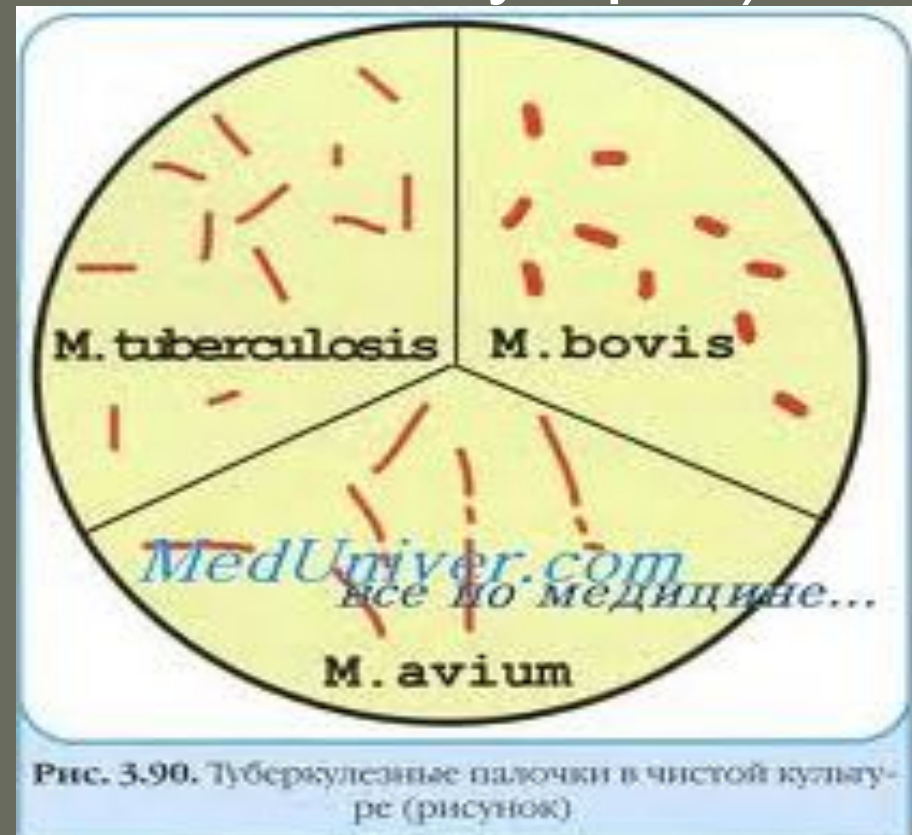


Туберкулёз

Дифтерия

Классификация возбудителя туберкулеза

- Семейство *Mycobacteriaceae*
- Род *Mycobacterium*
- Вид *M. tuberculosis* (tuberculum – бугорок)
- *M. bovis*
- *M. leprae*
- *M. cansassii*
- *M. xenopi*
- *M. ulcerans*
- * - патогенные виды



Характеристика возбудителя туберкулеза

- 21 гр. по Берджи (гр+ палочки, аэроб)
- Неподвижны, спор, капсулы нет
- В клеточной стенке большое количество липидов (миколовая кислота и липоиды – до 40% от сухого веса), что определяет следующие свойства:
- Кислотоустойчивость (5-10% кислоты)
- Уст-ть к щелочам и спирту
- Уст-ть к высушиванию, УФ, дез. Средствам
- Вызывают сенсibilизацию организма

Главный фактор патогенности – токсический гликолипид – **Корд-фактор**

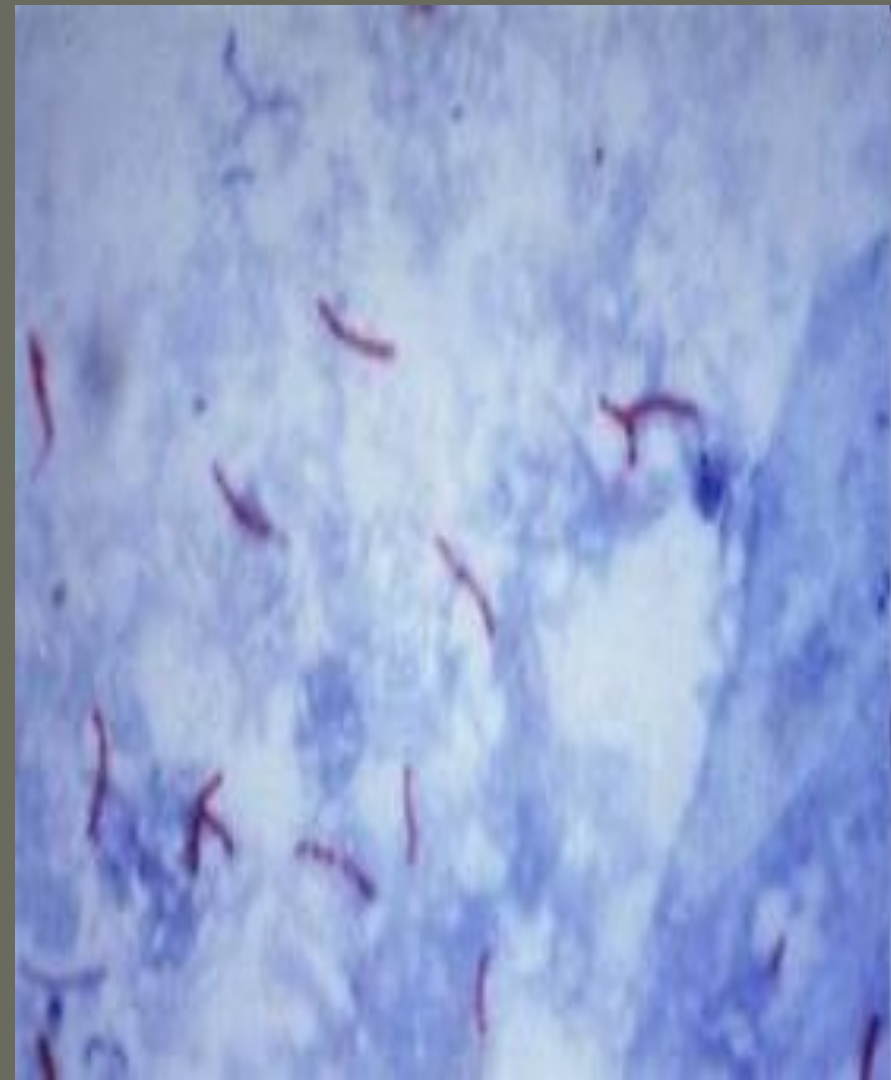
- Располагается на поверхности и в толще клеточной стенки
- По химической природе – полимер: 1 мол-ла дисахарида тригалоэ+ миколовая жирная к-та+миколиновая жирная кислота
- Его функции:
 - Токсическое действие на ткани
 - Защита от фагоцитоза
 - Подавляет миграцию лейкоцитов

Микробиологическая диагностика

- Бактериоскопический
- Экспресс-диагностика (ПЦР, РИФ)
- Бактериологический — основной
- Биологический
- Метод кожно-аллергических проб

Бактериоскопический метод

- Нередко материал содержит мало бактерий туберкулеза и для повышения вероятности их обнаружения используют **методы обогащения: центрифугирование и флотацию**. В первом случае исследуемый материал обрабатывают смесью растворов NaCl и NaOH (гомогенизация), центрифугируют и микроскопируют осадок. Вторым методом 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.
- Окраска по **Циль-Нильсену** - туберкулезные микобактерии визуализируются как ярко-красные, тонкие, изящные, в одиночку или группами, большей частью лежащие вне клеток палочки.
- Окраска **аурамином** — в люмин. микроскопе — M.tub. Золтисто-оранжевого цв, атипичные формы — зеленый.



Микобактерии туберкулеза в препарате после окраски по Циль-Нильсену.

Возбудители туберкулеза в мазке мокроты. На фоне слизи, окрашено в синий цвет, тонкие рубиновые палочки туберкулезных бактерий. Окраска по Цилю-Нильсону.



Флуоресценция туберкулезных бактерий после окраски аурамином.



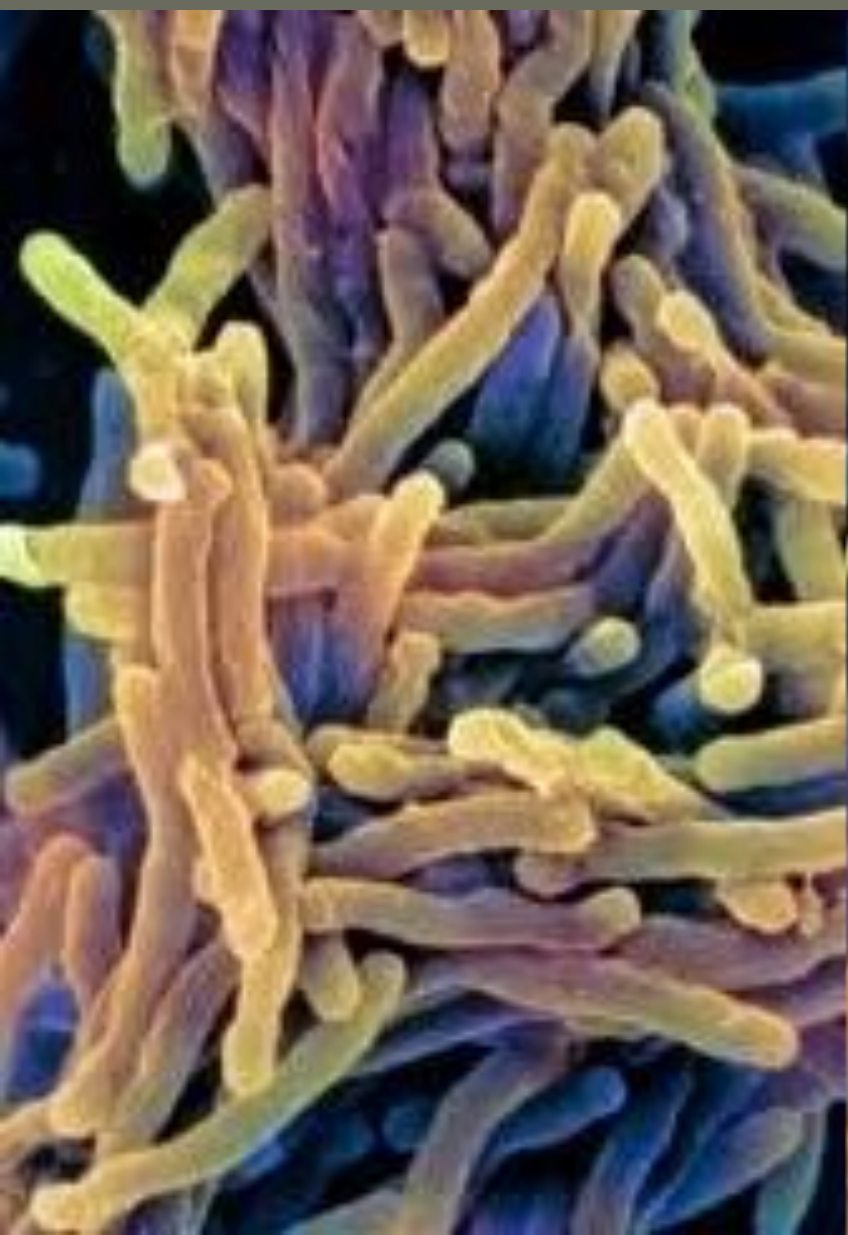
Бактериологический метод

- Для повышения эффективности **выделения возбудителя туберкулеза** и уничтожения контаминирующей микрофлоры применяют методы обогащения или обрабатывают материал 6-12% серной кислотой. Основной недостаток бактериологического метода — длительность получения результата вследствие медленного роста микобактерий (от 2 до 12 нед). В связи с этим разработаны ускоренные микрометоды *выделения возбудителя туберкулеза*.



Рис. 3.92. Микроколонии (корд-фактор) *M. tuberculosis*: палочки, расположены в виде «косы», жгутов

Один из распространённых **методов выделения возбудителя туберкулеза**, метод Прайса, заключается в следующем. 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.



Основные питательные среды

- Среда Левенштейна – Йенсена (аспарагин – источник азота, яйца, картофельная мука, глицерин, малахитовая зелень) – на фоне зеленоватого цвета среды бородавчатые желтого цвета колонии в R-форме, шероховатые, с неровными краями.



- **Среда Финна** – глютамат натрия (источник азота) + малахитовая зелень
- **Среда Новая** – гликокол (источник азота) + малахитовая зелень. Колонии мелкие, морщинистые (манная крупа), шероховатые (R-форма). Петлей снимается вся колония.
- **Среда Сотона** – жидкая. Солевой р-р (цитрат железа + фосфат калия) + аспарагин + глицерин. Рост: поверхностная пленка со специфическим запахом.

Идентификация

- Проба на каталазную активность – чистую культуру возбудителя прогревают 30 мин. при $T=68^{\circ}\text{C}$ и проводят тест (у патогенного возбудителя фермент каталаза термолабилен, а у атипичных видов - термостабилен)
- Ниациновый тест (проба Конно) – *M.tub.*
Синтезирует никотин в среду Сотона. При добавлении цианистого калия к среде образуется ниацин, который при соединении с 5% хлорамином дает **ярко-желтое** окрашивание.

Биологическая проба

- Биологическая проба является по праву наиболее рациональным диагностическим приемом. Материал может быть введен 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 два — четыре месяца. Ускоренная биологическая проба: через регионарный лимфатический узел морской свинки вводят несколько капель наследуемого материала. На 8—10-й день увеличенный лимфатический узел вырезают и исследуют бактериоскопически в препаратах-отпечатках на присутствие туберкулезных микобактерий.

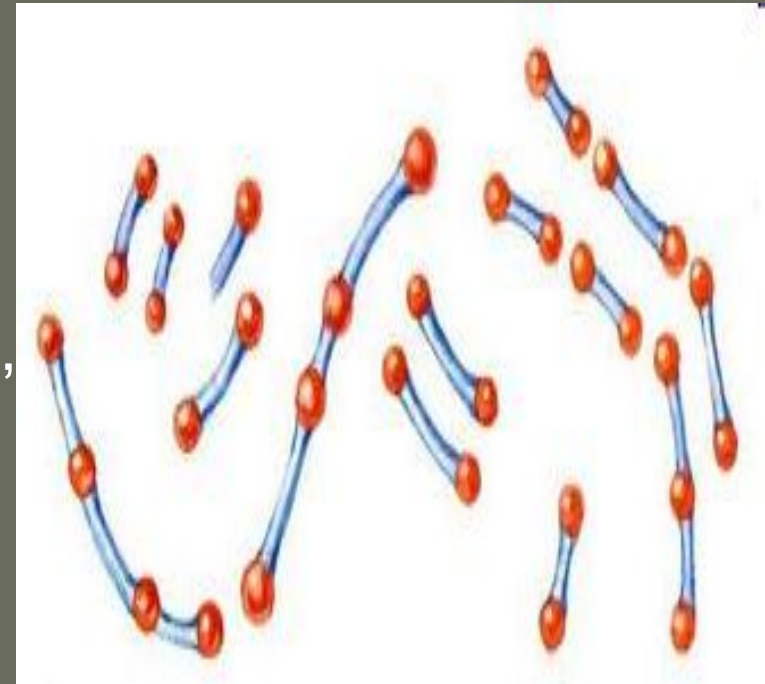
Для выявления аллергии применяют внутрикожную пробу Манту. Для постановки туберкулиновых проб выпускают готовые к употреблению ампулированные растворы PPD (сухой очищенный туберкулин-глицериновый экстракт бульонной культуры микобактерии) с активностью 2 туберкулиновых единиц (2 ТЕ) в 0,1 мл. Внутрикожное введение туберкулина производят на наружной поверхности верхней трети правого плеча (после предварительной обработки кожи 70% спиртом) специальным туберкулиновым или однограммовым шприцем строго внутрикожно. Вводят 0,1 мл PPD; при правильной технике проведения пробы в коже образуется белая папула размером 5—8 мм в диаметре. Проверка реакции при пробе Манту производится через 48—72 часа и считается положительной при наличии инфильтрата не менее 5 мм в диаметре. **Гиперемия, окружающая инфильтрат, не учитывается.**

Положительные и резко положительные реакции (более 16 мм) подтверждают наличие сенсibilизации организма, а отрицательная туберкулиновая реакция (менее 5 мм) может указывать на отсутствие заболевания или на излечение. В случае тяжелого заболевания отрицательная туберкулиновая реакция может свидетельствовать об истощении защитных сил организма.



Классификация и характеристика возбудителя дифтерии

- Род *Corynebacterium* (coryne – булава, bacterium – палочка)
- Вид *C.diphtheriae* (пленка, перепонка)
- Тонкие гр+ палочки, утолщенные на концах за счет зерен волютина
- Неподвижна, спор не образует, есть микрокапсула
- Характерен полиморфизм
- Имеются коринеформные бактерии, не обладающие патогенностью-дифтероиды



Факторы патогенности

- Адгезины – поверхностные структуры липидной и белковой природы (корд-фактор, микрокапсула)
- Ферменты – каталаза, нейраминидаза (усиливает действие токсических белков) , гиалуронидаза (отек), гемолизин, фибринолизин – разрушает фибринозную плёнку в распространение очага.
дермонекротоксин
- Дифтерийный гистотоксин – основной фактор патогенности – блокирует синтез белка в клетках, наиболее снабженных кровью (миокард, периф. и ЦНС, почки и др.)
- Агрессины – подавление фагоцитоза

Схема 9. Микробиологическое исследование при дифтерии

Материал

Слизь из зева и носа, пленки миндалин и носоглотки и др.

1-й этап

Бактериоскопическое исследование

Бактериологическое исследование

Мазки, окраска
корифосфином
(люминесцент-
ная микроско-
пия)

Мазки, окраска
по Граму и
Нейссеру

Посевы на свернутую сыворотку,
кровяной агар или среду Клау-
берга

2-й этап

Ответ

Характер куль-
тур и колоний

Мазки, ок-
раска по
Граму и
Нейссеру

3-й этап

Пересев на свернутую сыворотку
(чистая культура)

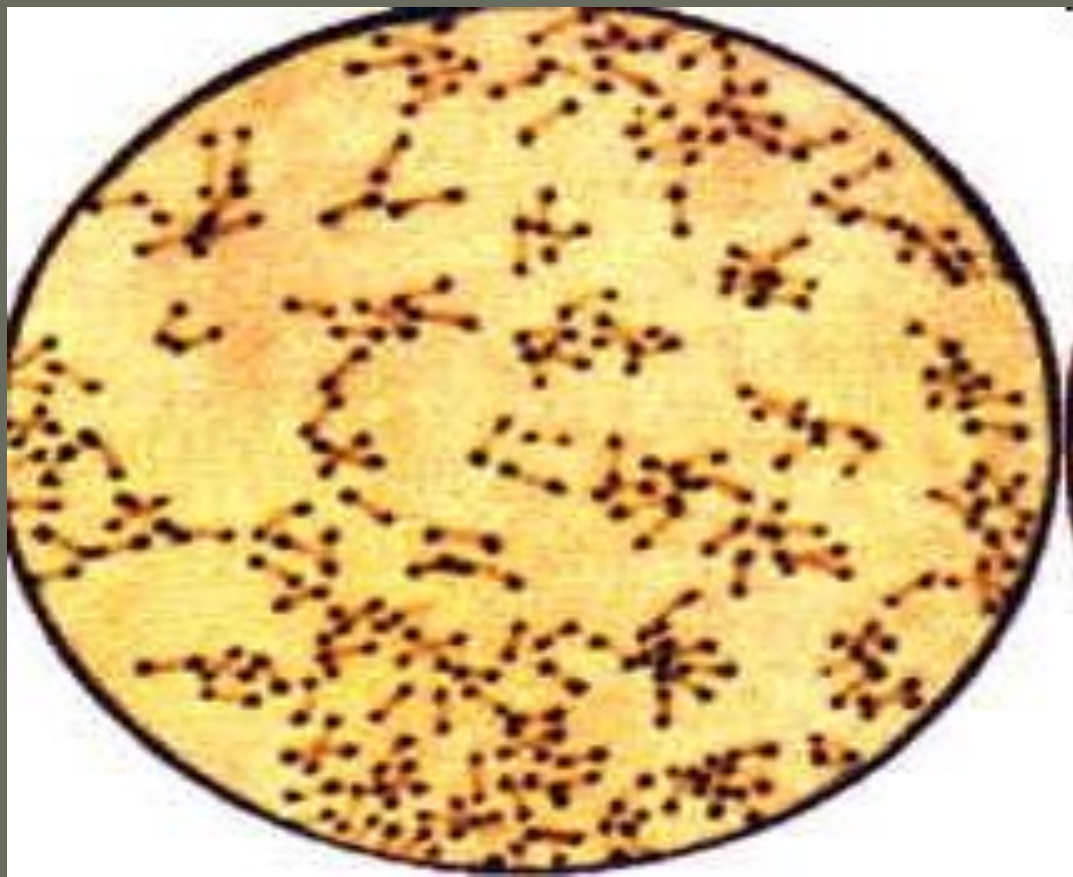
Посев на «пестрый» ряд
Определение токсигенности

Гемолиз
→ Проба на цис-
тиназу
→ Проба на уре-
азу

Реакция агглютинации

Окончательный ответ

Окраска по Нейссеру. Для дифтерийной палочки характерно наличие полярно расположенных зерен волютина и положение в виде буквы «V». Дифтероиды и псевдодифтерийная палочка не имеют зерен волютина или содержат их не на концах, а по длине палочки. Кроме того, сами бактерии располагаются в виде «частокола»



Биовары

- У этого возбудителя выделяют биотипы - *gravis*, *mitis*, *intermedius*, отличающиеся по морфологии, антигенным и биохимическим свойствам, тяжести заболеваний у человека. Тип *gravis* чаще вызывает вспышки и более тяжелое течение, для него характерны крупные с неровными краями и радиальной исчерченностью колонии в виде маргаритки (R- формы). Тип *mitis* вызывает преимущественно легкие спорадические заболевания, образует на плотных средах мелкие гладкие колонии с ровными краями (S- формы). Тип *intermedius* занимает промежуточное положение, образует на плотных средах переходные по характеристикам RS- формы, однако еще более мелкие. На жидких средах вызывают помутнение сред, образуют крошковидный осадок.

Теллуритовая среда Клауберга (питательный агар с теллуритом натрия, глицерином и дефибрированной кровью). На ней задерживается рост кокков и другой микрофлоры зева, что способствует размножению бактерий дифтерии.



Идентификация

- Способность бактерий дифтерии продуцировать **токсин** устанавливают в **реакции преципитации в агаре**. Для этого в чашку Петри с питательным агаром, содержащим 15—20% лошадиной сыворотки, 0,3% мальтозы и 0,03% цистина, кладут полоску фильтровальной бумаги (1,5 X 6 см), пропитанную антитоксической противодифтерийной сывороткой, содержащей 5000 АЕ/мл. Чашку подсушивают при 37°C в течение 30 мин и засевают исследуемые культуры в виде перпендикулярных к бумаге штрихов на расстоянии 0,6—0,8 см от края бумаги. В качестве контроля используют заведомо токсигенную культуру. Посевы инкубируют при 37°C до следующего дня. При размножении токсигенной культуры в месте соединения токсина с антитоксином в плотной питательной среде образуется преципитат в виде белых линий — «усов»

Проба ПИЗУ

- Для определения **цистиназы** в столбик питательного агара с циститом уколом засевают исследуемую культуру. Посевы инкубируют при 37° С до следующего дня. Истинные дифтерийные палочки вызывают **почернение** среды по ходу посева (в результате образования сульфида свинца), вокруг которого появляется зона **коричневого** цвета, а на глубине 1 см от поверхности в среде образуется коричневое «облачко».

Проба Закса

- Для определения **уреазы** готовят спиртовой раствор мочевины и раствор индикатора — фенолового красного, которые смешивают перед употреблением в соотношении 1 • 9 и разливают по 1—2 мл в агглютинационные пробирки. Затем одну петлю исследуемых бактерий вносят и растирают по стенке пробирки. После 20—30-минутной инкубации при 37°С наблюдают расщепление мочевины уреазой, в результате чего среда приобретает **красный цвет**.