**Занятие 21**

**Микробиологическая диагностика инфекций центральной нервной системы, мочеполовой системы и раневых инфекций**

**Патогенез и клинические формы менингита. *Менингит –*** воспаление мозговых оболочек головного и (или) спинного мозга. В зависимости от того, какая оболочка головного мозга вовлечена в процесс, его делят на лептоменингит (воспаление мягкой и паутинной оболочек), арахноидит (изолированное воспаление паутинной оболочки), пахименингит (воспаление твердой оболочки). При менингите возникают воспалительные изменения не только в оболочках головного и спинного мозга, но и в эпендиме мозговых желудочков и сосудистых оболочках, что сопровождается гиперпродукцией ликвора и повышением давления. При менингите отмечаются изменения состава спинномозговой жидкости: изменение клеточного состава - наблюдается увеличение количества полиморфноядерных лейкоцитов, уменьшение количества глюкозы и увеличение количества белка.

**Микробиология менингитов.** Менингит является полиэтиологическим заболеванием, которое может быть вызвано большинством микроорганизмов.Менингит часто вызывается бактериями. Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae являются основными возбудителями бактериального менингита у детей.Иногда обнаруживают также Staphylococcus aureus, S.epidermidis, Streptococcus pyogenes, E.coli, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Listeria monocytogenes, Brucella, а также Candida и другие менингиты грибковой этиологии.

**Клинические формы и микробиология менингита**

* *первичные и вторичные менингиты*
* *Острые и хронические менингиты.* Хронические менингиты в основном вызываются *M.tubеrculоsis* и грибами.
* Поскольку большинство бактериальных менингитов носит гнойный характер, иногда их также называют гнойными менингитами.
* В некоторых случаях менингита трудно обнаружить микроорганизмы в спинномозговой жидкости или они не обнаруживаются вовсе. Такие случаи характеризуются как асептический менингит. Асептический менингит в основном вызывается вирусами, но менингит, вызванный Mycobacterium tuberculosis, Leptospira, Cryptococcus и Tochoplasma gondii, также называют асептическим менингитом.
* При вовлечении в воспалительный процесс подменингеальных структур головного мозга — ствола головного мозга процесс приобретает характер менингоэнцефалита. Воспаление ствола головного мозга называется энцефалитом, а воспаление спинного мозга — миелитом. Энцефалиты, миелиты, а также энцефаломиелиты в основном вызываются вирусами.
* Абсцессы головного мозга вызываются анаэробными стрептококками, Bacteroidetes, а посттравматические абсцессы чаще вызываются стафилококками и стрептококками. В меньшем количестве случаев также наблюдаются абсцессы, вызванные H. influenzae, A. israelii, N. asteroides и амебой.

**Бактериальные (гнойные) менингиты.** Клиническая картина всех форм бактериального (гнойного) менингита характеризуется прежде всего высокой лихорадкой и менингеальным синдромом.N.meningitidis, S.pneumoniae и H.influenzae являются основными возбудителями менингита.E.coli является основным этиологическим агентом менингита среди бактерий семейства Enterobacteriaceae.Встречаются также менингиты, вызванные Staphylococcus aureus, S.epidermidis, Streptococcus pyogenes, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Listeria monocytogenes, Brucella и др.

**Вирусные менингиты и энцефалиты.** Хотя вирусный менингит и энцефалит проявляются симптомами, сходными с гнойным менингитом, они обычно проявляются более легкими клиническими симптомами. Изменения в спинномозговой жидкости выражены слабо по сравнению с гнойным менингитом, бактериологические исследования обычно дают отрицательный результат (асептический менингит). При вирусном менингите заболевание проявляется менингоэнцефалитом, так как в процесс нередко вовлекается мозговая ткань.Вирусные менингиты и энцефалиты чаще всего вызываются энтеровирусами (полиовирус, вирус Коксаки и вирус ECHO) и вирусом эпидемического паротита. Иногда это может быть вызвано герпесвирусами, в том числе цитомегаловирусом, корью, бешенством и арбовирусами.

**Грибковый менингит.** Системные эндемические микозы, как и оппортунистические микозы, могут сопровождаться поражением ЦНС.В последнее время наблюдается возрастающая роль грибов Candida, особенно C. albicans, в этиологии гнойных менингитов.Криптококковый менингит наблюдается примерно у 5-8% больных СПИДом. При риноцеребральном мукоромикозе, вызванном грибами семейства Zygomycota (Mucоr, Rhizоrus, Аbsidiа, Rhizоmucоr), Mucorales, спорангиоспоры проникают через полость носа и трансформируются в гифы, проникающие в кровеносные сосуды, вызывая тромбоз, инфаркт и некроз.

**Диагностика заболеваний ЦНС**

* Бактериальные менингиты – H.influenzae, N.meningitidis,S. pneumoniae, S.aureus, L. monocytogenes, S. pyogenes, M.tuberculosis.
* СМЖ отбирают люмбальной пункцией с соблюдением мер асептики, в количестве 1-2 мл, центрифугируют и из осадка готовят мазки
* Микроскопирование СМЖ по Цилю -Нильсену, Граму, Романовскому-Гимзе, окраска тушью для выявления капсулы

**Бактериологический метод**

* Проводят посев на 5% кровяной агар, сывороточный, шоколадный агар, тиогликолевую среду. Чашки инкубируют при повышенной концентрации CO2 (для патогенных нейссерий, пневмококков, листерий).
* Выросшие колонии идентифицируют и определяют чувствительность к антибиотикам.
* СМЖ в норме стерильна, поэтому обнаружение любого микроорганизма расценивается как положительный ответ.

**Вирусные менингиты и энцефалиты.** Основные возбудители – энтеровирусы (Коксаки, ЕСНО, полиовирусы), вирус эпидемического паротита, герпесвирусы, ЦМВ, вирусы бешенства, арбовирусы.

**Вирусологический метод**

* При полиомиелите для выделения вируса наиболее пригодны пробы фекалий, т.к. его редко обнаруживают в СМЖ.
* Для выделения вируса используется линия клеток ***RD*** и ***L20B*** в которых они вызывают характерный ЦПЭ (образование бляшек), после появления которого вирус направляют на идентификацию в РН с антителами к трем основным типам полиовируса

**Герпесвирусные менингиты и энцефалиты**

* Вирус выделяют путем заражения культур клеток HeLa и Hep-2, эмбриональные фибробласты, куриных эмбрионов
* ЦПД - характерное округление клеток, внутриядерные включения и образование гигантских многоядерных клеток, тельца Липшютца, мелкие плотные бляшки на ХАО
* Идентификация вируса – РИФ, ИФА, РН

**Менингиты, вызванные грибами**

* Основные возбудители - *Cryptococcus neoformans, Coccidioides immitis*
* Проникают в ЦНС путем гематогенного диссеминирования; материал для исследования СМЖ из очагов поражения.
* Признаком криптококкового менингита служат почкующиеся дрожжеподобные клетки с капсулой

**МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ**

* Микроскопический - выявление капсулы по методу Бурри-Гинса (*C. neoformans)*
* Культуральный – выделение чистой культуры на сахарном агаре, среде Сабуро, пивном сусле с антибиотиками, идентификация (C. neoformans на среде Христенсена)
* Серологический – обнаружение капсульных антигенов возбудителя при помощи латекс-агглютинации, РП, РИД

**Основы микробиологии и диагностики заболеваний мочеполовой системы**

**Мочевые пути: нормальная микрофлора.** К органам мочевыделительной системы относятся почки, почечная лоханка, мочеточники, мочевой пузырь и мочеиспускательный канал.В норме почки, почечные лоханки, мочеточники и мочевой пузырь стерильны, микроорганизмы здесь не обнаруживаются.Однако в дистальной части мочевого канала- в нижней трети могут обнаруживаться коагулаза-негативные стафилококки зеленящие и негемолитические стрептококки, лактобактерии, непатогенные бактерии родов Cоrynеbаctеrium и Nеissеriа, грам негативные аэробные бактерии, некоторые представители семейства Еntеrоbаctеriаcеае, анаэробные кокки, род Prоpiоnоbаctеrium, грамотрицательные анаэробные кокки и бациллы, комменсальные виды родов Mycobacterium и Mycoplasma, Candida и других родов дрожжеподобных грибов.

**Микрофлора представлена:** *Prevotella, Porfiromonas, S.epidermidis, Corynebacterium, M.smegmatis, Enterococcus*. Инфекции могут развиваться как эндогенно так и экзогенно.

Основные возбудители: ***E.coli, S.saprophyticus, E. faecales, P.aeruginosa, M.hominis, Proteus, Candida, Serratia spp., K.oxytoca, K.pneumoniae* *(***проникают гематогенно, при травмах органов мочеполовой системы, восходящим путем через уретру, в результате медицинских манипуляций)

**Клинические формы инфекций мочевыводящих путей.** Клиническое проявление патологических процессов в мочевыводящих путях зависит от локализации процесса. При **пиелонефрите** наблюдаются лихорадка, гематурия, лейкоцитурия, иногда протеинурия, дизурические явления. При **цистите** отмечаются боли в паховой области, часто болезненные, жжение при мочеиспускании и преходящая гематурия, наблюдается изменение цвета, прозрачности и запаха мочи и др. Дизурия при уретрите, припухлость в уретре, боли, дизурические симптомы и др. считается основным признаком. Иногда симптомы уретрита могут наблюдаться при отсутствии клинически значимой бактериурии. Это состояние, которое наблюдается у большего числа женщин, особенно у сексуально активных женщин, называется острым уретральным синдромом.

**Инфекции мочевыводящих путей**

* Гломерулонефрит
* Пиелонефрит
* Пиелит
* Околопочечные абсцессы
* Осложнения почечнокаменной болезни
* Цистит
* Простатит
* Уретрит
* Уретральная лихорадка, уросепсис

**Микробиология инфекций мочевыводящих путей.** Количество микроорганизмов в моче практически здоровых людей обычно не превышает 104 в 1 мл.Число микроорганизмов в 1 мл мочи, превышающее 105, рассматривается как показатель инфекции мочевыводящих путей - клинически значимой бактериурии. Когда это состояние не сопровождается клиническими признаками, его называют бессимптомной бактериурией.Иногда многие заболевания и патологические процессы, не связанные с мочевыводящими путями, а также манипуляции могут сопровождаться транзиторной бактериурией. При отсутствии патологических процессов в мочевыводящих путях бактериурия обычно носит вторичный характер и при последующих обследованиях не выявляется.

**Методы диагностики**

* Микроскопический метод окраска по Граму, Цилю-Нильсену
* Бактериологический метод определение степени бактериурии, выделение и идентификация чистой культуры, постановка антибиотикограммы

**Микробиологическое исследование мочи**

* Микробиологическое исследование мочи является одним из основных методов диагностики инфекций мочевыводящих путей.
* Для исследования берут среднюю часть утренней мочи в стерильную стеклянную посуду. Если нет возможности провести исследование вовремя, моча может храниться в холодильнике при температуре +4 С в течение суток.
* Если больной не может свободно помочиться, то моча для исследования берется с помощью катетера или путем пункции мочевого пузыря из области над ложечкой.

**Микробиологическая диагностика инфекций мочевыводящих путей**

* **Взятие материала – средней порции мочи (3-5 мл).**
* **Обследования необходимо проводить в течение 1-2 часов с условием хранения материала при комнатной t или 24 ч в холодильнике.**

***Микроскопическое исследование.*** Микроскопия осадка мочи, полученного после центрифугирования, показывает наличие микроорганизмов, признаков воспаления, солей и др.

* Из полученного осадка готовят мазок и обычно подвергают микроскопии после окрашивания по Граму и Гимзе. Однако микроскопия осадка мочи не позволяет определить степень бактериурии.
* Для быстрого подсчета количества бактерий в образце мочи готовят мазок из нецентрифугированной мочи и подвергают микроскопии. Обнаружение одной бактериальной клетки или одного лейкоцита в каждом поле зрения эквивалентно клинически значимой бактериурии.

**Оценка бактериурии**

* Для оценки бактериурии используют петлю самого ***большого размера (калибра).***
* После тщательного перемешивания исследуемой мочи ее засевают на плотную питательную среду петлей определенной вместимости. Для этого петля погружается в исследуемый материал в вертикальном направлении. Материал первоначально высевают на поверхность питательной среды в чашке Петри по прямой линии по диаметру чашки, а затем распределяют с помощью линий, перпендикулярных этой линии.
* После инкубации подсчитывают развившиеся колонии и определяют степень бактериурии с учетом емкости петли. Например, если вместимость петли 0,001 мл, то количество бактерий в 1 мл мочи рассчитывают путем умножения числа колоний на 1000.
* Полученную чистую культуру идентифицируют и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.
* ***Обнаружение в исследуемой моче более двух видов микроорганизмов свидетельствует о том, что образец был взят неправильно, в таких случаях исследование повторяют.***

**Контаминация мочи ˂ 1000 КОЕ/мл**

**Сомнительный результат -10 000 КОЕ/мл**

**(требуется повтор анализа)**

**Инфекционный процесс - 100 000 и выше КОЕ/мл**

 **Основы микробиологии и диагностики венерических заболеваний**

Большинство возбудителей венерических заболеваний у мужчин попадают в организм через слизистую оболочку уретры.В таких случаях развивается **уретрит**. Основными возбудителями уретрита являются Neisseria gonorrhoeae, Trichomonas vaginalis, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureoplasma urealyticum. Уретрит называют по названию возбудителя. Например, гонококковый уретрит, хламидийный уретрит и др. Термин негонококковый уретрит также используется для различения других уретритов, не связанных с гонококками. ***Простатит*** – воспаление предстательной железы может быть неинфекционного или инфекционного происхождения. Инфекционные агенты попадают в предстательную железу обычно через мочеиспускательный канал. В ряде случаев возбудителями простатита могут быть возбудители инфекций мочевыводящих путей, особенно энтеробактерии (кишечная палочка, клебсиелла, род Proteus и др.), а также P. aeruginosa, энтерококки, S. epidermidis, грибы Candida. При венерических заболеваниях возбудители попадают в предстательную железу обычно восходящим путем. При уретрите возбудители могут попадать в заднюю уретру, в том числе в предстательную железу, и повреждать ее. Так, простатиты могут быть вызваны, микроорганизмами, передающимися половым путем, такими как гонококки, трихомонады, хламидии и др..

**Инфекции женских половых органов** можно условно разделить на две группы: болезни, не передающиеся половым путем, и болезни, передающиеся преимущественно половым путем. Иногда не удается обнаружить такие большие различия между этими инфекциями.

**Вульвовагинит** — воспалительное заболевание вульвы и половых путей, часто протекающее вместе. Иногда его вызывает факультативная микрофлора вульвы и половых путей. Хотя Gardnerella vaginalis является основным возбудителем бактериального вагиноза, ряд анаэробных бактерий рода Mobilincus играют синергетическую роль в развитии патологии. Возбудителями вульвовагинита, вызванного инфекциями, передающимися половым путем, могут быть гонококки, Т. vaginalis, С. trachomatis, М. hominis, U. urealyticum. Во всех случаях инфекция может распространиться восходящим путем и вызвать воспаление шейки матки - цервицит, воспаление канала шейки матки - эндоцервицит, воспаление слизистой оболочки матки - эндометрит, воспаление маточных труб - сальпингит - оофорит.

Возбудители некоторых венерических заболеваний могут проникать непосредственно через кожу и образовывать везикулярные поражения и поверхностные язвы. Везикулезные поражения в основном вызываются вирусами, в основном вирусом простого герпеса. Инфекции SHV типа II также известны как генитальный герпес, поскольку они передаются половым путем. Инфекционное поражение кожи половых органов иногда может проявляться в виде поверхностных ран и эрозий. При сифилисе на поверхности кожи, куда проникает бледная трепонема, образуется твердый шанкр. Повреждения, вызванные Haemophilus ducrei на поверхности кожи, имеют вид мягкого шанкра. При редком заболевании под названием донованоз (вызывается Klebsiella granulomatis) наблюдаются красные безгнойные раны с белыми краями. При половых инфекциях иногда наблюдается разрастание паховых лимфатических узлов (бубонов). Это характерно для первичного сифилиса, генитального герпеса, венерической лимфогранулемы и легкого шанкра. Генерализованная лимфаденопатия также характерна для СПИДа.

 **Принципы диагностики венерических заболеваний**

***Материалы для исследования и правила их сбора.*** При уретрите материал для исследования берут из уретры. Материал из уретры следует брать утром, до мочеиспускания. В зависимости от количества отделяемого из уретры его сбор проводят разными методами. Если выделения обильные, материал можно взять бактериологической петлей или специальным ватным тампоном. Если выделений мало, необходимо брать соскоб со слизистой оболочки уретры, а не само уретральное отделяемое, особенно при исследовании на хламидии и другие внутриклеточные микроорганизмы. Взятый таким образом материал содержит большое количество клеток эпителия, что необходимо для микроскопического исследования в указанных случаях. Для этой цели можно использовать и другие цитологические щетки (цитощетки). Материал из влагалища и вульвы собтрают стерильным ватным тампоном. Гинекологические зеркала применяют для усиления эффекта визуализации при сбора материала из родовых путей, а также получают жидкость, скопившуюся в заднем своде родовых путей. С целью обнаружения внутриклеточных микроорганизмов материал берут со слизистой оболочки соскобом ватным тампоном. Сначала удаляют слизь из цервикального канала - эндоцервикального канала стерильным тампоном, затем в цервикальный канал вводят специальный (уретральный) тампон, вращают, касаясь его стенок, и выводят.

***Правила проведения микробиологических исследований.***

* Из выделений, взятых из уретры, готовят мазок, который после окрашивания по Граму и метиленовым синим подвергают микроскопии. Этим методом часто ставится диагноз гонококкового и трихомонадного уретрита. Установить диагноз бактериального вагиноза можно путем определения «ключевых клеток» путем микроскопии мазков, приготовленных из материала, взятого из половых путей и окрашенных по Граму.
* Антигены Ch.trachomatis, M.hominis/genitalium и U.urealyticum/parvum можно обнаружить в мазках с помощью ИФР. При проведении исследования методом ИФР материал (богатый эпителиальными клетками), взятый тампоном, распределяют на предметном стекле и фиксируют ацетоном. После проработки специфическим антителом, конъюгированным с флуорохромом, препарат тщательно промывают буферным раствором, высушивают и исследуют под люминесцентным микроскопом. Все средства и реактивы, необходимые для указанной процедуры, входят в состав специальных тест-систем для определения хламидийных антигенов и имеются в продаже.
* В последнее время для выявления указанных микроорганизмов все чаще применяют ПЦР, культивационные и микротест-системы.
* **Микробиологическое исследование** секрета предстательной железы, эякулята, а также мочи проводят при простатите и везикулите. Секрет предстательной железы обычно получают в результате массажа предстательной железы после мочеиспускания. Мазки секрета могут быть приготовлены и подвергнуты микроскопии. Можно приготовить нативный препарат. Эякулят для исследования получают искусственным путем. При микробиологических исследованиях готовят препарат раздавленная капля и засевают на питательные среды. Также рекомендуется исследование эякулята при эпидидимите и орхите.Для того чтобы уточнить, действительно ли патологический материал находится в предстательной железе, рекомендуется провести исследование мочи, взятой до и после массажа предстательной железы.
* **Культуральные исследования**. выделений и аспиратов из уретры, мочеиспускательного канала, шеки матки, эякулят, секрет предстательной железы, моча, могут проводиться путем посева на соответствующие питательные среды.
* ***Серологические тесты.*** В диагностике венерических заболеваний применяют также реакции, основанные на определении специфических антител в сыворотке крови.
* При сифилисе VDRL и RPR-тесты позволяют выявить неспецифические – нетрепонемные антитела. С помощью РПГА и ИФР можно обнаружить только специфические антитрепонемные антитела.
* ИФА используется в диагностике герпеса и СMV-инфекций. Раздельное определение антител IgM и IgG позволяет отличить перенесенные и текущие инфекции.
* В диагностике инфекций, передающихся половым путем, ИФР имеет важное значение при выявлении возбудителей и их антигенов в патологическом материале.

**Принципы диагностики инфекционных заболеваний, передающихся трансплацентарно.** В ряде случаев в микробиологической практике необходимо определение диагноза трансплацентарных инфекций, поражающих плод, вызывающих его гибель или аборты.Некоторые из этих заболеваний передаются половым путем, и в их диагностике определенное значение имеет исследование мертворожденных, плаценты и плодной жидкости. К трансплацентарным заболеваниям относятся листериоз, токсоплазмоз, краснуха, цитомегаловирус, генитальный герпес, парвовирусные инфекции, сифилис, СПИД и др. В настоящее время коммерчески доступны реагенты для определения специфических IgM-антител для выявления TORCH-инфекций (токсоплазмоза, краснухи, цитомегаловируса, герпеса). Обнаружение IgM в сыворотке крови новорожденных при указанных инфекциях свидетельствует об инфицировании новорожденного. Таким образом, М-антитела не передаются трансплацентарно плоду.

**Микробиологическая диагностика раневых инфекций**

Раневые инфекции развиваются в результате травмы слизистых оболочек и кожных покровов. Проявление раневых инфекций зависит от характера и локализации повреждений, их размера, состояния макроорганизма, свойств инфекционного агента-возбудителя. Раневые инфекции могут развиваться в результате различных медицинских манипуляций, особенно после хирургических вмешательств. Инфекция характеризуется образованием гнойного или серозно-гнойного экссудата. Имеет различную локализацию и полиэтиологична Может вызваться как грам(-) так и грам (+) палочками, кокками, анаэробами и грибами

 **Микробиологическая диагностика раневых инфекций
(материалы исследования)**

* Раневое отделяемое берут стерильными тампонами из глубины раны.
* Экссудат забирает врач, соблюдая правила асептики , пункцией раневых полостей и отсасывает содержимое с помощью шприца. Затем переносят в анаэробный транспортный флакон и отправляют в лабораторию.
* При абсцессе делают пункцию. При наличии в ране дренажа отделяемое берут стерильным шприцем, содержимое которого переносится с соблюдением правил асептики в стерильную пробирку или анаэробный транспортный флакон.
* Удаляемые при обработке раны кусочки тканей и инородные тела отправляют в лабораторию.

**Микробиологическая диагностика раневых инфекций
(микроскопический метод)**

* Готовят мазки из раневого отделяемого ,взятого стерильным тампоном.
* Прозрачный экссудат(плевральный выпот , синовиальная жидкость, асцитическая жидкость и др.) из раневой полости центрифугируют и осадок используют для посева и приготовления мазков.
* При гнойном характере экссудата готовят тонкие мазки и окрашивают по Граму. При микроскопии мазков отмечают морфологию и количество микробов.

**Микробиологическая диагностика раневых инфекций (культуральный метод).** Посев раневого отделяемого с тампона производят на питательные среды: МПА , кровяной и сахарный агар , среда Сабуро , среда для анаэробов. Жидкие образцы засевают петлей на плотную среду в 4 сектора. Посевы инкубируют в аэробных и анаэробных условиях при температуре 370C и ежедневно просматривают. Далее проводят идентификацию выделенных культур. При выделении ассоциаций микробов из раневого отделяемого ведущее значение в течении раневого процесса следует отдавать видам , количественно преобладающим в данном микробиоценозе. Во время взятия материала из закрытых полостей и из глубины гнойных ран при условии соблюдения правил асептики выделенные микроорганизмы являются возбудителями данного гнойно-воспалительного процесса.

**Микробиологическая диагностика раневых тканей**

* Кусочки тканей режут стерильными ножницами, измельчают с бульоном из расчета 1 мл бульона на 1 г ткани.
* Затем готовят десятикратные разведения взвеси , по 0,1 мл каждого разведения засевают на кровяной агар .
* Подсчет КОЕ/г ткани производят с учетом числа выросших колоний и сделанных разведений.
* *Уровень обсемененности тканей(1г) в ране , равный 105 КОЕ/г, является критическим.*