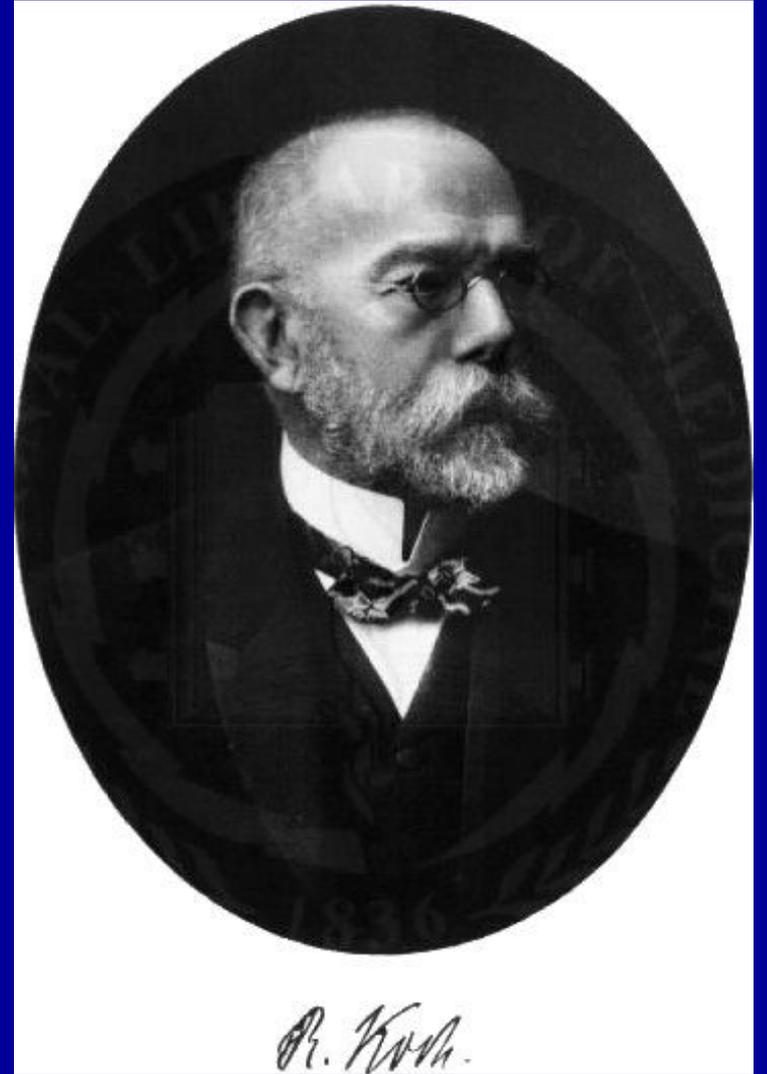


# Лабораторная диагностика туберкулёза



# МИКОБАКТЕРИИ

**ПОРЯДОК** Actinomycetales

**СЕМЕЙСТВО** Mycobacteriaceae

**РОД** Mycobacterium

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

более 160 видов

**ВИДЫ** *M. tuberculosis*

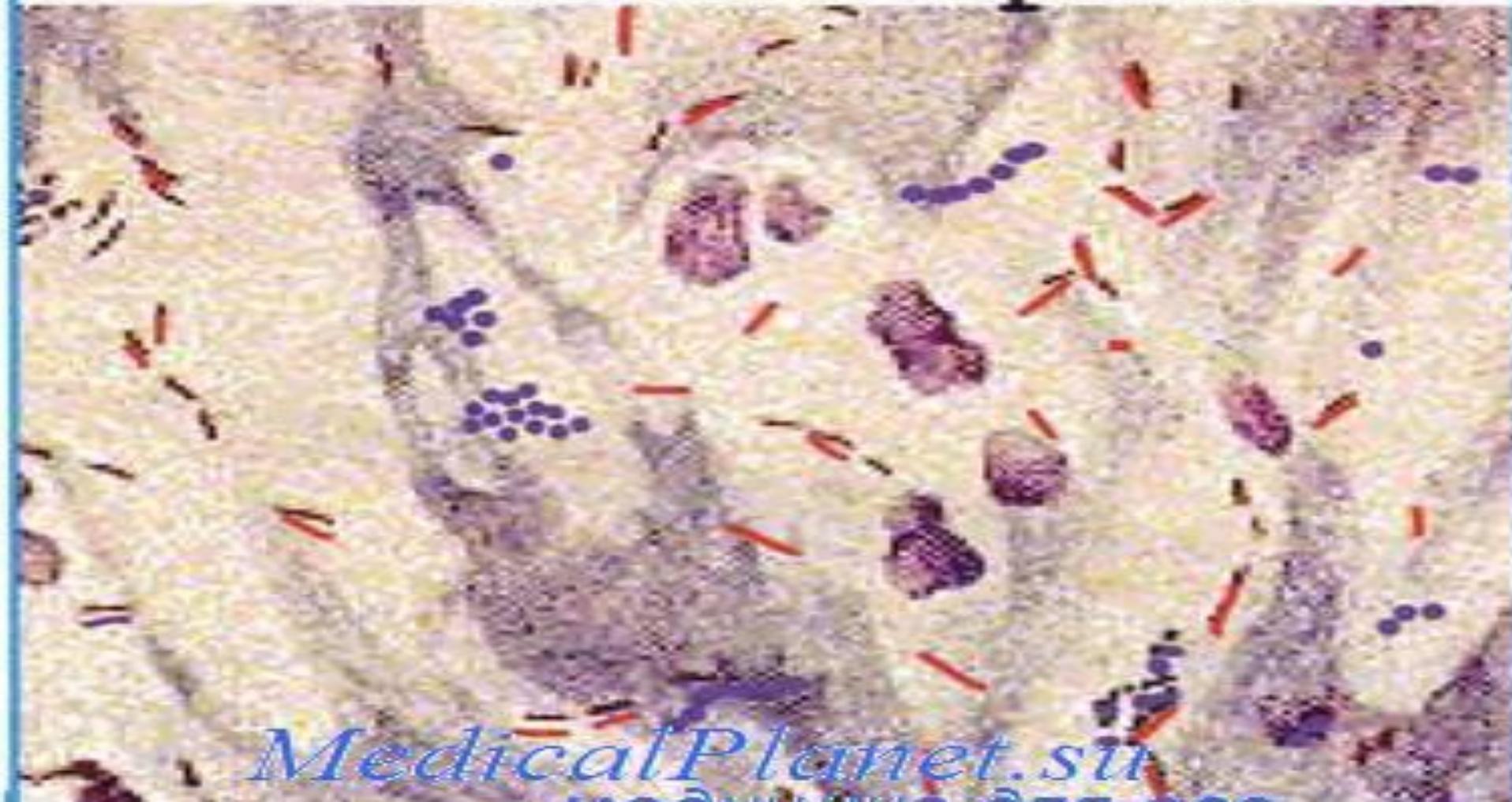
*M. bovis*

*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)**

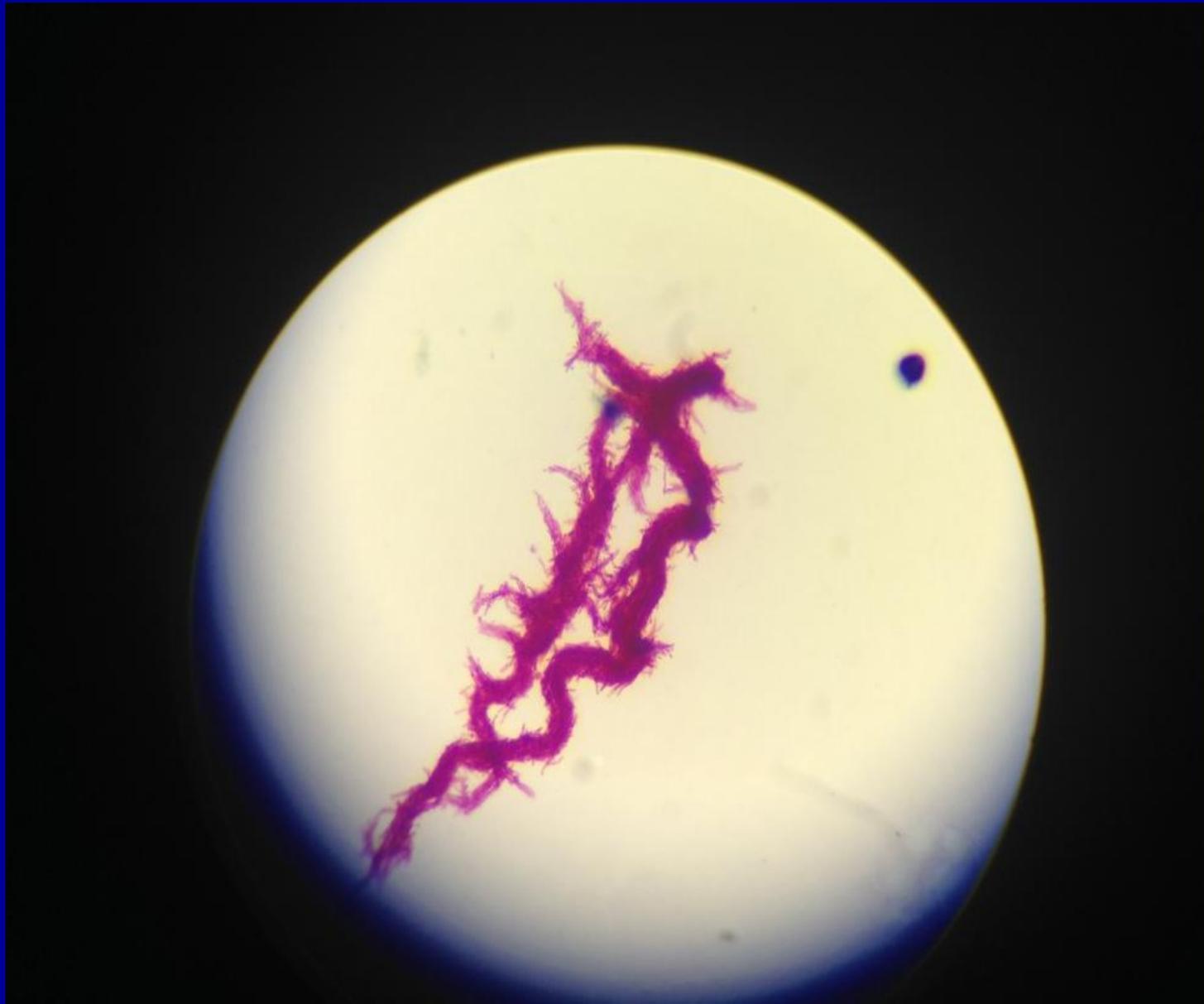
- **ВЖК:** миколовая, фтионовая, туберкулостеариновая

- **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

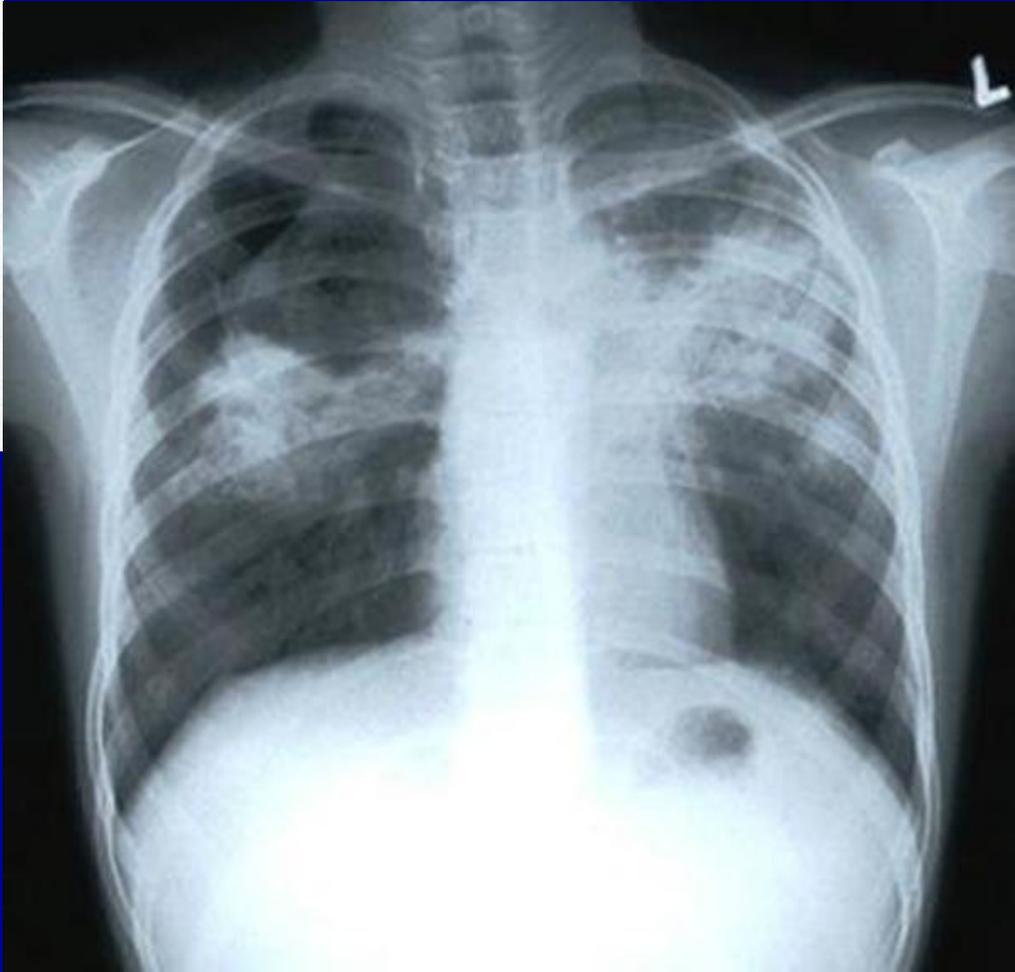
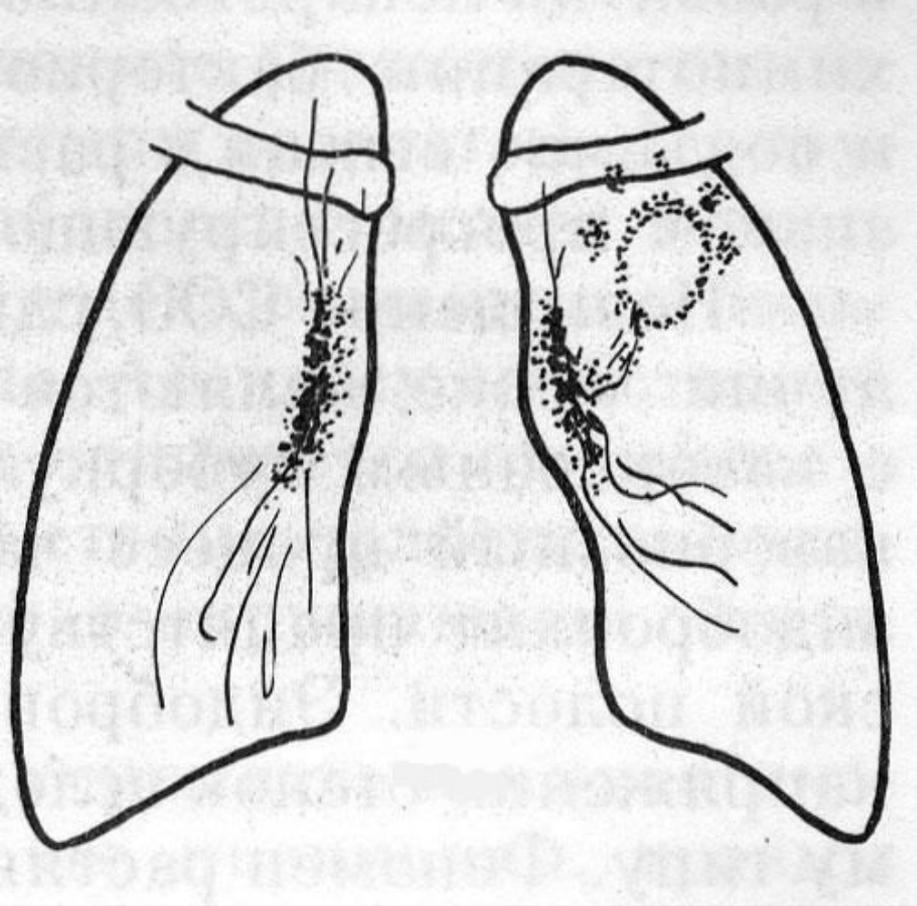
СУХАЯ МОКРОТА – 100 °С – 45 МИНУТ

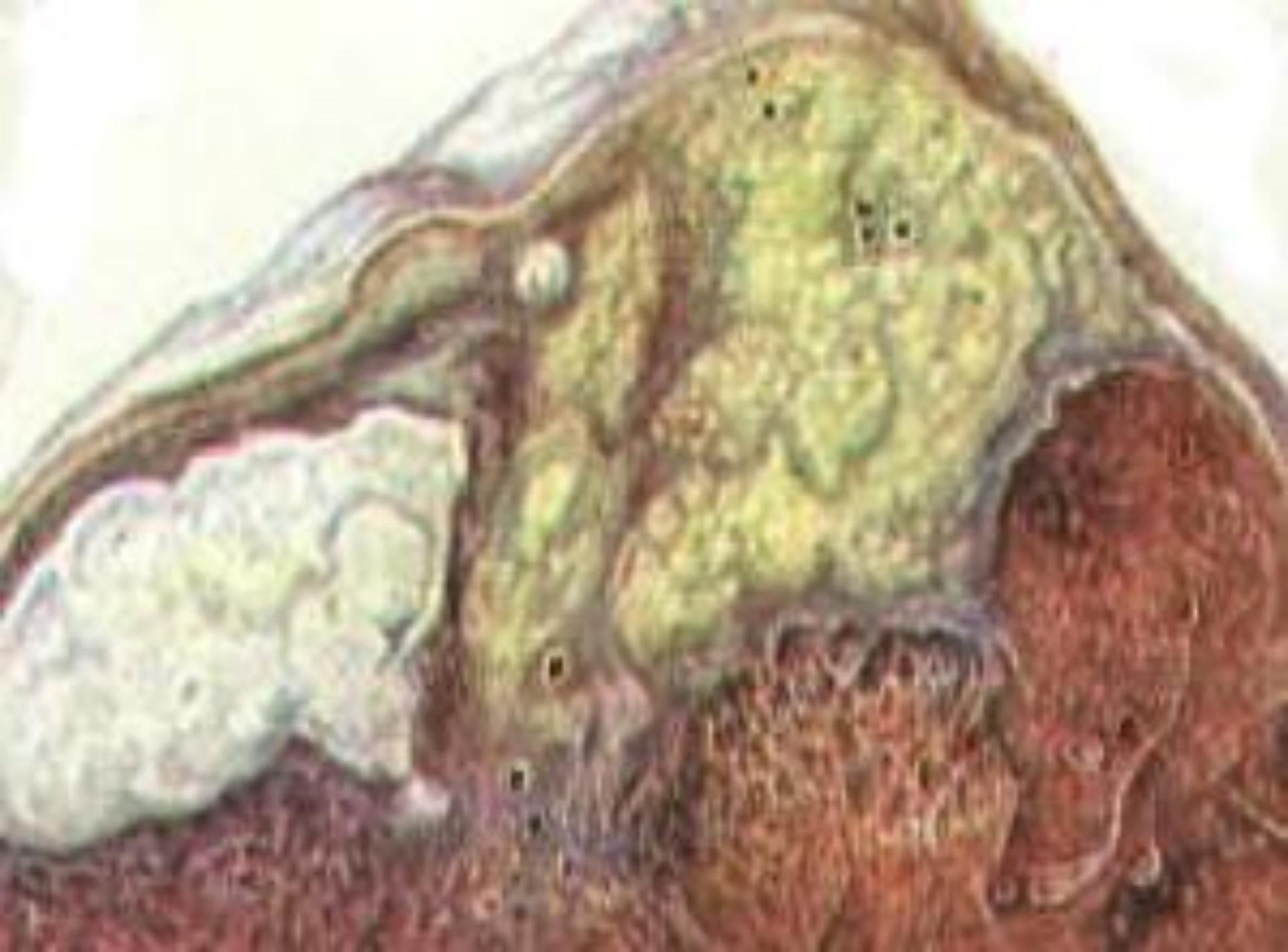
МОЛОКО – 60 °С – 20 МИНУТ

ДЕЗИНФЕКТАНТЫ – 3-6 ЧАСОВ

СПИРТО-, ЩЕЛОЧЕ-,

КИСЛОТОУСТОЙЧИВОСТЬ





# ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

## Препараты основного ряда

Стрептомицин

Изониазид

Рифампицин

Этамбутол

## Препараты резервного ряда

Канамицин

Протионамид

Циклосерин

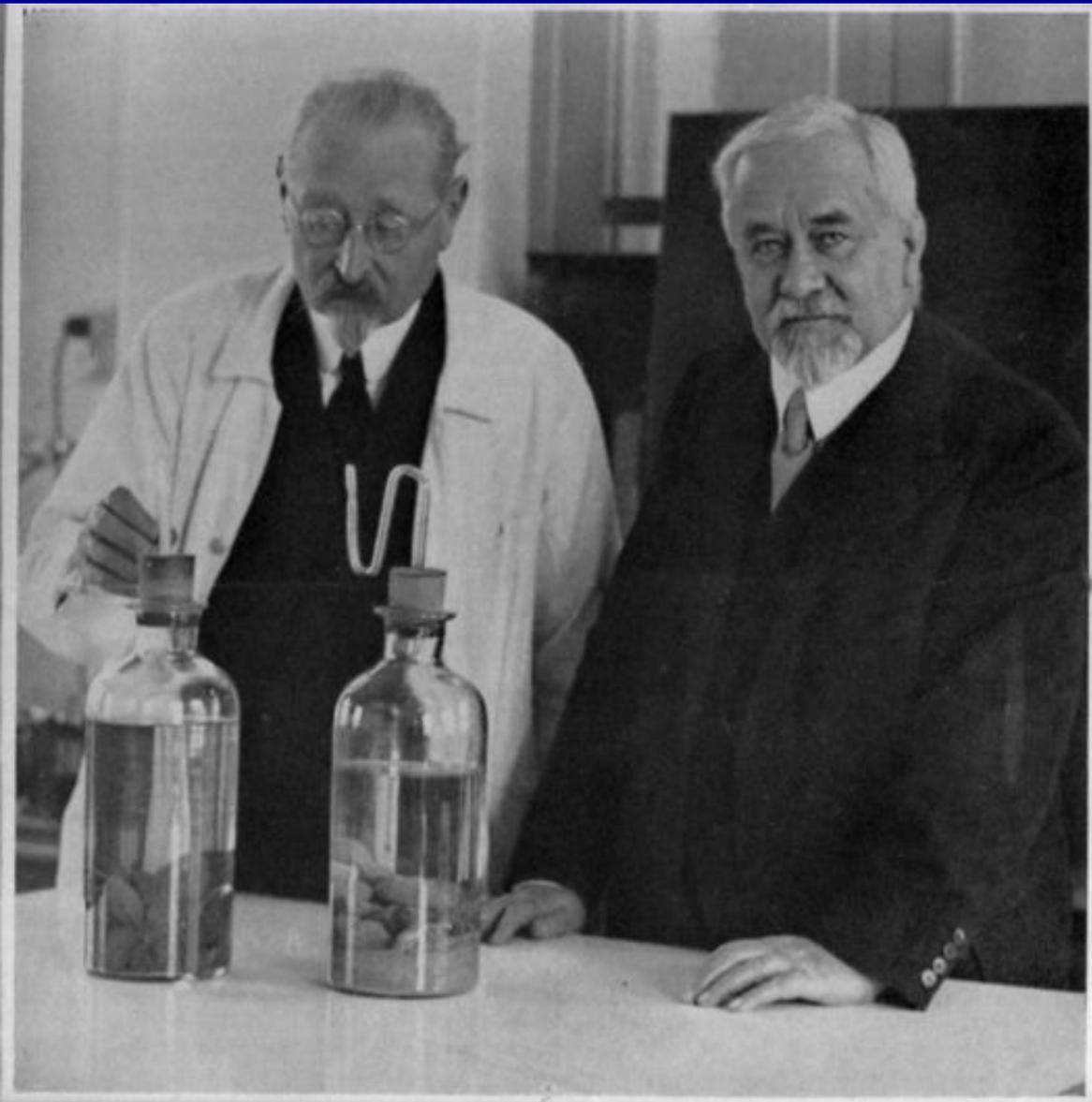
Капреомицин

Офлоксацин

ПАСК

Пиразинамид

# Специфическая профилактика



Camille Guerin

Albert Calmette

Вакцина ВСГ–  
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 ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) нейтрализация - кислота соляная ( $\text{HCl}$ ) концентрированная, промывка дистиллированной водой.

ИЛИ

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

# БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД

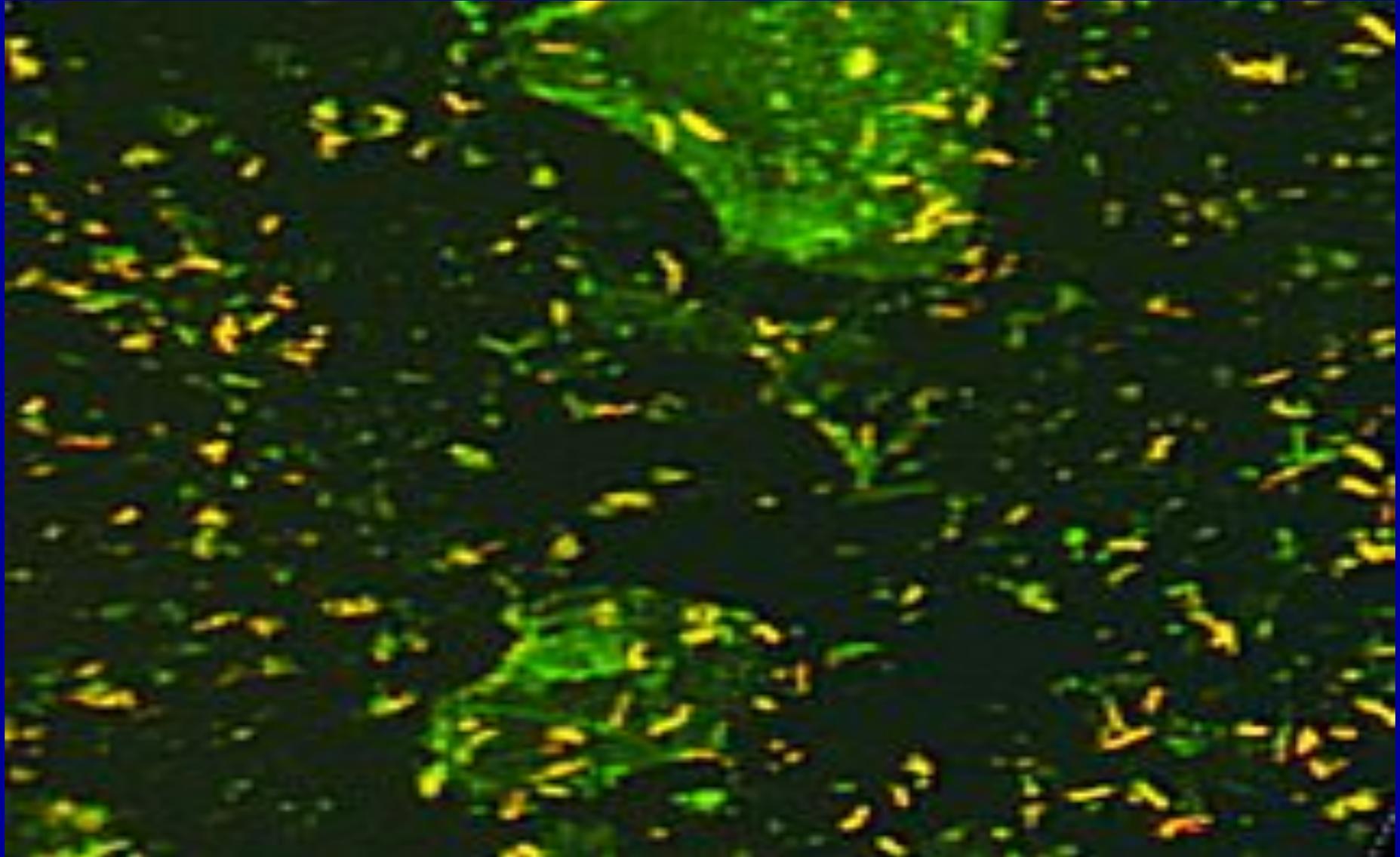
## Окраска по методу Циля - Нильсена

- 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

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

# 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:

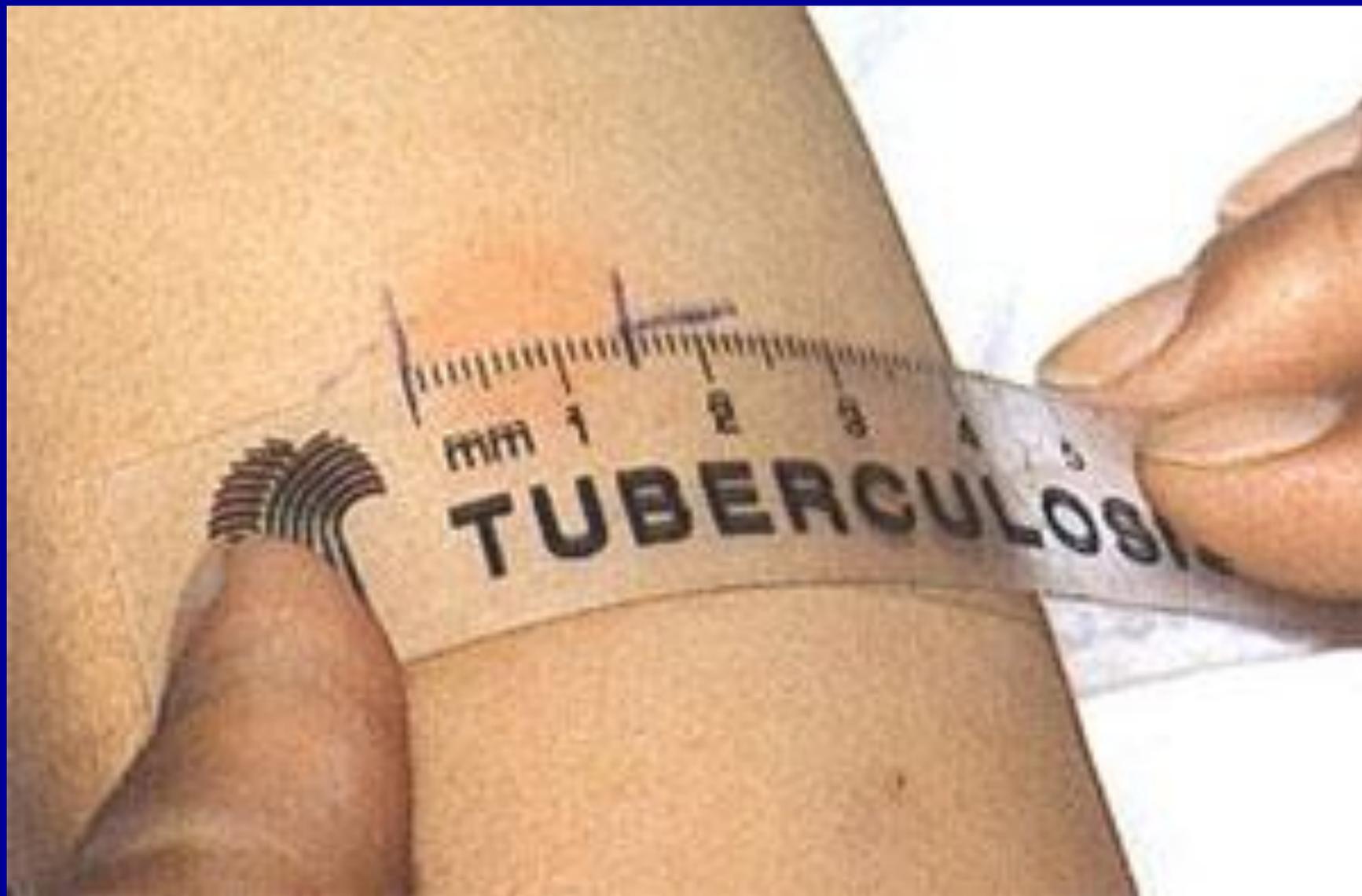
- отбора контингента для ревакцинации БЦЖ, а также перед первичной вакцинацией детей в возрасте 2 месяца и более;
- диагностики туберкулеза, в том числе для раннего выявления начальных и локальных форм туберкулеза у детей и подростков;
- определения инфицирования микобактериями туберкулеза.

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

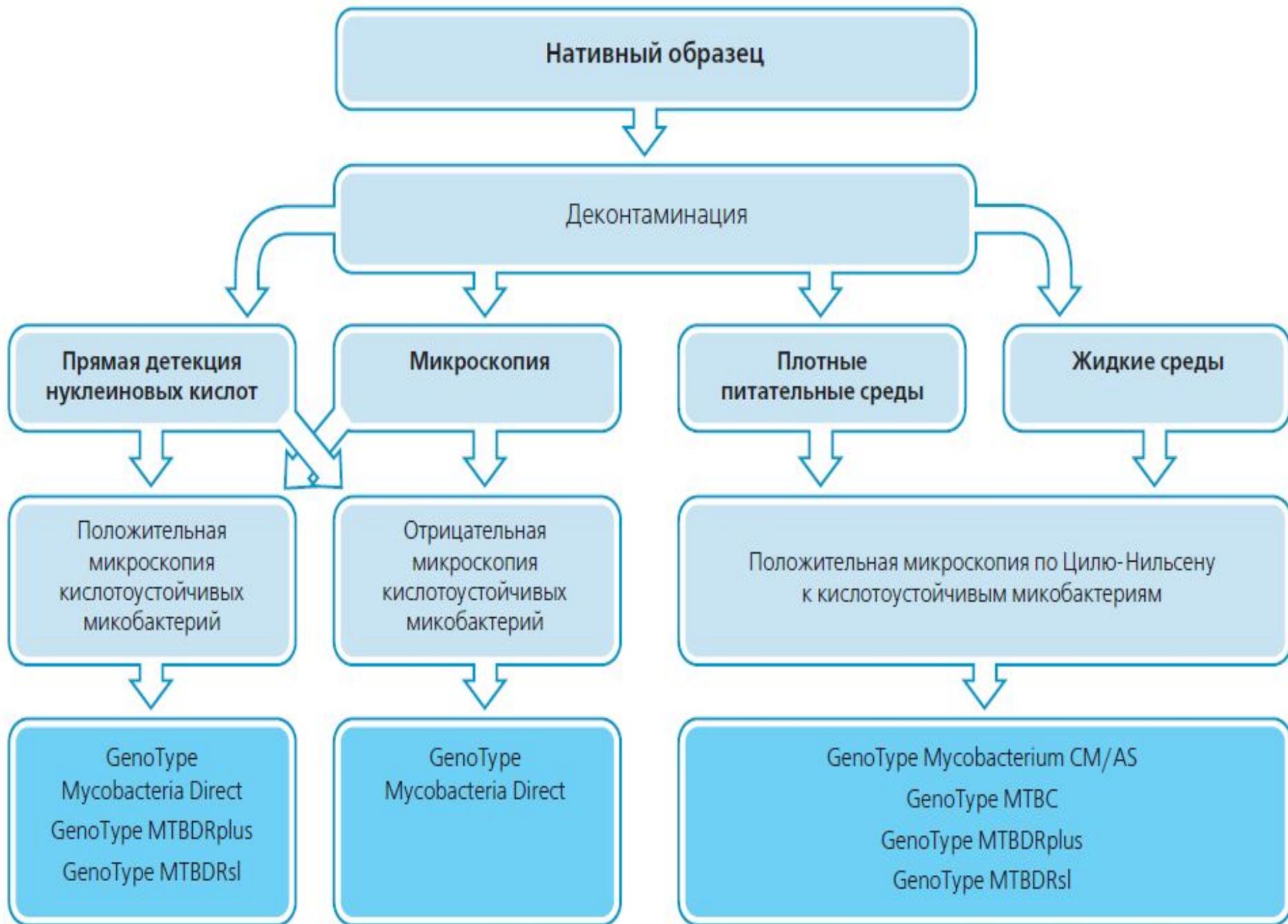
морские свинки – *M. tuberculosis*

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



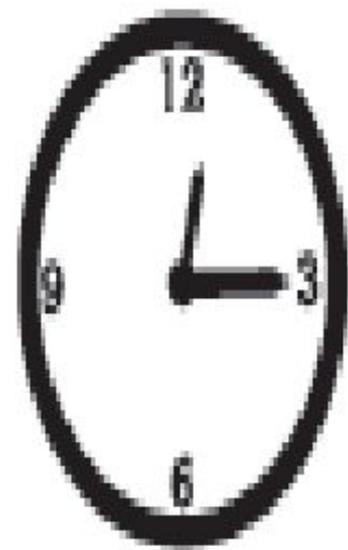
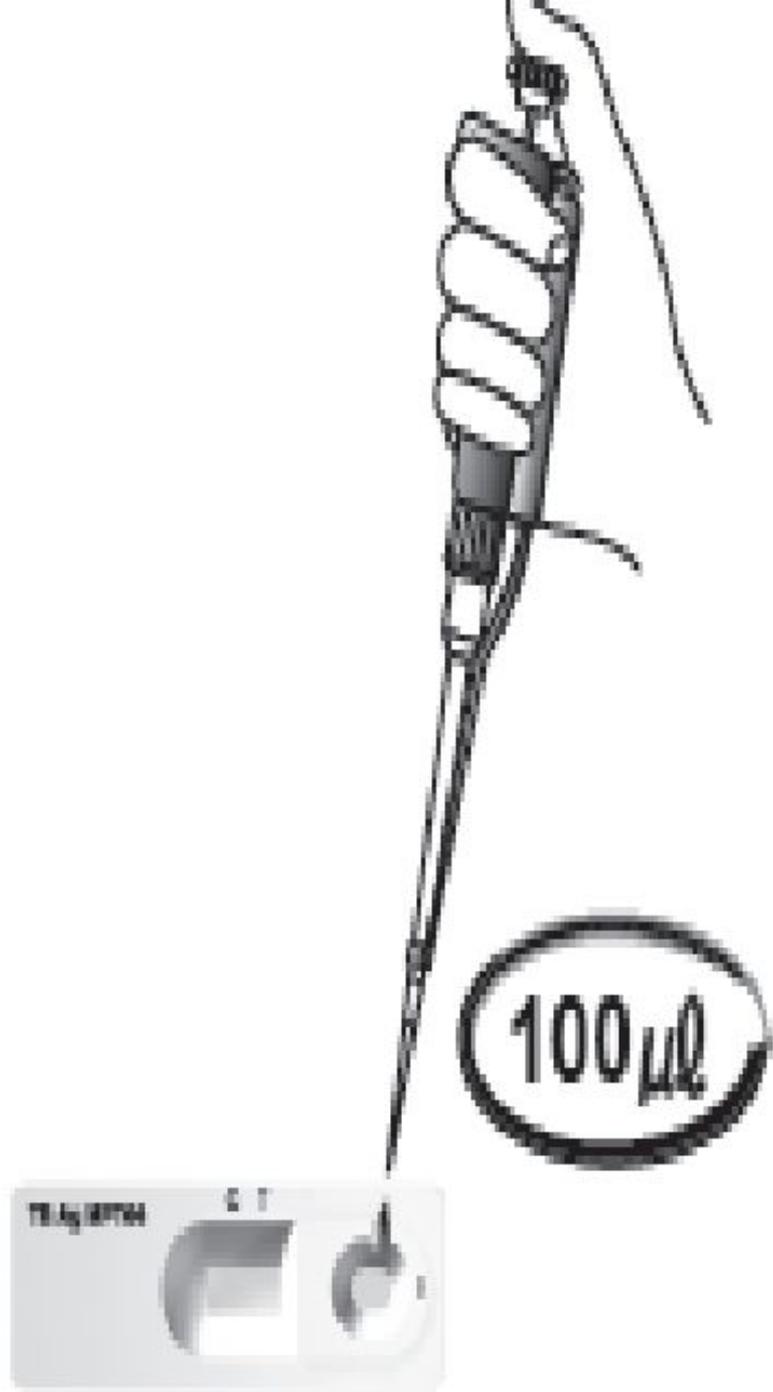
Флуоресценция пробирок MGIT

Для определения роста микобактерий в системе MB/VacT используется технология колориметрического CO<sub>2</sub>-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*





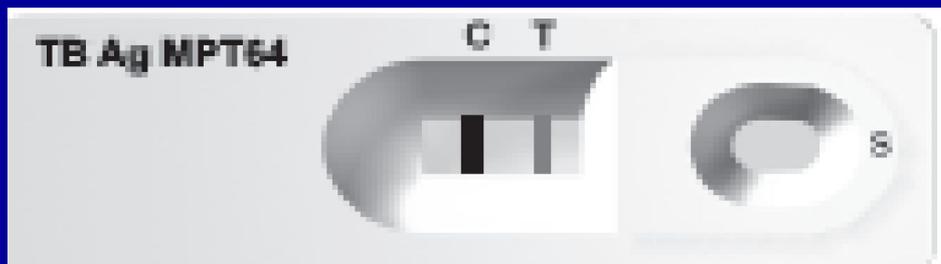
## Отрицательный результат

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

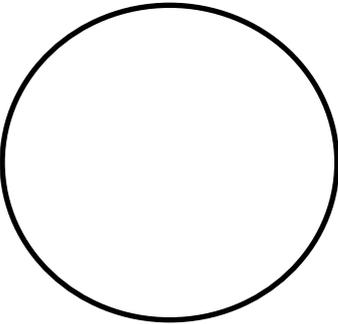
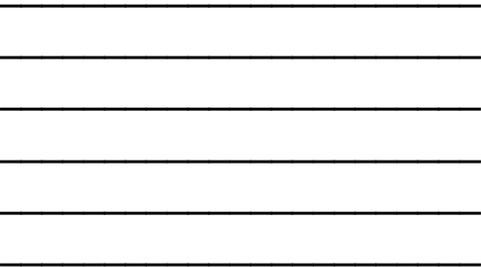


## Положительный результат

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 |  |