

С.В. Дудник, Ю.В. Варфоломеева, В.В. Терещенко, О.Г. Партоєва, Т.І. Трюханова

ДОСВІД БАКТЕРІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ КРИПТОКОКОЗУ

Обласний комунальний заклад «Криворізька інфекційна лікарня № 1»,
комунальний заклад «Криворізький протитуберкульозний диспансер № 2»

Описано досвід бактеріологічного виділення криптокока з ліквору ВІЛ-інфікованого хворого; наведені фото колоній та мікроскопічних препаратів виділеного криптокока.

Ключові слова: криптококовий менінгіт.

Криптококовий менінгіт і генералізована криптококова інфекція, що розвиваються при глибокому імунodefіциті, є маркерними захворюваннями ВІЛ-інфікованих хворих, які ускладнюють перебіг основного захворювання і часто закінчуються летально. Важливо у ВІЛ-інфікованого хворого з неврологічною симптоматикою диференціювати криптококову інфекцію від туберкульозу, неоплазмозу, кокцидіодозу, гістоплазмозу, кандидозу, вірусного менінгіту і саркоїдозу. Своєчасне виявлення криптококозу в умовах відсутності деяких спеціалізованих живильних середовищ та початок антимікотичного лікування є актуальним та визначає важливість вивчення методів діагностики криптококозу у повсякденній практиці клініко-діагностичної лабораторії [1].

Збудником криптококозу є умовно-патогенний дріжджоподібний грибок *Cryptococcus neoformans* роду *Cryptococcus*. Клітини криптокока мають круглу або овальну форму від 3 до 20 мкм у діаметрі з єдиною дочірньою брунькою, з'єднаною з материнською клітиною тонким перешийком. Материнська і дочірня клітини вкриті мукополісахаридною капсулою, яка іноді досягає товщини 50-60 мкм та може дорівнювати двом діаметрам самої криптококової клітини [2]. Полісахаридна капсула є основним фактором патогенності криптокока, що сприяє його проникненню, безперешкодному розмноженню та генералізації в організмі. Полісахарид капсули впливає на клітинний компонент імунітету при криптококозі: гальмує фагоцитоз криптококів поліморфноядерними лейкоцитами, впливає на активність лізосомальних ферментів макрофагів [3].

Лабораторна діагностика криптококозу у людини базується головним чином на мікроскопічному, куль-

туральному та гістологічному методах дослідження. Серологічна діагностика актуальна при негативних результатах культуральних досліджень.

Збудник криптококозу здатний вражати будь-які клітини організму, але відрізняється явною нейротропністю. Основним матеріалом для дослідження є спинномозкова рідина. Дослідження гнійних виділень, біоптатів з уражених органів, крові проводять для підтвердження генералізації процесу. Основним методом діагностики є виділення збудника при мікроскопії або при культивуванні. «Золотим стандартом» підтвердження діагнозу криптококозу є виділення збудника культуральним методом. Криптококи виділити у культурі досить важко. Маємо обмежений набір середовищ, тому що відсутнє рекомендоване середовище Штайба, на якому колонії криптококового гриба набувають стійкого темно-коричневого кольору [4], морквяно-картопляний агар, середовище Літтмана, Чапека-Дорса та ін.

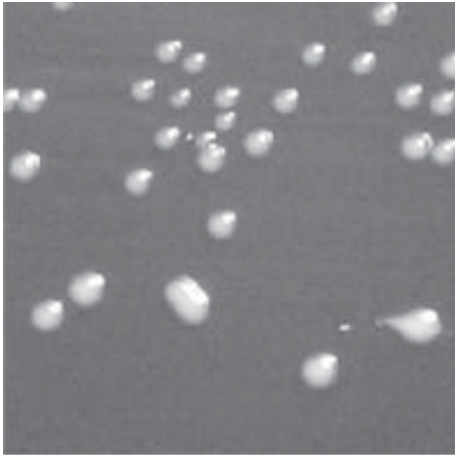
Для виділення культури криптокока досліджуваний матеріал засівають на цукровий бульйон, середовище Сабуро, пивне сусло з додаванням антибіотиків, рисовий агар, кров'яний агар. Посіви інкубують при 37 °С, колонії формуються через 3-15 діб. На щільних середовищах утворюються колонії від білувато-жовтуватого до темно-коричневого кольору, сметаноподібної консистенції, на морквяно-картопляному агарі колонії гриба мають темно-коричневе або буре забарвлення. Ідентифікація *C. neoformans* проводиться з урахуванням утворення уреазу на середовищі Христенсена і нездатності засвоювати лактозу і неорганічний азот, вірулентності, росту при 137 °С.

Нами був досліджений ліквор хворого на СНІД з проявами прогресуючого менінгоенцефаліту невизначеної етіології. Біохімічний аналіз ліквору, отриманого при діагностичній люмбальній пункції, виявив патологічні зміни загального характеру: підвищений рівень білка (0,67 г/л), знижений рівень глюкози (1,48 ммоль/л), лімфоцитарний цитоз.

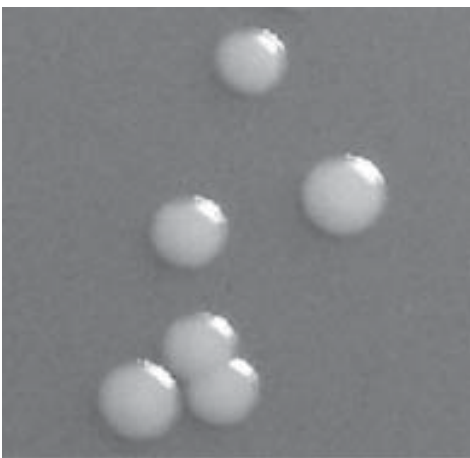
ОГЛЯДИ ТА ЛЕКЦІЇ

Для мікробіологічного дослідження на криптококоз ліквор попередньо центрифугували при 1000 об./хв 15 хв і осад використали для приготування препаратів для нативної мікроскопії, засіву на щільні живильні середовища, рідке середовище Сабуро і цукровий бульйон для подальшого пересіву на пластинчасті живильні середовища. Цукровий бульйон використали як середовище збагачення. Прямка бактеріоскопія осаду ліквору, забарвленого за Грамом і Бурі, не виявила клітин криптокока. Посів нативної спинномозкової рідини на пластинчасті живильні середовищі (кров'яний агар, рисовий агар) не дав росту через 72 год.

Через 24 години інкубації ліквору у цукровому бульйоні при 37 °С з'явився ріст у вигляді рівномірної муті. Матеріал у кількості 3,0 мл пересіяли на де-



Мал. 1. Колонії криптокока на кров'яному агарі, 3-тя доба інкубації.

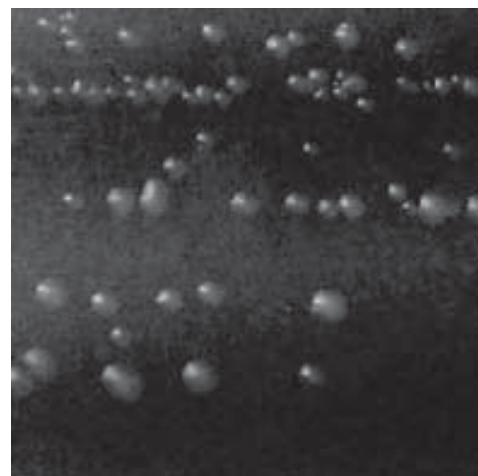


Мал. 2. Колонії криптокока на кров'яному агарі, 9-та доба інкубації.

кілька чашок з кров'яним агаром. Інкубація при 37 °С дозволяє диференціювати патогенні форми від сапрофітних: *C. neoformans* однаково добре росте як при 25 °С, так і при 37 °С, у той час як сапрофітні криптококи не здатні розмножуватися при 37 °С. Через 24 год з'явився ледь помітний ріст, на 3-тю добу інкубації на кров'яному агарі при 37 °С – колонії круглі, випуклі, з рівним краєм, гладенькі, блискучі, прозорі, сметаноподібні, злегка слизові, схожі на «крапельки роси». Розмір колоній у діаметрі 1-3 мм. При більш тривалому інкубуванні колонії збільшились у діаметрі, стали більш мутними, сухими, набули темно-жовтого забарвлення. На 6-ту добу інкубації розмір колоній досяг 3-4 мм (мал. 1). На 9-ту добу колонії набули більш коричнево-жовтого відтінку і у діаметрі досягли 5-6 мм (мал. 2).

З рідкого середовища Сабуро висів бульйонної культури проводили на рисовий агар. Посіви інкубували при 37 °С протягом 24 год з подальшим зберіганням при кімнатній температурі. На рисовому агарі молоді колонії криптокока білі, круглі, випуклі, з рівним краєм та поверхнею, сметаноподібні, розміром 1-3 мм у діаметрі. Із збільшенням терміну інкубації колонії ставали більш мутними, сухими, збільшувались у діаметрі до 6 мм (мал. 3).

Препарати культури криптокока фарбували за Буррі з контрастуванням у краплі туші, методами Грама та Нохта. При цьому враховували діаметр клітин, полісахаридну капсулу, інтенсивність брунькування. При фарбуванні методом Буррі на злегка сіруватому фоні туші при мікроскопії препаратів добре видно широкі капсули клітин, що брунькуються.



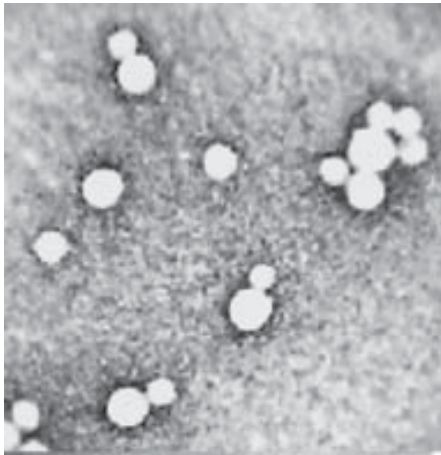
Мал. 3. Колонії криптокока на рисовому агарі, 9-та доба інкубації.

ОГЛЯДИ ТА ЛЕКЦІЇ

Мікроскопію проводили при збільшенні $\times 400$ (мал. 4) та при збільшенні $\times 1000$ (мал. 5). Виявлення на темному фоні дріжджоподібних клітин з однією брунькою, які оточені світлим обідком капсули, є точним доказом виділення *Cryptococcus neoformans* [5]. У препаратах з молодих колоній криптокока чітко визначені великі круглі клітини гриба з однією маленькою дочірньою брунькою.



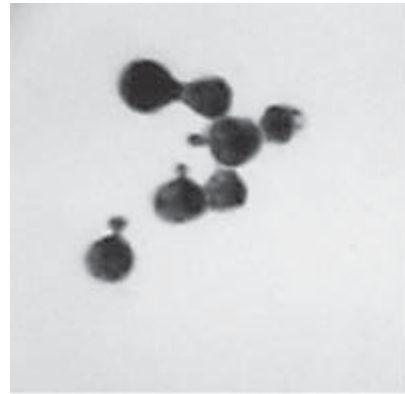
Мал. 4. Криптокок. Забарвлення за Бурі. Об.40, ок. 10.



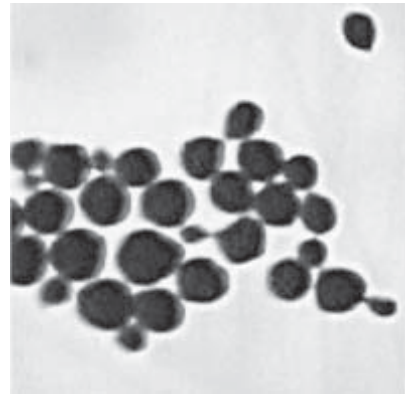
Мал. 5. Криптокок. Забарвлення за Бурі. Об. 100, ок. 10.

У мазках, забарвлених методом Грама, криптокок має вигляд грампозитивних круглих дріжджоподібних клітин з дочірньою брунькою, що з'єднана з материнською клітиною тонким з'єднанням. У препараті 72-годинної культури криптокока добре видно маленькі дочірні бруньки, що з'єднані з материнською клітиною (мал. 6). Мазок з культури на 6-й день інкубації на кров'яному агарі виявив дочірні бруньки, що збільшилися у розмірах і мали помітне з'єднання

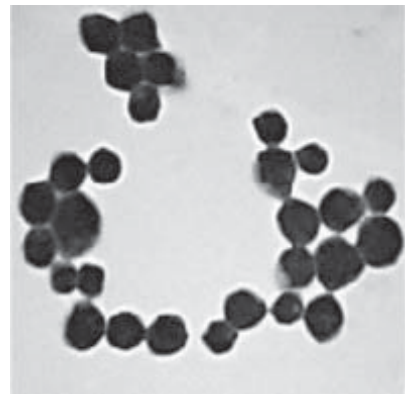
з материнською клітиною у вигляді тонкої перетинки (мал. 7). У препараті культури криптокока після 9 днів інкубації на кров'яному агарі дочірні клітини не спостерігаємо, тому що з'єднання дріжджової клітини зі своїм нащадком ненадійне і дочірня клітина швидко відокремлюється від материнської (мал. 8).



Мал. 6. Криптокок, 3-денна культура. Забарвлення за Грамом. Об. 100, ок. 10.



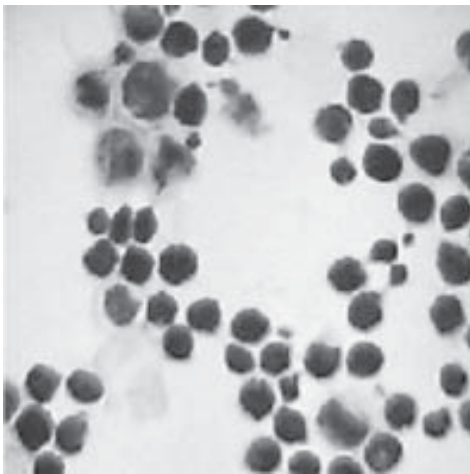
Мал. 7. Криптокок, 6-денна культура. Забарвлення за Грамом. Об. 100, ок. 10.



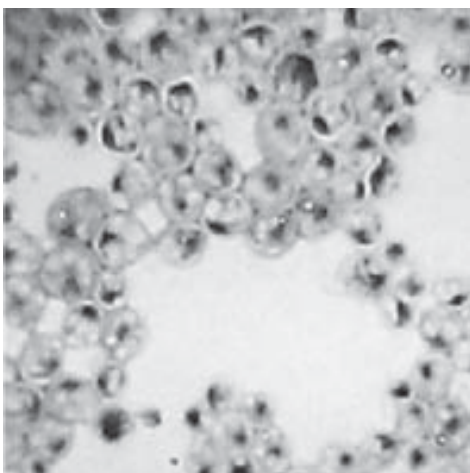
Мал. 8. Криптокок, 9-денна культура. Забарвлення за Грамом. Об. 100, ок. 10.

ОГЛЯДИ ТА ЛЕКЦІЇ

Забарвлення за Нохтом дозволяє спостерігати у клітин криптокока широку полісахаридну капсулу, яка майже не зафарбовується у порівнянні із клітиною гриба (мал. 9). Капсула перевищує дріжджову клітину у 2-3 рази. Особливо добре розвинена капсула у криптокока, вирощеного на рисовому агарі (мал. 10). Можна припустити, що на рисовому агарі з обмеженим набором поживних речовин гриб більше проявляє свої захисні властивості, що у першу чергу пов'язано із збільшенням розмірів полісахаридної капсули.



Мал. 9. Криптокок, кров'яний агар. Забарвлення за Нохтом. Об. 100, ок. 10.



Мал. 10. Криптокок, рисовий агар. Забарвлення за Нохтом. Об. 100, ок. 10.

Вивчали біохімічні властивості виділеної культури криптокока: незасвоєними залишилися глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, на середовищі Хрістенсена утворилась уреаза. Виявлена чутливість культури криптокока до флуконазолу.

Таким чином, незважаючи на обмежений набір необхідних живильних середовищ для дослідження на криптококоз і враховуючи важче виділення мікроміцетів роду *Cryptococcus* порівняно з грибами роду *Candida*, у клініко-діагностичній лабораторії маємо можливість виділити криптокок з патологічного матеріалу завдяки доступним методикам. Своєчасна діагностика криптококозу як етіологічного чинника гострої і хронічної неврологічної патології, особливо у ВІЛ-інфікованих хворих, важлива для диференціювання криптококового менінгіту з менінгітами і менінгоенцефалітами іншої етіології та негайної корекції лікування в умовах прогресуючого захворювання.

Література

1. Карнаухова О.Г. Лабораторное подтверждение криптококкоза у ВИЧ-инфицированных пациентов в Иркутске / О.Г. Карнаухова, Т.А. Платонова, С.А. Верещагина // Сиб. мед. журн. – 2008. – № 6. – С. 91-94.
2. Білько І.П. Мікологія глибоких мікозів і псевдомікозів у людини / І.П. Білько. – Севастополь: Рібест, 2007. – 72 с.
3. Васильєва Н.В. Особенности взаимодействия *Cryptococcus neoformans* разной вирулентности и альвеолярных макрофагов / Н.В. Васильєва, А.А. Степанова, Л.В. Филиппова // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 46-50.
4. Липницький А.В. Изучение возможностей использования агара Штайба в микологических исследованиях / А.В. Липницький, В.С. Лесовой, И.В. Новицкая // Успехи медицинской микологии. – Том I. Глава 2. – С. 73-75.
5. ВІС-інфекція і СПІД-асоційовані захворювання / А.Я. Лысенко, М.Х. Турьянов, М.В. Лавдовская, В.М. Подольский. – Москва, 1996. – 623 с.

THE EXPERIENCE OF CRYPTOCOCCAL BACTERIAL RESEARCH

S.V. Dudnyk, Yu.V. Varfolomeyeva, V.V. Tereshchenko, O.H. Partoyeva, T.I. Trukhanova

SUMMARY. The article describes the experience of cryptococcal bacterial distinguish from HIV-infection patient spinal liquid; photographs of isolated cryptococcal colonies and microscopic preparations are presented.

Key words: cryptococcal meningitis.

Отримано 26.04.2013 р.