O, гиалуронидаза, ДНК-аза, стрептокиназа-инициируют воспалительную реакцию.
 - б) энтерогенные токсины, схожи с токсинами стафилококков, бывают 3 типов: А, В, С – проявляют пирогенную активность (действуют на гипоталамус), способствуют появлению высыпаний на коже;
6. Кардиогепатический токсин – вызывает поражение миокарда, способствует образованию гранулем в печени.

S. pneumoniae

- Основные факторы вирулентности :
капсула, которая защищает от фагоцитоза;
- С-тейхоевая кислота клеточной стенки, активирует комплемент, чем способствует высвобождению медиаторов острой фазы воспаления.

Скарлатина — инфекционная болезнь, вызванная обычно бета-гемолитическим стрептококком группы А (*Streptococcus pyogenes*). Проявляется мелкоточечной сыпью, лихорадкой, общей интоксикацией, ангиной. Заражение происходит от больных воздушно-капельным путём (при кашле, чиханье, разговоре), а также через предметы обихода (посуда, игрушки, белье). Особенно опасны больные как источники инфекции в первые дни болезни.

Эпидемиология

Стрептококки группы А.

Источник инфекции - больной человек или носитель.

Пути передачи: контактный, воздушно-капельный, алиментарный (через пищевые продукты)

Восприимчивый коллектив : дети и взрослые..

Стрептококки группы В.

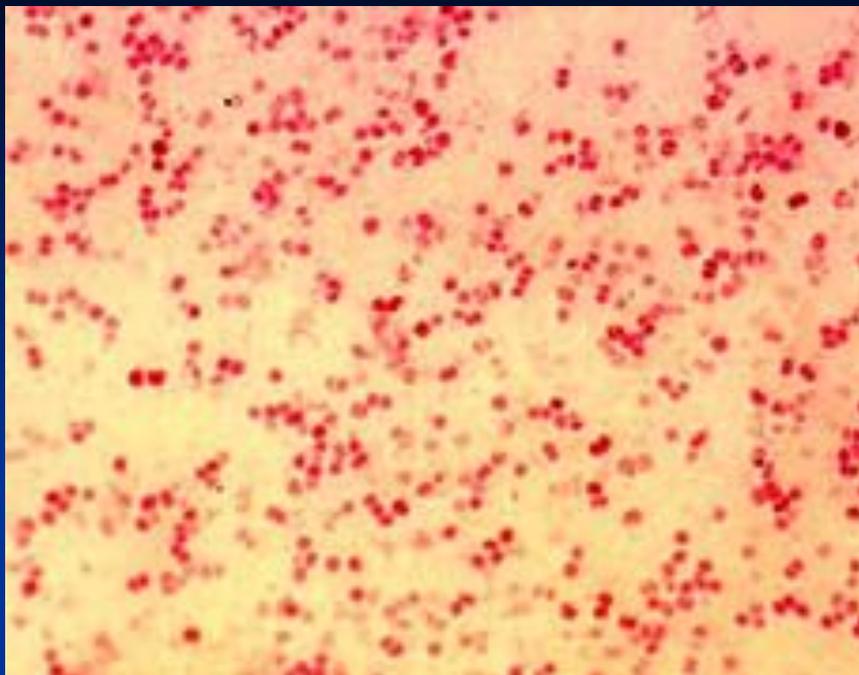
- вертикальный путь заражения – заражается плод при прохождении через родовые пути матери;
- воздушно-капельный (*Streptococcus pneumoniae*).

Род *Neisseria*
Neisseria meningitidis

Морфологические свойства :

- кокки (диплококки), Гр (-) неподвижные, аспорогенные, размер 1,25 x 0,8 мкм, образуют капсулу.

Для клетки характерен полиморфизм: мелкие, крупные клетки, палочковидной формы. Способны переходить в L – формы.



N.meningitidis.
Чистая культура. Окраска по Граму.

Культуральные свойства:

- аэробы, хемоорганотрофы;
- требовательны к условиям роста: растут на свежеприготовленных питательных средах с добавлением белков сыворотки, асцитической жидкости. Ростовые факторы: глютамин, аспарагин, глицин, тирозин;
- для роста оптимум рН 7,2 - 7,4, температуры 37⁰С;
- рост на питательных средах через 24 часа ;
- лучше всего растут на среде Мюллера - Хинтона, которая включает полный набор аминокислот и мясной экстракт;
- менингококк очень чувствителен к внешним воздействиям. На твердых и жидких средах культура гибнет через 48 часов, на полужидких сохраняется до месяца (сохранить культуру лучше всего на среде Дорсе, или среде со сливками); при низкой температуре менингококки быстро теряют способность к образованию колоний; при -10⁰ С - погибают через 2 часа; при нагревании до 60⁰С - погибают через 10 минут; при 80⁰ С - погибают через 2 минуты; при кипячении через 30 секунд погибают.



КОЛОНИИ *Neisseria meningitidis* на КА.

Биологические свойства нейссерий

	<i>N.gonorrhoeae</i>	<i>N.meningitidis</i>	<i>N.subflava</i>	<i>N.flava</i>	<i>N.mucosa</i>	<i>N.sicca</i>	<i>N.lactamica</i>
Рост на МПА	-	-	+	+	+	+	+
Потребность в CO ₂	+	+	-	-	-	-	-
Пигмент	-	-	+	+	+/-	+/-	+
глюкоза	+	+	+	-	+	+	+
мальтоза	-	+	+	-	+	+	+
сахароза	-	-	+/-	-	+	+	-
фруктоза	-	-	+/-	-	+	+	-
лактоза	-	-	-	-	-	-	+

Антигенная структура:

1. Полисахаридная капсула- полимеры аминсахаров и сиаловых кислот; По капсульному АГ выделяют серогруппу А, В, С, В, Х, Z, 29 Е, W 135, N, J, К, L.

2. Белки наружной мембраны:

Родовые АГ (белки) – общие для всех нейссерий;

Видовой АГ (белковой природы)

Группоспецифические АГ – гликопротеидный комплекс.

Типоспецифичные АГ (белки)

3. Липополисахариды - оказывают пирогенное действие.

Факторы патогенности:

1. Основной фактор патогенности капсула – она выполняет защитную функцию от различных воздействий (от фагоцитоза).
2. Эндотоксин.
3. Пили - факторы адгезии к слизистой оболочке носоглотки и тканям мозговой оболочки.
4. Гиалуронидаза, нейраминидаза, гемолизин.
6. Менингококки выделяют Ig A – протеазы.

Эпидемиология:

- экологической нишей является слизистая оболочка носоглотки человека;
- основной источник инфекции – больной или носитель, последний наиболее опасен в эпидемиологическом отношении;
- механизм передачи воздушно - капельный, возможен контактно-бытовой;
- возможно возникновение эпидемии - **возбудитель** *Neisseria meningitidis* группы А;
- возбудители серогруппы В и С вызывают ограниченные вспышки инфекции.

Восприимчивый коллектив – дети и взрослые.

Инфекции, вызываемые менингококками и материал для исследования

Заболевание	Материал для исследования
Менингококконосительство	мазки с задней стенки носоглотки
Менингококцемия	кровь
Менингоэнцефалит	ликвор
Эндокардит	перикардальная жидкость
Артрит, полиартрит	синовияльная жидкость
Иридоциклит	смыв с радужной оболочки
Пневмония	мокрота
Эпидемический цереброспинальный менингит	ликвор

Род *Bordetella*

■ Морфологические свойства:

- мелкие коккобациллы; подвижные и неподвижные;
- по Граму плохо окрашиваются;
- образуют капсулу (микрокапсулу).

■ Культуральные свойства:

- для роста нуждаются в никотиновой кислоте, цистеине, метионине;
- строгие аэробы;
- на твердых средах (агар Борде-Жангу, казеиново-угольный агар, молочно-кровоной) образуют колонии небольшие, сероватые, напоминающие капельки ртути или жемчужины, маслянистой консистенции, тонкие с приподнятым центром;
- на кровяных средах, образуют зоны слабого гемолиза;
- на жидких средах дают несильное помутнение, образуют пленку, иногда со спускающимися краями. Через 2 недели образуют осадок, а среда прозрачна.



B. pertussis.
Окраска по Граму.



Bordetella pertussis
на среде Борде—Жангу



Bordetella bronchiseptica
(Bordet-Gengou-Agar)

Биологические свойства бордетелл

Признак	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchoseptica</i>
жгутики	-	-	+
редукция нитратов	-	-	+
утилизация цитрата	-	-	+
образование уреазы	-	+	+
агар Борде-Жангу рост за 24-48 ч	-	+	+
агар Борде-Жангу рост за 72-96 ч	+		

■ Антигенные свойства:

- общие (для всего рода), специфические (видовые) Аг;
- Видовые АГ – это фактор 1 для *Bordetella pertussis*;
- фактор 12 – для *Bordetella bronchiseptica*;
- фактор 14 – для *Bordetella parapertussis*.

■ Факторы патогенности:

- вирулентные клетки 1 фазы имеют ворсинки, содержащие специфические О -АГ;
- термолабильный **коклюшный токсин – пертусис токсин** (экзотоксин) - влияет на миграцию лимфоцитов, вызывая лимфоцитоз, стимулирует выработку инсулина;
- специфический цитотоксин вызывает повреждение, приводящее к гибели и десквамации мерцательного эпителия;
- гемагглютинин, проявляющий цитотоксический эффект;

Факторы агрессии: пили (фимбрии), филаментозный геммаглютинин, пертантин – белок наружной мембраны клеточной стенки;

Токсины: внеклеточная аденилатциклаза - усиливает синтез и накопление цАМФ внутри клеток хозяина, подавляет хемотаксис;

- трахеальный цитотоксин – повреждает эпителиоциты респираторного тракта, стимулирует продукцию цитокинов;
- дерматонекротический токсин – оказывает повреждающее действие на эпителий респираторного тракта;
- термолабильный эндотоксин – липополисахарид клеточной стенки, стимулирует выработку цитокинов, которые повреждают эпителиальные клетки респираторного тракта.

Эпидемиология:

Источник инфекции - больной (особенно в катаральном периоде) и бактерионосители.

Путь передачи – воздушно-капельный.

Восприимчивый контингент – взрослые и дети.

СХЕМА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1 день

- Посев исследуемого материала на специальные питательные среды: глицерино - картофельный агар по Борде, казеиново-угольный агар, молочно-кровоной агар.
- Инкубирование в термостате при достаточной влажности и 36°C ($\pm 1^{\circ}$).

3-4 день

- После 2-3 суточной инкубации изучают выросшие колонии;
- Из характерных колоний готовят мазки и окрашивают их по Граму;
- На предметном стекле ставят реакцию агглютинации выделенной микробной культуры с иммунной противокклюшной сывороткой, разведенной 1/10 (при титре сыворотки 1/10 000);
- Несколько характерных колоний пересевают на питательные среды и инкубируют в термостате при 37°C сутки;
- Высевают выделенную культуру на скопленный МПА с добавлением 0,1% тирозина.

5 день

- Изучают выросшие колонии, готовят мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют.
- Просматривают посевы на МПА с тирозином.
- Проводят постановку пробы на уреазу.

Род *Corynebacterium*

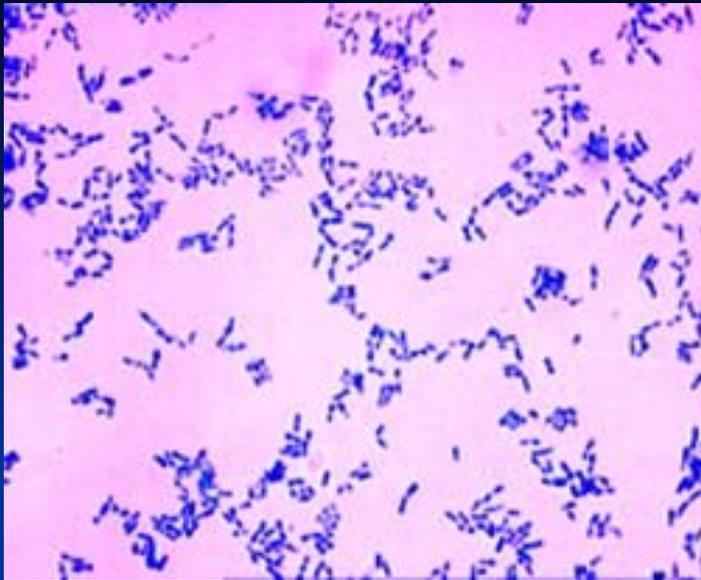
Морфологические свойства:

- тонкие, изогнутые палочки с закругленными концами, утолщенными на концах (булавовидные утолщения), спор и капсул не образуют;
- для возбудителя характерен полиморфизм, проявляющийся в появлении карликовых, кокковидных, толстых форм с колбовидными утолщениями на концах, нитевидные и ветвящиеся формы.

Биовар *gravis* - образует короткие, неправильной формы палочки с метахроматическими гранулами.

Биовар *mitis* – образует длинные изогнутые полиморфные палочки, содержащие волютиновые зерна;

Биовар *intermedius* – образует крупные с бочкообразными очертаниями и внутренними перегородками клетки.



род *Corynebacterium*

окраска щелочной синькой Леффлера.

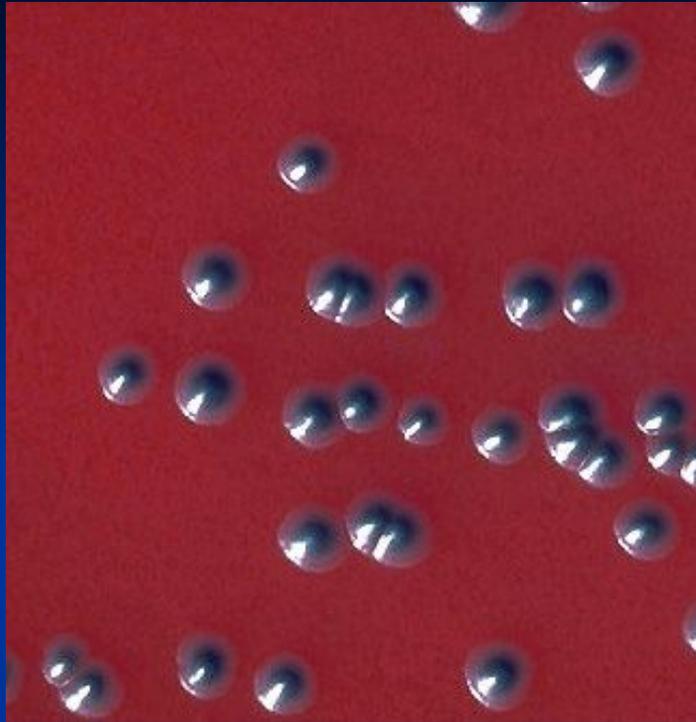


Corynebacterium diphtheriae

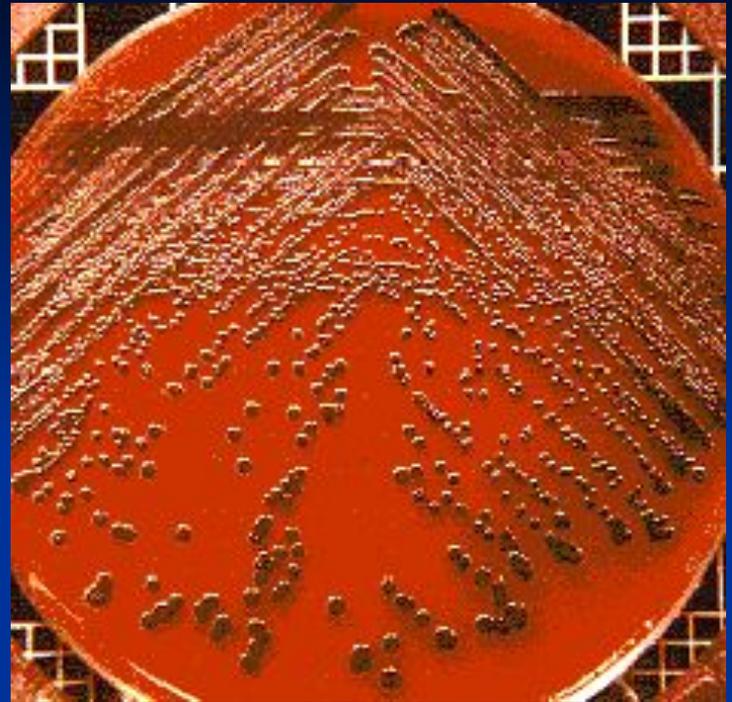
окраска по методу Грама

Культуральные свойства:

- факультативные аэробы, для бурного роста нужен свободный доступ O_2 , температурный оптимум $36^{\circ}C - 37^{\circ}C$, оптимум рН 7,4 - 8,0.
- для роста необходимо содержание в среде цистина, гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, лейцина, пролина, глутамина, пимелиновой и никотиновой кислот, β - аланина, микро и макроэлементов.
- плохо растут на простых средах;
- на сывороточных средах (среда Лефлера) колонии появляются через 10-12 часов;
- наиболее распространенная телуритовая среда. В настоящее время используют модификации
- телурит-шоколадный агар Маклеода: на ней возбудитель образует серовато-черные колонии.
- на жидких средах при росте возбудителя можно увидеть помутнение и осадок.



Corynebacterium diphtheriae
colonies on blood agar



Corynebacterium diphtheriae
en agar Telurito



Колонии *Corynebacterium diphtheriae* (внизу) и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (*hofmannii*) на кровяно-теллуровом агаре.

Дифтерийная палочка восстанавливает теллур, в результате чего колонии приобретают серовато-чёрный цвет. Палочка Хофманна не восстанавливает теллур и образует колонии бежевого цвета с тёмным центром.

Биохимические свойства коринебактерий

Свойства	Биовар		
	<i>gravis</i>	<i>intermedius</i>	<i>mitis</i>
ферментация: глюкоза	+	+	+
сахароза	+/-	-	-
крахмал	+	-	-
гликоген	+	-	-
мальтоза	+	+	+
цистиазная активность	+	+	+
восстановление нитратов	+	+	+
уреазная активность	-	-	-

Антигенная структура:

Выделяют О и К Аг;

- термостабильные О-Аг – дают перекрестные реакция с антителами к Аг микобактерий и накардий;
- липидные и полисахаридные фракции – представлены межвидовыми Аг- термолабильные;
- поверхностные термолабильные К-Аг (нуклеопротеиды, белки) – обеспечивают видовую специфичность;
- корд-фактор, входит в состав микрокапсулы, К-Аг способствует адгезии микробов в месте входных ворот, препятствует фагоцитозу;
- ферменты агрессии и защиты, инвазии: нейраминидаза, гиалуронидазу, гемолизин, дерматонекротоксин.

Факторы патогенности:

- факторы адгезии, колонизации, инвазии ;
- токсический гликопептид, содержащийся в клеточной стенке возбудителя, содержащий коринемиколовую и коринемиколиновую кислоты, он оказывает разрушающее действие на клетки ткани в месте размножения возбудителя;
- экзотоксин, обуславливающий патогенность возбудителя и характер патогенеза.

Биохимические свойства *Corynebacterium diphtheriae*:

Ферментирует с образованием кислоты: глюкозу, мальтозу, галактозу, декстрин (без газа).

Не ферментирует: сахарозу, лактозу, манит.

Не гидролизует мочевины.

Восстанавливает нитраты в нитриты.

Способен продуцировать: каталазу, цистиназу, гиалуронидазу, сукцинатдегидрогеназу, нейраминидазу, ДНКазу.

Не образует индол, уреазу, желатиназу.

Положительна цистеиновая активность .

Образуют бактериоцины.

Эпидемиология:

Источник инфекции – больные или здоровые носители токсигенных дифтерийных микробов.

Механизм передачи возбудителя аспирационный;

Основной путь передачи – воздушно-капельный;

Факторы передачи – воздух, продукты, предметы обихода, игрушки, белье;

Наибольшую эпидемиологическую опасность представляют больные дифтерией зева, носа и гортани, незначительное значение играют больные дифтерией глаз, кожи и др., способные распространять инфекцию контактным путем (через руки, предметы быта).

Материал для исследования

- при дифтерии носоглотки - дифтеритическая пленка или отделяемое пораженной слизистой оболочки зева, носа, глотки
- при дифтерии половых органов – гнойное отделяемое из половых органов;
- при дифтерии глаз – отделяемое конъюнктивы;
- от бактерионосителей – отделяемое слизистой оболочки носа и зева;
- по эпидпоказаниям исследуют пищевые продукты, смывы с различных предметов.

СХЕМА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1 день

Посев исследуемого материала на селективную дифференциально -
диагностическую или, при необходимости, в транспортную среду.
Инкубирование в термостате при 37 °С.

2 день (24 часа)

1. Изучение выросших колоний, при возможности - постановка пробы на токсигенность, цистиназу и посев культуры на скошенный сывороточный агар.
2. При использовании транспортной среды необходимо произвести пересев на селективную дифференциально - диагностическую среду.
3. При множественном росте, в случае необходимости, можно провести исследования для выдачи предварительного ответа - дополнительные пробы Пизу, Заксе и посев "подозрительных" колоний в жидкую питательную среду для выявления дифтерийного токсина в РНГА.

3 день (48 часов)

1. Учет результатов проб на токсигенность и на цистиназу, поставленных во второй день исследования. В случае наличия специфических линий преципитации и при положительной пробе Пизу выдают документированный ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии.
2. Посев чистой культуры, выделенной во второй день исследования, на среды Гисса для изучения биохимических свойств (сахароза, глюкоза, крахмал, мочевины).
3. Повторный просмотр (через 48 часов) чашек первичного посева визуально или с помощью МБС. Постановка проб на токсигенность, цистиназу и отсев колоний на скошенный сывороточный агар.
4. В случае использования транспортной среды, ход исследования см. начиная с п. 1 второго дня и далее по схеме.
5. Выдача бактериологического ответа об отсутствии коринебактерий дифтерии.
6. При постановке РНГА для выявления дифтерийного токсина, при наличии положительного результата в этой реакции и обнаружении у исследуемой культуры фермента цистиназы, отсутствии фермента уреазы, можно выдать предварительный ответ о выделении возбудителя дифтерии.

4 день (72 часа)

1. Учет токсигенных свойств культуры, выделенной в 3 день исследования (через 48 часов роста первичного посева), и выдача документированного ответа о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии. Посев выделенной культуры для определения биохимических свойств (сахароза, глюкоза, крахмал, мочевины).
2. Учет биохимических свойств культуры (токсигенной или нетоксигенной), выделенной во второй день исследования (через 24 часа инкубации первичного посева).

Выдача бактериологического ответа о выделении нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта и дополнительного ответа о биохимических свойствах токсигенных коринебактерий дифтерии, выделенных ранее.

5 день (96 часов)

Выдача бактериологического ответа о выделении (через 48 часов инкубации первичного посева) токсигенных или нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта.

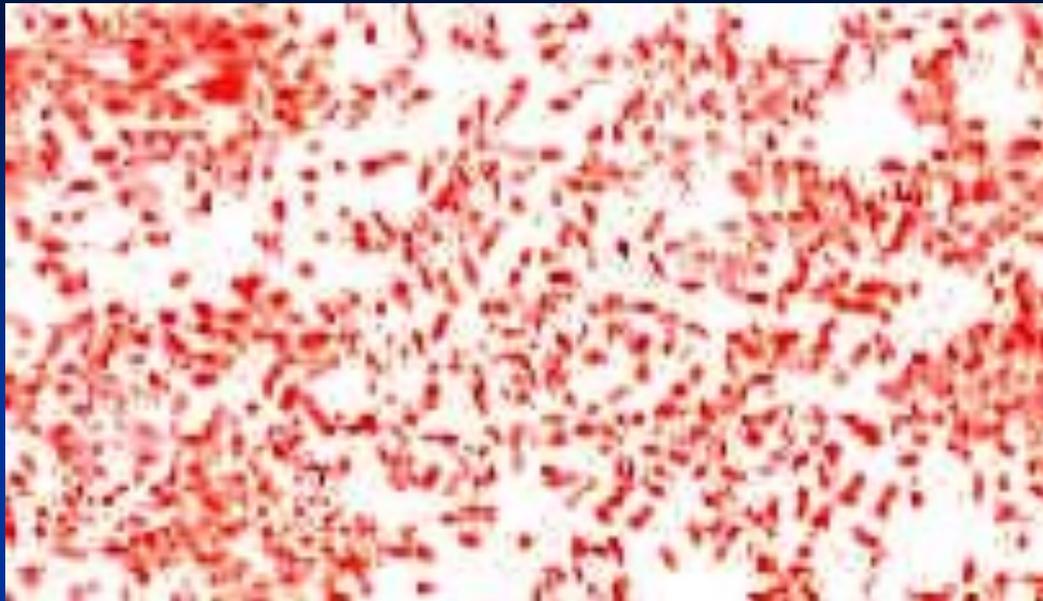
Род *Legionella*

Морфологические свойства

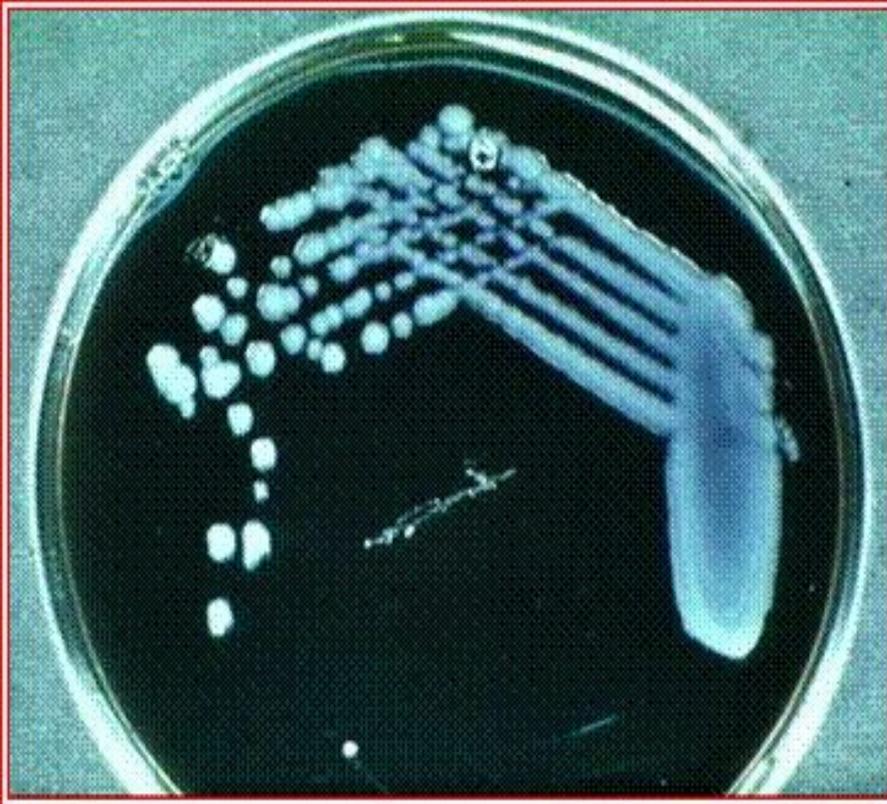
- тонкая палочка, способна к полиморфизму, Гр (-), подвижная, спор не образует.
- Окрашивание по Романовскому Гимзе и Хименесу; жировые включения окрашивают суданом черным;

Культуральные свойства:

- внутриклеточный паразит, аэроб;
- лучшей средой для культивирования является агар Мюллера-Хинтона с цистеином и ионами железа; угольно-дрожжевой агар;
- на твердой питательной среде на 3 - 5 сутки образуются серые стекловидные колонии, оптимальная температура роста 35⁰С, рН 6,9;
- из жидких сред можно использовать для посева только бульон на основе дрожжевого экстракта с железом и цистеином.



мазок из чистой культуры *L.pneumophila*



Legionella pneumophila en BCYE





Колонии *L. pneumophila* на VSYE- α агаре, отмечены стрелками

Биохимические свойства легионелл

Признак	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. bozemanii</i>	<i>L. micdadei</i>	<i>L. dumoffii</i>	<i>L. gormanii</i>
гидролиз гиппурата Na	+	-	-	-	-
оксидаза	+	-	+		-
каталаза	+	+	+	+	+
уреаза	-	-	-	-	-
разжижение желатина	+	+	+	+	+
β -лактамаза	+	+	-	+	+
утилизация крахмала	+	+	+	+	?
Ферментация углеводов с образованием кислоты	-	-	-	-	-

Антигенные свойства:

- типом и группоспецифические Аг, по ним выделяют 12 серогрупп.

Факторы патогенности:

- токсин пептидной природы - ингибитор фагоцитоза ;
- каталаза – ингибитор токсических метаболитов кислорода при фагоцитозе;
- термолабильный токсин (цитотоксин, гемолизин);
эндотоксины

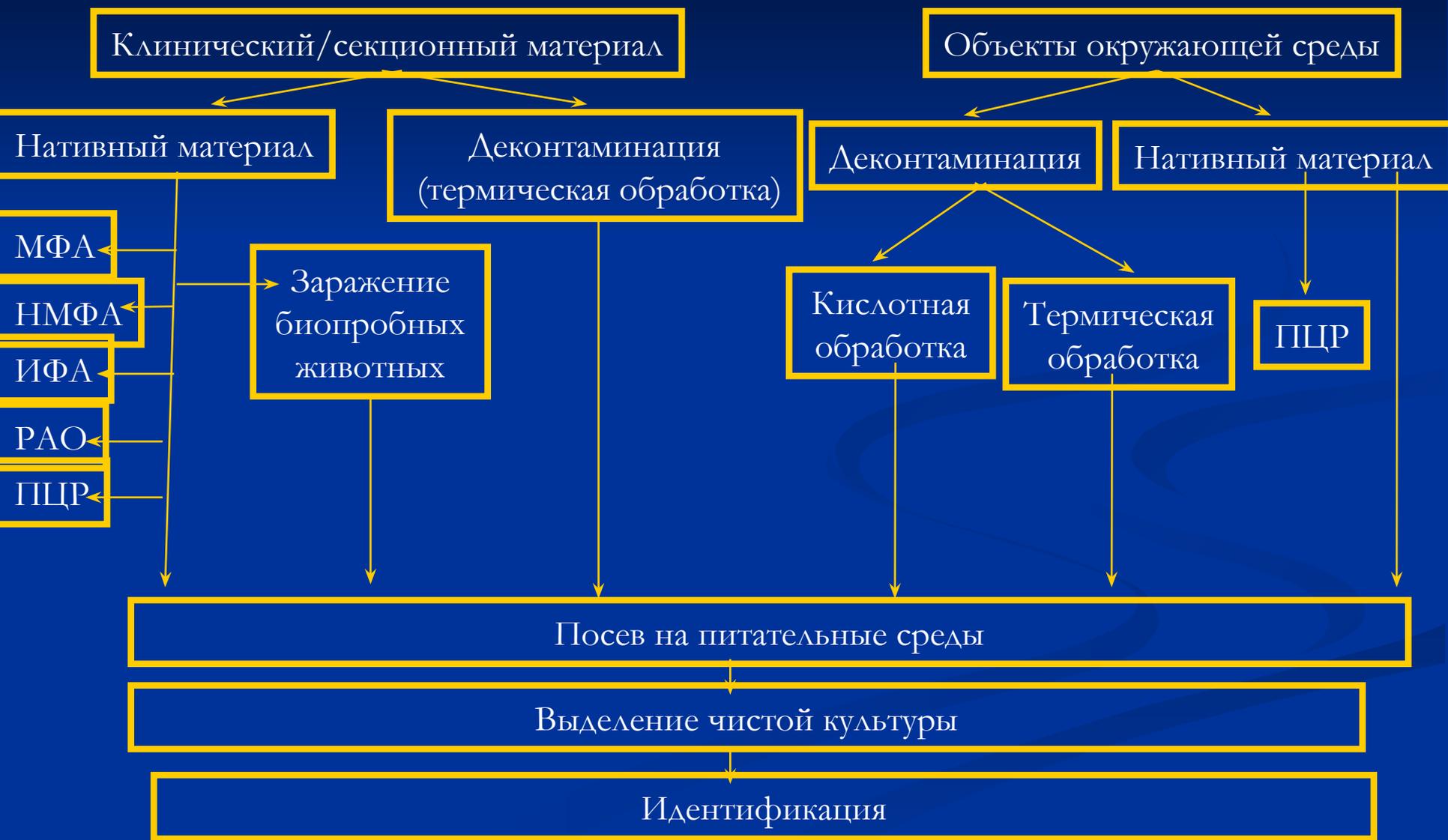
Эпидемиология:

Основной путь передачи – воздушно-капельный.

Источник - больной человек.

Восприимчивый коллектив взрослые и дети.

Схема лабораторной диагностики легионеллеза



Род *Mycobacterium*

- Классификация микобактерий:
 1. по патогенности: собственно патогенные (вызывающие конкретные заболевания), потенциально патогенные и сапрофитические микобактерии.
 2. по скорости роста: быстрорастущие (дают видимый рост на 4-7е сутки), медленно растущие (рост через 7-10 и > дней), и не растущие на искусственных средах.

3. по способности образовывать пигменты: фотохромогенные (образуют пигмент на свету), скотохромогенные (образуют пигмент в темноте) и нефотохромогенные (не образуют пигмента) виды.

- Туберкулез – хроническая инфекция, проявляющаяся поражениями органов дыхания, костей, суставов, кожи, мочеполовых органов и др.
- Возбудителями туберкулеза у человека являются *M. tuberculosis* (более 90% всех случаев туберкулезной инфекции), *M. bovis* (5%) и *M. africanum* (около 3%, главным образом среди населения стран тропической Африки).

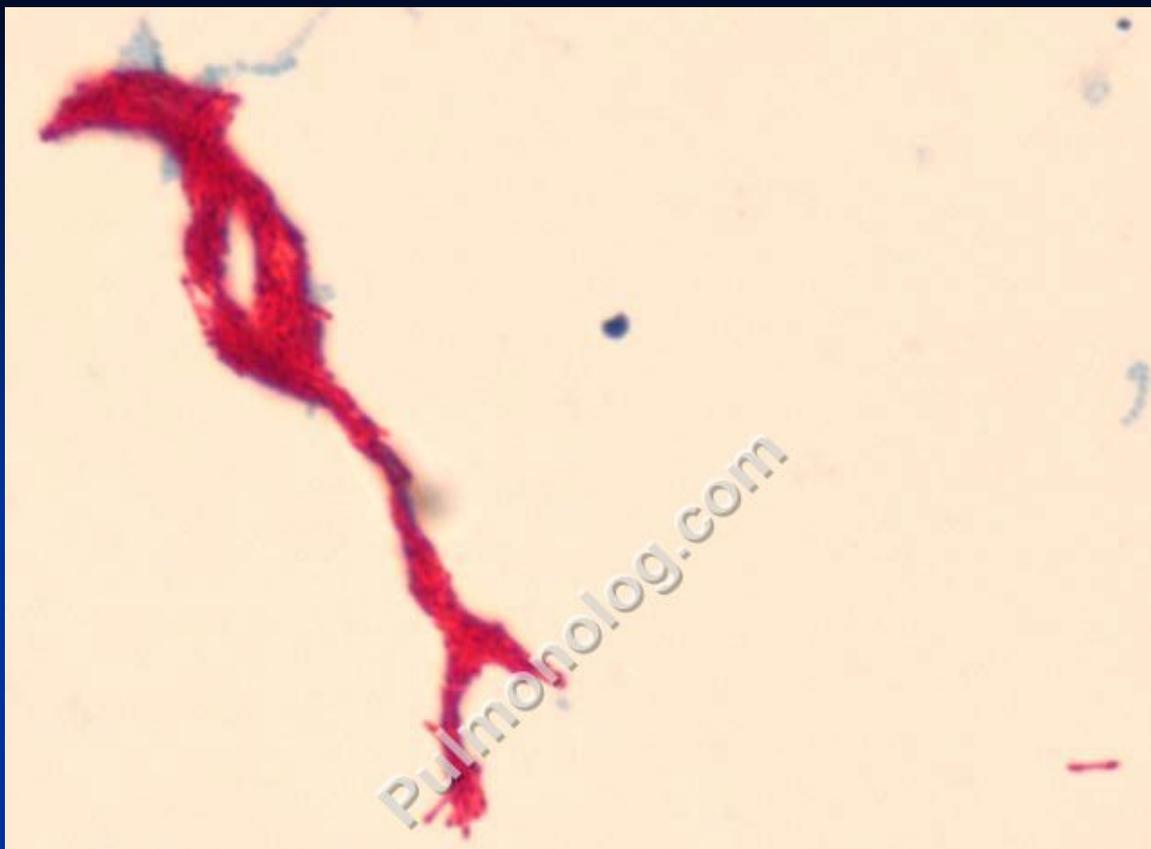
M. tuberculosis

Морфология:

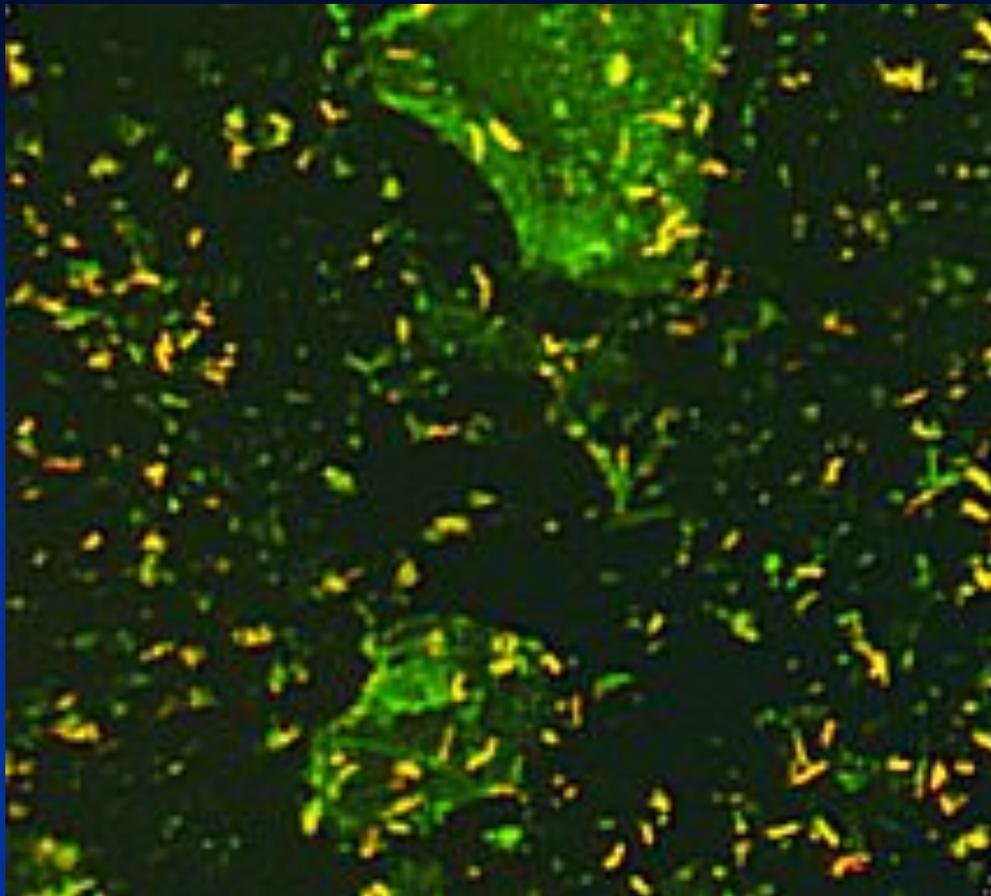
- грамположительные прямые или слегка изогнутые палочки.
- Устойчивы к кислотам, щелочам и спирту.
- Для окраски применяют метод Циля-Нильсена (ярко-красный цвет).
- Возможен переход в фильтрующиеся и L-формы.
- Неподвижны, капсул не образуют (образуют микрокапсулу) .
- Содержат кислотонеустойчивые гранулы (зерна Муха), располагающиеся в цитоплазме.



Микобактерии туберкулеза. Окраска по Романовского-Гимза



Скопление микобактерий туберкулеза в цепочки



Люминисцентная микроскопия.

Культуральные свойства:

для культивирования используют специальные **питательные среды**, содержащие яйца, глицерин, картофель, аспарагин, витамины, соли. Чаще всего применяют яичную среду Левенштейна-Йенсена и синтетическую среду Сотона.

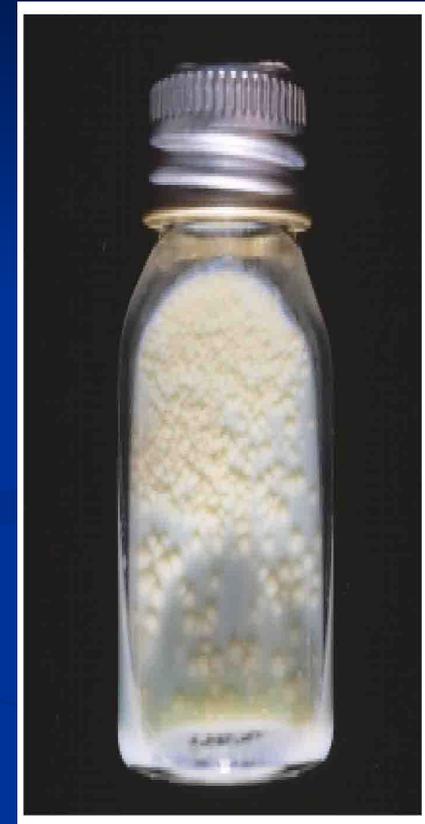
Размножаются микобактерии туберкулеза медленно.

На плотных средах образуются морщинистые, сухие колонии с неровными краями;

В жидких средах на поверхности образуется нежная пленка, которая утолщается и падает на дно, среда при этом остается прозрачной.

Для получения более гомогенного роста микобактерии к питательным средам добавляют твин - 80 (поверхностно-активное вещество).

Культура микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена



.Микобактерии растут в виде типичных морщинистых колоний кремового цвета на зеленом фоне яичной среды.

Антигены

микобактерии содержат протеины, полисахариды, липиды, фосфатиды.

Антитела к ним определяются в РСК, РНГА, преципитации в геле. Имеются общие и специфические антигены у *M. tuberculosis*, *M. bovis* и других микобактерии, включая сапрофитические виды.

Эпидемиология:

источником являются больной бациллярной формой человек, больное животное (крупный рогатый скот, свиньи) или птица.

Механизм передачи: ведущим является аспирационный (воздушно-капельный или воздушно-пылевой путь).

Редко контактно бытовой путь передачи.

Материал для исследования:

1. мокрота,
2. промывные воды бронхов,
3. спинномозговая жидкость,
4. плевральная жидкость,
5. гной,
6. моча,
7. кал,
8. пунктат лимфатических узлов.

Лабораторная диагностика:

Применяемые методы диагностики:

- бактериоскопический,
- бактериологический,
- биологический,
- серологический,
- аллергологический,
- ПЦР.

В исследуемом материале обнаруживают микобактерии туберкулеза путем **микроскопии** мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену (эффективна только при высокой концентрации микобактерий)* и с применением люминесцентных красителей (чаще всего аурамина).

Бактериоскопию рассматривают как ориентировочный метод.

* Для «обогащения» исследуемого материала используют различные методы, в частности центрифугирование и флотацию.

«обогащение» исследуемого материала

- Центрифугирование: исследуемый материал обрабатывают смесью растворов NaCl и NaOH , центрифугируют и микроскопируют осадок.
- Флотация: метод включает обработку материала смесью NaOH , дистиллированной воды и ксилола (или бензола). Образец энергично встряхивают; образующаяся пена всплывает и захватывает микобактерии. Пену отсасывают и ГОТОВЯТ мазки.

Бактериологический метод.

- Достоинство метода — возможность получения чистой культуры туберкулеза, позволяющая её идентифицировать, оценить вирулентные свойства и определить чувствительность к лекарственным средствам.

Бактериологический метод.

Материал засевают, тщательно втирая, на твёрдые питательные среды

Посевы делают на среду Левенштейна-Йенсена и инкубируют при 37°C в термостате в течение 3 мес. Выделенные культуры идентифицируют и определяют их чувствительность к химиотерапевтическим препаратам.

Для ускоренного обнаружения микобактерий делают посевы **по методу Прайса**, позволяющего получить микрокультуры туберкулезных бактерий и определить наличие корд-фактора, когда микобактерий располагаются в форме кос и жгутов.

метод Прайса

Материал помещают на предметное стекло, обрабатывают серной кислотой, отмывают физиологическим раствором и вносят в питательную среду, дополненную цитратной лизированной кровью.

Стекло вынимают через 3-4 сут. и окрашивают по Цилю-Нильсену.

При микроскопии обнаруживают микроколонии микобактерии возбудителя туберкулеза.

Вирулентные бактерии образуют змеевидные, а невирулентные — аморфные микроколонии.

биологическая проба - заражают морских свинок с последующим выделением чистой культуры.

Материал вводится под кожу или в полость живота морским свинкам.

При наличии в материале вирулентных туберкулезных микобактерий обычно на 10-12-й день в месте его введения под кожей образуется уплотнение переходящее в дальнейшем в незаживающую язву.

Свинки погибают от генерализованного туберкулеза через 2-4 месяца.

Ускоренная биологическая проба:

через регионарный лимфатический узел морской свинки вводят несколько капель исследуемого материала.

На 8-10-й день увеличенный лимфатический узел вырезают и исследуют бактериоскопически в препаратах-отпечатках на присутствие туберкулезных микобактерий.

Серологические исследования имеют относительное значение.

Кожно-аллергические туберкулиновые пробы (реакция Манту) ставят с целью выявления лиц, инфицированных туберкулезными микобактериями, для оценки течения туберкулезного процесса у больных, а также для контроля эффективности вакцинации и отбора лиц для ревакцинации ВСГ.

Забор, хранение и транспортировка мокроты для бактериологического исследования

Забор материала:

- перед забором утренней порции мокроты больной должен прополоскать рот кипяченой водой или слабым раствором антисептика, почистить зубы. Мокроту собирают в стерильную банку с бусами для проведения гомогенизации материала. Перед посевом мокроту тщательно растирают в ступке. В стерильную банку с бусами помещают 1 мл мокроты, добавляют туда 9 мл пептонной воды или пептонного бульона. Смесь тщательно встряхивают в течение нескольких минут, получают гомогенат, из которого готовят последовательные десятикратные разведения;
- при заборе материала из глубины бронхов используют защищенные щеточки, что предохраняет материал от контаминации флорой верхних дыхательных путей;
- при исследовании трахеобронхиального содержимого при заборе материала используют стерильный шприц, который вводят в трахею. Для этого необходимо ввести 10 мл стерильного физиологического раствора, вызывая рефлекс кашля, откашливаемый смыв помещают в стерильную посуду.

Хранение:

- хранить не более 2 ч при комнатной температуре.
- Пробу хранят в холодильнике при 4⁰С не более 2-3 часов.

Транспортировка:

- используют стерильную одноразовую емкость с завинчивающейся крышкой (для сбора мокроты).

Основные правила забора, хранения и транспортировки ликвора для бактериологического исследования

Забор материала:

- взятие материала производят при люмбальной пункции. Ее проводит врач до начала антибиотикотерапии. Место пункции обрабатывают йод-содержащим антисептиком и этиловым спиртом;
- ликвор собирают в стерильную пробирку с герметично закрывающейся крышкой. Обычно материал собирают в три пробирки для микробиологического, клинического и биохимического анализа;
- при подозрении на туберкулезную или грибковую инфекцию у взрослых берут не менее 10 мл исследуемого материала;
- доставленный, в лабораторию образец СМЖ, первоначально центрифугируют, используя осадок для приготовления мазка и посева.

Хранение:

- собранный ликвор необходимо срочно доставить в лабораторию. Сохранить его можно при 37⁰С не более 15 мин, избегая охлаждения (так как менингококки гибнут при других температурах).

Транспортировка:

- в стерильных одноразовых пробирках с завинчивающейся пробкой;
- в шприце с иглой , воткнутой в стерильную резиновую пробку;
- в пробирке с тиогликолевой средой, закрытой стерильной резиновой пробкой;
- в транспортировочной емкости для сохранения анаэробов.

Забор материала при бактериальных инфекциях верхних дыхательных путей

- отделяемое носовых ходов берут **стерильным ватным тампоном**, который обычно вводят в средний носовой ход и вращательным движением собирают материал, **который помещают в транспортную среду** и доставляют в лабораторию;
- материал из области хоан забирают стерильным заднеглоточным тампоном;
- при бактериальных синуситах исследуют аспират из придаточных пазух;
- при фарингитах материал забирают тампоном с задней стенки глотки при широко открытой полости рта (язык фиксируют шпателем). Тампон не должен касаться языка и слизистой оболочки полости рта;
- при тонзиллитах материал забирают с миндалин, так как возбудитель находится в складках и ткани миндалин. Полость рта и глотку тщательно прополаскивают стерильным физиологическим раствором;
- при склероме (атрофической и рубцовой формах) - содержимое дыхательных путей забирают тампоном отдельно из обеих половин носовой полости .

Забор материала при бактериальных инфекциях нижних дыхательных путей

- пробы смыва с бронхов собирают в стерильный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой или в стеклянную емкость;
- бронхоальвеолярный лаваж - смыв с бронхов, соскоб с бронхов, образцы транстрахеальной биопсии получают при введении бронхоскопа трансназально или трансорально или через эндотрахеальную трубку;
- Пробы соскоба с бронхов:
 - через биопсийный канал бронхоскопа вводят телескопический двойной катетер. Собирают материал в стерильный одноразовый контейнер с завинчивающейся крышкой или транспортировочную емкость для анаэробов;
 - при заборе трансбронхиального биоптата собирают пробу через биопсийный канал бронхоскопа, помещают ее в стерильный одноразовый контейнер с физиологическим раствором или в пробирку с тиогликолевой средой.
- Аспират легких:
 - при аспирации иглу через грудину вводят в инфильтрат легкого под контролем сканера томографа. Аспирацию проводят из очага воспаления. Материал помещают в транспортировочный контейнер со средой для анаэробов или в стеклянную пробирку с тиогликолевой средой.
- Биоптат легких:
 - получают при операционном вмешательстве. Забирают кусочки ткани величиной до 3 см² (если очаг воспаления большой, берут несколько проб). Материал помещают в стерильный одноразовый контейнер или транспортировочную емкость со средой для анаэробов.

Бактериологическое исследование СМЖ

- образец СМЖ (мутную или опалесцирующую) первоначально центрифугируют, используя осадок для мазка и посева;
- мазок окрашивают метиленовым синим. При обнаружении в мазке бактерий возможна выдача предварительного ответа;
- независимо от результатов микроскопии осадок засевают на чашки- с шоколадным агаром, 20% сывороточным агаром и МПА;
- засеянные чашки инкубируют в эксикаторе в атмосфере 5 % - 7 % CO_2 (со свечой) строго при 37°C . Через 24 часа посевы просматривают, учитывают культуральные свойства. Из выросших колоний делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют;

- делают пересев на специальные среды, для подозреваемых видов, с целью накопления чистых культур;
- если на агаровых средах через 24 часа инкубации рост колоний отсутствует, посеvy оставляют еще на 24 часа;
- из флакона с посевом СМЖ на среде обогащения делают высевы по 0,3-0,5 мл, на упомянутые выше среды;
- Результаты регистрируют через 24-48 часов. Окончательную идентификацию возбудителя проводят по биохимическим и антигенным свойствам. В надосадочной жидкости центрифугата с помощью РПГА, ИФА можно обнаружить АГ менингококка или других возбудителей.

Бактериологическое исследование мокроты

Микроскопический метод.

- используют в качестве ориентировочной экспресс-диагностики.
- мазки готовят из исследуемого материала - гнойных комочков мокроты без разведения.
- Результат микроскопии мазков из мокроты дает существенную информацию о природе возбудителя.
- ✓ обнаружение Гр (+) кокков, окруженных неокрашенным фоном, позволяет предположить наличие *S. pneumoniae*;
- ✓ мелких Гр (-) бактерий - *H. influenzae*;
- ✓ Гр (-) диплобактерий, расположенных интрацеллюлярно или экстрацеллюлярно – *Moraxella catarrhalis*;
- ✓ Гр (+) , гроздевидно расположенных кокков - *S. aureus*;
- ✓ Гр (-) палочек, с закругленными концами - энтеробактерий или псевдомонад.
- ✓ цепочек Гр (+) кокков - стрептококков .

Бактериологическое исследование проводят:

- в первые 4-5 дней от начала заболевания;
- желательно до начала антибиотикотерапии;
- повторное исследование проводят в случае, неэффективности антибактериальной терапии, при затяжном течении пневмонии, при сохранении рентгенологических, клинических и лабораторных данных.

Выбор среды для первичного посева

Ориентируются на результаты микроскопии.

Для выделения:

- *S.pneumoniae*, *H.influenzae* , *M.catarrhalis* используют 5% кровяной агар;
- стафилококков используют ЖСА;
- энтеробактерий используют среду Эндо;
- дрожжеподобных грибов среду Сабуро.

Дальнейшую идентификацию выделенного возбудителя проводят по общепринятой схеме. Определяют чувствительность к антибиотикам. Диагностическую значимость оценивают, учитывая критерии этиологической значимости условно-патогенных бактерий.

Интерпретация результатов исследования мокроты.

- обнаружение микроорганизмов в разведении 10^5 КОЕ/мл расцениваются как контаминацию мокроты;
- в случае исследования эндотрахеального аспирата диагностическим считают выделение микроорганизмов из разведения 10^6 КОЕ/мл.
- инвазивный метод забора материала возможен с помощью защищенной щетки;
- рост при разведении 10^3 КОЕ/мл служит доказательством инфекционного процесса;
- альтернативным способом считается защищенный бронхоальвеолярный лаваж, при котором обнаружение более 10^4 КОЕ/мл считается доказательством инфицирующей роли микроорганизмов.

Для диагностики **атипичных** пневмоний используются методы иммуноиндикации (РИФ, РПГА) и серодиагностики (ИФА, РПГА).