Микобактерии-возбудители туберкулеза. Морфология возбудителя. Факторы патогенности. Патогенез и клинические проявления. Микробиологическая диагностика. Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Гизингер Оксана Анатольевна, д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии МИ РУДН
Зав. каф. микробиологии и вирусологии МИ РУДН Подопригора И.В.

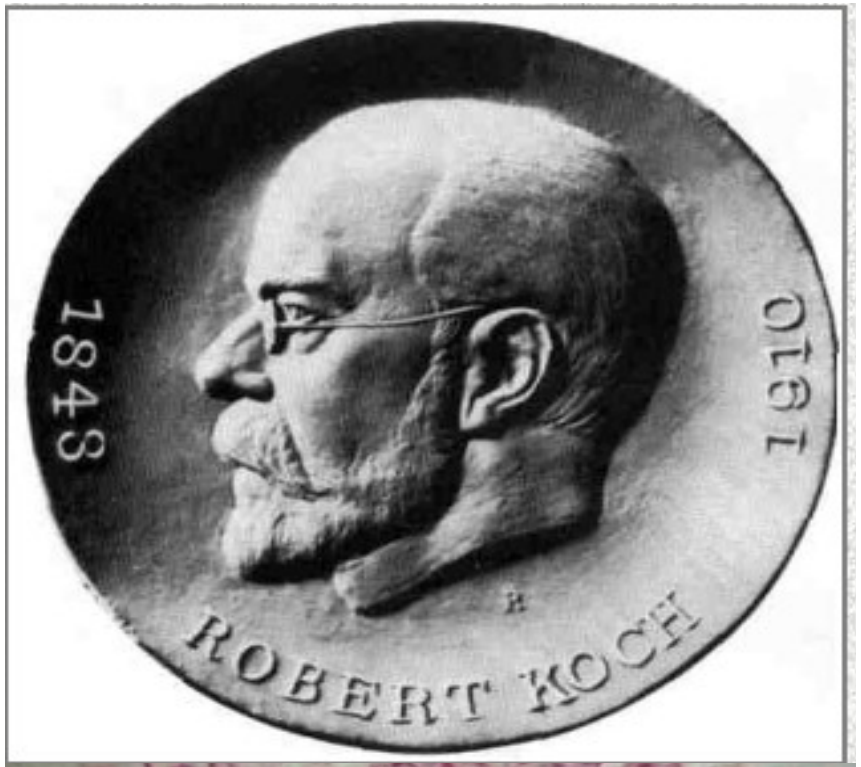
Исторический аспект

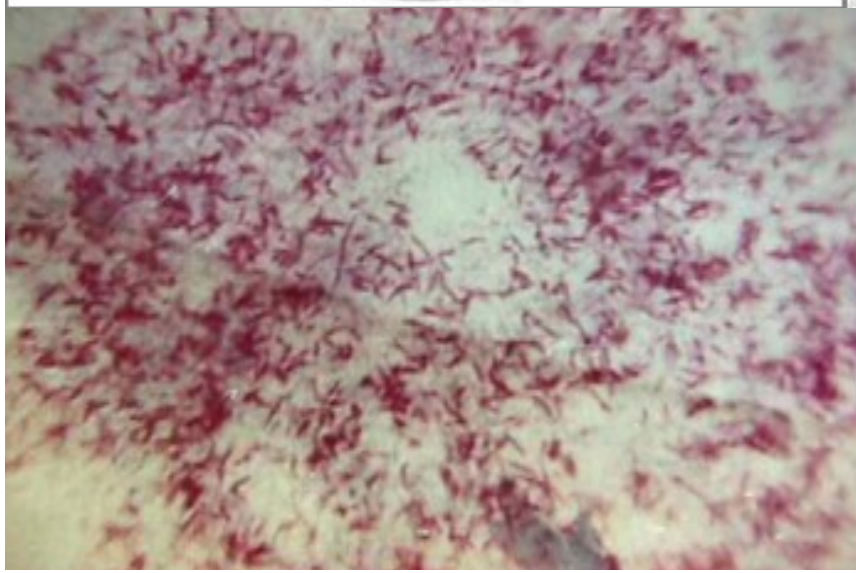
- Микобактерия открыта 24 марта 1882 года Робертом Кохом,
- с 1993 года, по инициативе Всемирной организации здравоохранения, 24 марта объявлен Всемирным днем борьбы с туберкулезом

- В разработке методов диагностики туберкулеза историческими вехами стали предложенная в 1819 г. аускультация легких и открытие в 1895 г. Рентгеном икс-лучей.
- В 1907 г. детский врач из Вены Пирке предложил кожную пробу с туберкулином для выявления инфицированных.

Лабораторная диагностика туберкулеза

На основе множества опытов и наблюдений и, опираясь на работы многих исследователей туберкулеза 24 марта 1882 г. Роберт Кох (R.Koch) обнаружил возбудителя туберкулеза, о чем сделал публичный доклад на заседании Берлинского физиологического общества «Die Aetiologie der Tuberculose »





Вакцинный штамм был назван бациллы Кальметт — Герена (BCG)

В 1919 г. французские ученые Кальметт и Герен создали вакцинный штамм микобактерии туберкулеза для противотуберкулезной вакцинации людей



Albert Calmette



Camille Guerin

Клинические формы туберкулеза

1. Туберкулез органов дыхания (легочный туберкулез),
2. Внелегочный туберкулез (туберкулез мозговых оболочек и ЦНС, кишечника, костей и суставов, мочевых и половых органов, кожи и подкожной клетчатки, лимфатических узлов. В 85% случаев поражаются легкие, и в 15% -внелёгочная локализация.

Поражение легких может протекать тоже в различных формах: кавернозный туберкулез, казеозная пневмония, милиарный туберкулез

Источники заболевания и пути передачи туберкулеза

Источник – больной туберкулезом человек, выделяющий МБТ; редко – крупный рогатый скот, больной туберкулёзом.

Пути передачи:

1. Воздушно-капельный и воздушно-пылевой,
2. Алиментарный (через сырое молоко или плохо термически обработанное мясо)
3. Контатный
4. Трансплацентарный

Классификация возбудителя туберкулеза

- Семейство *Mycobacteriaceae*
- Род *Mycobacterium*
- Вид *M. tuberculosis* (tuberculum – бугорок)

Виды, вызывающие туберкулёз у человека:
M. tuberculosis,
M. bovis,
M. africanum.

Эти 3 вида входят в группу медленнорастущих (более 7 суток) безусловно патогенных для человека микобактерий

Mycobacteriaceae. Род – Mycobacterium

Грамположительные, неподвижные, полиморфные (от длинных до кокковидных форм), прямые или изогнутые палочки
Длиной от 1 до 10 мкм и шириной от 0,2 до 0,6 мкм.
Широко распространены в окружающей среде (вода, почва, на растениях и животных)
Согласно классификации ВОЗ, микобактерии туберкулеза отнесены к III группе эпидемической опасности
Восприимчивый коллектив – любой человек (без специфического иммунитета)

Характеристика *M. tuberculosis*

- Неподвижны, спор нет, микрокапсула
- В клеточной стенке большое количество липидов (миколовая кислота и липоиды – до 40% от сухого веса), что определяет следующие свойства:
- Кислотоустойчивость (5-10% кислоты)
- Устойчивость к щелочам и спирту
- Устойчивость к высушиванию, УФ, некоторым дез. средствам

Факторы патогенности микобактерий

Факторы адгезии

- Липиды, содержащие миколовую, фтионовую, масляную, пальмитиновую, кислоты, вызывающие появление многочисленных гигантских клеток;
- Сульфатиды-серосодержащие поверхностные гликолипиды, усиливающие токсическое и антифагоцитарное действие корд-фактора, препятствующие слиянию фагосомы с лизосомой;

Эндотоксина нет, экзотоксина нет

Клеточная стенка микобактерий

- Микобактерии имеют особую клеточную стенку.
- В составе клеточной стенки:
- внешние липиды, миколовые кислоты, маннозиды, полисахариды и пептидогликан

Длина 1,0 – 10 мкм

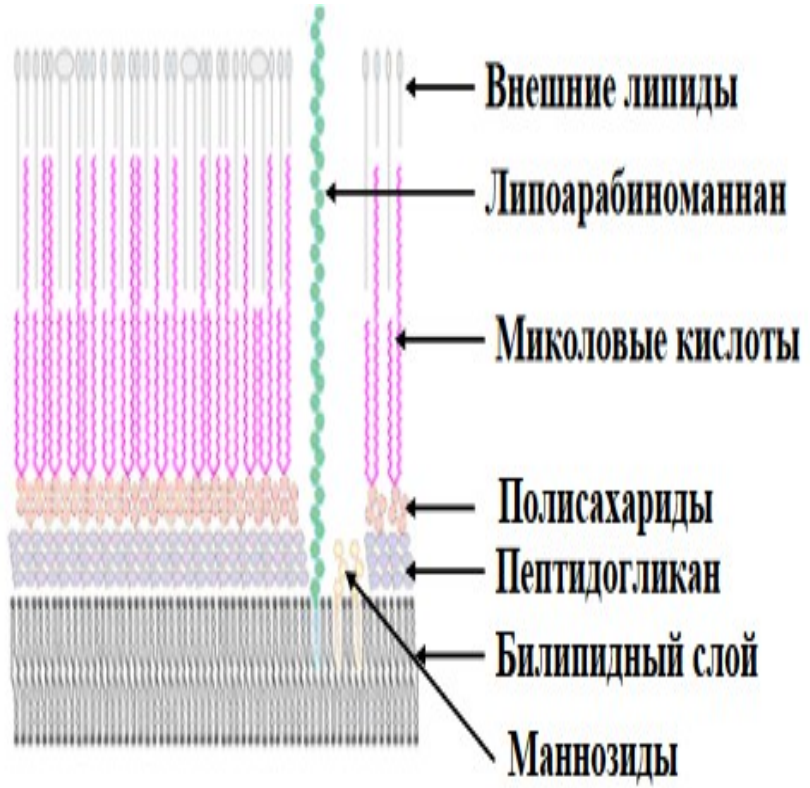
Ширина 0,2 – 0,6 мкм

клеточная стенка

↑ липиды

↑ воск

миколовая кислота



Главный фактор патогенности – токсический гликолипид (трегалоза-димиколат)– Корд-фактор

Располагается на поверхности и в толще клеточной стенки

- По химической природе – полимер: 1 молекула дисахарида тригалозы+ миколовая жирная к-та+миколиновая жирная кислота

Корд-фактор функции:

- Корд-фактор угнетает синтез Тх-1 типа интерферона-γ, который является важным фактором активации макрофагов;
- Корд-фактор подавляет синтез лизосомальных ферментов и слияние фагосомы и лизосомы в макрофагах;
- Оказывает токсическое действие на ткани.

Факторы патогенности микобактерий

- Липоарабиноманнан –гетерополисахарид, подавляющий активацию Т-лимфоцитов и лейкоцитов, вызывающий секрецию макрофагами ФНО (под действием ФНО развивается лихорадка, отмечается снижение веса) и ИЛ-10 (тормозит пролиферацию Т-клеток);

Возбудители туберкулеза не образуют экзотоксинов.

Высокотоксичными являются продукты распада бактериальных клеток

Патогенез туберкулеза

Попадание микобактерий в организм человека чаще всего происходит аэрогенно

Исход воздействия микобактерий на макроорганизмом зависит от ряда факторов: массивности инфицирующей дозы, степени вирулентности микобактерий, состояния факторов иммунитета, генетической предрасположенности

Попавшие в альвеолы легких микобактерии захватываются альвеолярными макрофагами и переносятся в регионарные лимфатические узлы. Фагоцитоз незавершённый.

Если все же фаголизосома образовалась, то микобактерии благодаря мощной клеточной стенке и ферментам каталазе и пероксидазе подавляют кислородозависимую и кислородонезависимую киллерную активность макрофагов.

Патогенез туберкулеза

Параллельно с размножением микобактерий в макроорганизме формируется иммунитет, в развитии которого основную роль играют Т-лимфоциты CD4+ (хелперы) CD8+ (цитотоксические). Т-хелперы распознают АГ микобактерий, фагоцитированных макрофагами, и начинают продуцировать ИЛ-2 и ИФН-γ.

ИФН γ - главный медиатор резистентности к туберкулезу, повышающий переваривающую способность макрофагов

Под действием продуктов микобактерий и цитокинов иммунных клеток формируется специфическая эпителиоидно-клеточная гранулёма, что ограничивает дальнейшее распространение микобактерий из первичного очага. Однако внутри клеток этой гранулемы микобактерии сохраняют свою жизнеспособность, т.е. гранулёма становится “хранилищем” микобактерий.

Патогенез туберкулеза

При попадании больших доз высоковирулентного микроба, если иммунной системе не удается подавить микобактерии, развивается специфическое воспаление, развитие первичного туберкулезного комплекса, состоящего из первичного аффекта (очаг в легких), воспаленных лимфатических сосудов, идущих от первичного аффекта

Очаг в легком может подвергаться распаду в результате действия токсических продуктов микобактерий и отсутствия в бугорках кровеносных сосудов. Из первичного туберкулезного очага микобактерии могут распространяться с образованием новых очагов (диссеминированный легочный и внелегочный туберкулез)

Первичный туберкулез может завершиться заживлением, уплотнением и обызвествлением; вокруг очага формируется соединительнотканная капсула. Внутри очага сохраняются микобактерии, что поддерживает иммунитет и создает риск реактивации туберкулезного процесса и развития вторичного туберкулеза.

Лабораторная диагностика туберкулеза

Исследуемый материал – мокрота, гной, моча, СМЖ, плевральная жидкость, промывные воды желудка, кусочки органов, кровь.

1. Микроскопический метод.
2. Бактериологический метод (основной).
3. Ускоренный метод Прайса на обнаружение корд-фактора.
4. Биологический метод (чувствительные лабораторные животные)
5. Серологический метод – РПГА, ИФА
6. Молекулярно-биологический метод – ПЦР, ДНК-гибридизация.
7. Аллергологический метод – проба Манту, Диаскин тест, Квантифероновый тест

Микроскопический метод (обязательный)

Проводится в двух вариантах:

1) Микроскопия мазков из *нативного (необработанного) материала*; мазки окрашивают по Цилю-Нильсену и флюоресцирующим красителем аурамином.
2) Микроскопия мазков из осадка *материала, подготовленного путем обработки* гомогенизирующими и обеззараживающими средствами и последующего центрифугирования; мазки окрашивают по Цилю-Нильсену и флюоресцирующим красителем аурамином.

При окраске по Цилю-Нильсену выявляют красные (кислотоустойчивые) прямые или слегка изогнутые палочки.

При окраске аурамином выявляют палочки, светящиеся жёлтым или оранжевым цветом.

На основании микроскопического исследования возможно сделать заключение только о наличии или отсутствии в препарате кислоустойчивых микобактерий.

Окраска по Циль-Нильсену

Метод Циля-Нильсена предназначен для дифференциации кислотоустойчивых бактерий (возбудителей туберкулеза и лепры) от некислотоустойчивых.

1.Мазок окрашивают карболовым фуксином Циля (основной краситель) при нагревании 3-5 мин.

2.Обесцвечивают раствором серной кислоты (дифференцирующее вещество) в течение 1-2 мин.

3.Промывают водой.

4.Докрашивают 3-5 мин метиленовым синим (дополнительный краситель).



Окраска по Циль-Нельсену

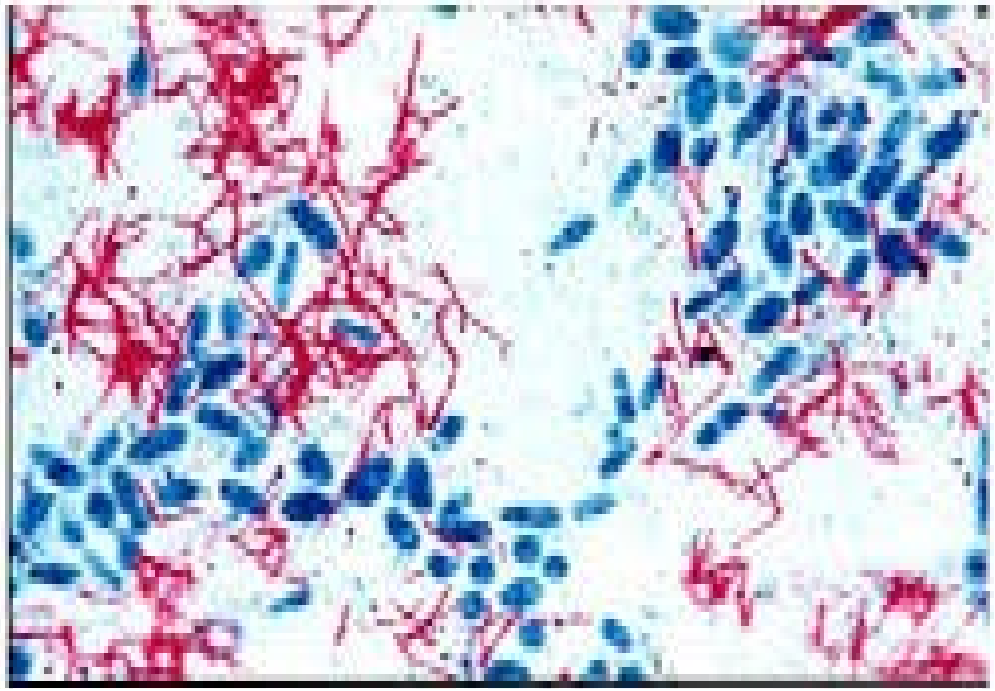
Клеточная стенка кислотоустойчивых бактерий отличается высоким содержанием липидов.

Они с трудом окрашиваются, но затем удерживают основной краситель при обесцвечивании кислотой.

Некислотоустойчивые бактерии легко окрашиваются, а затем легко обесцвечиваются кислотой и окрашиваются дополнительным красителем.

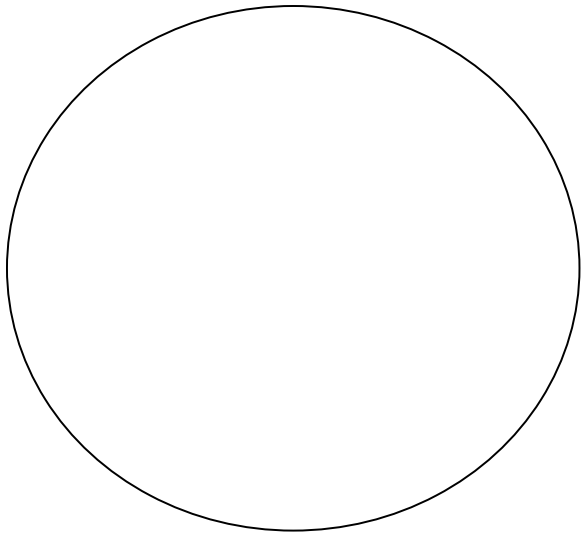
NB! Кислотоустойчивые микроорганизмы окрашиваются в рубиново-красный цвет, некислотоустойчивые - в сине-голубой.

Микобактерии ТБ в мокроте
Окраска по Цилю-Нильсену



Практическое задание

Зарисовка демонстрационного препарата Mycobacterium tuberculosis в мокроте (окраска по методу Циля-Нильсена):



Бактериологическое исследование

Перед посевом материал обязательно подвергают специальной обработке с целью деконтаминации и гомогенизации (разжижения) с последующим центрифугированием

Микобактерии растут в виде сухих, морщинистых колоний с шероховатой поверхностью, напоминающей манную крупу или цветную капусту, желтоватого или кремового цвета (цвета слоновой кости).

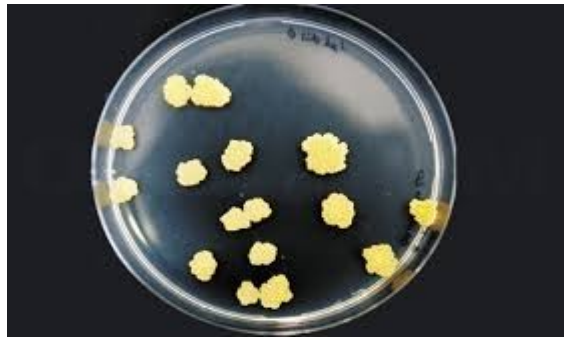


Бактериологическое исследование. Посев на питательные среды

На плотных питательных средах:

- M. tuberculosis – сухие морщинистые крошащиеся возвышающиеся колонии желтовато-кремового цвета с неровными изрезанными краями;
- M. bovis – небольшие слегка выпуклые бесцветные колонии с изрезанными краями.





В жидких средах: тонкая нежная желтоватая пленка, которая постепенно утолщается, становится морщинистой, ломкой, раствор остается прозрачным.



Культуральные свойства

- Строгий аэроб;
- Оптимальная температура 37 С;
- pH 6,4-7,2;
- Видимый рост M. tuberculosis через 12-25 дней,
  M. bovis – через 24-40 дней;
- Рост стимулируется 5-10% CO2 и 0,5% глицерина;
- Культивируются только на сложных питательных средах с глицерином:
  - среда Левенштайна-Йенсена,
  - Среда Финна

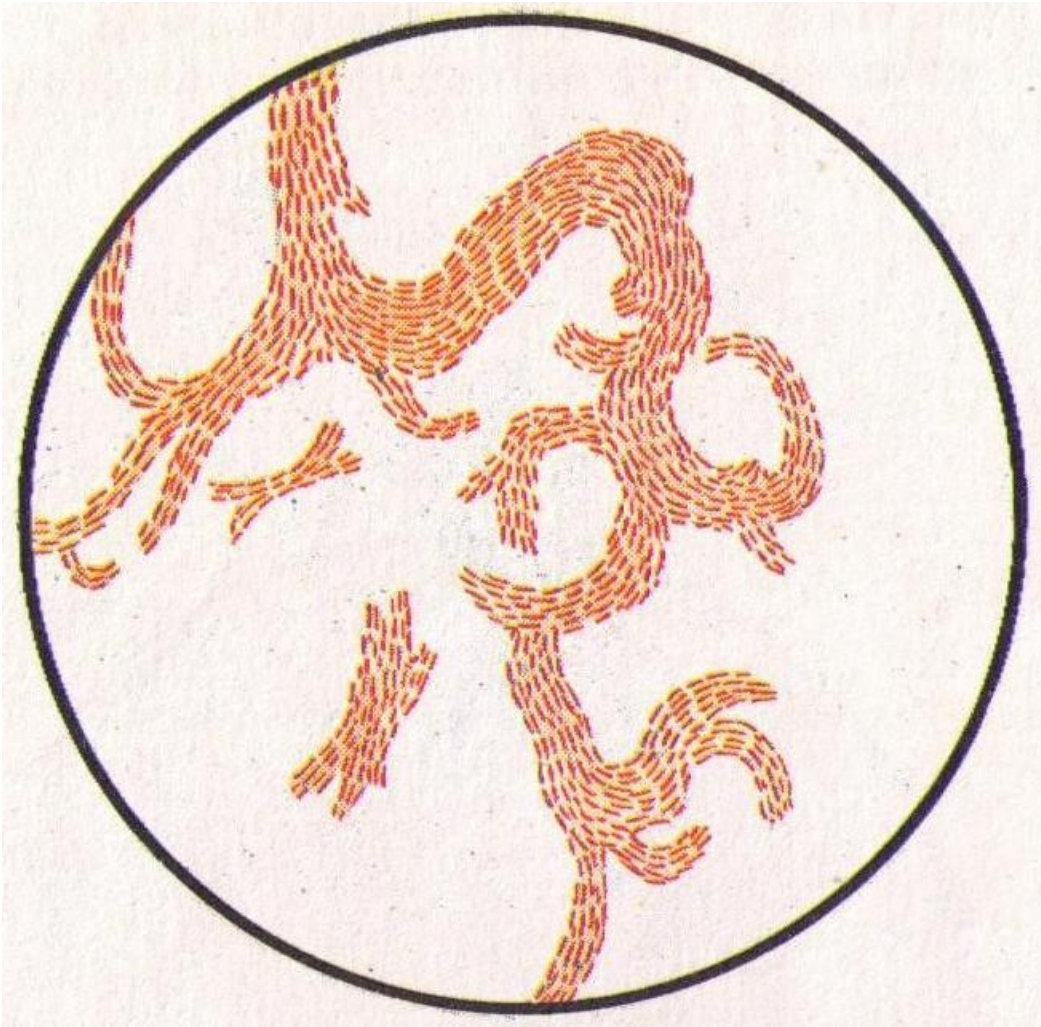
Среда Левенштейна – Йенсена (аспарагин – источник азота, яйца, картофельная мука, глицерин, малахитовая зелень) – на фоне зеленоватого цвета среды бородавчатые желтого цвета колонии в R-форме, шероховатые, с неровными краями.

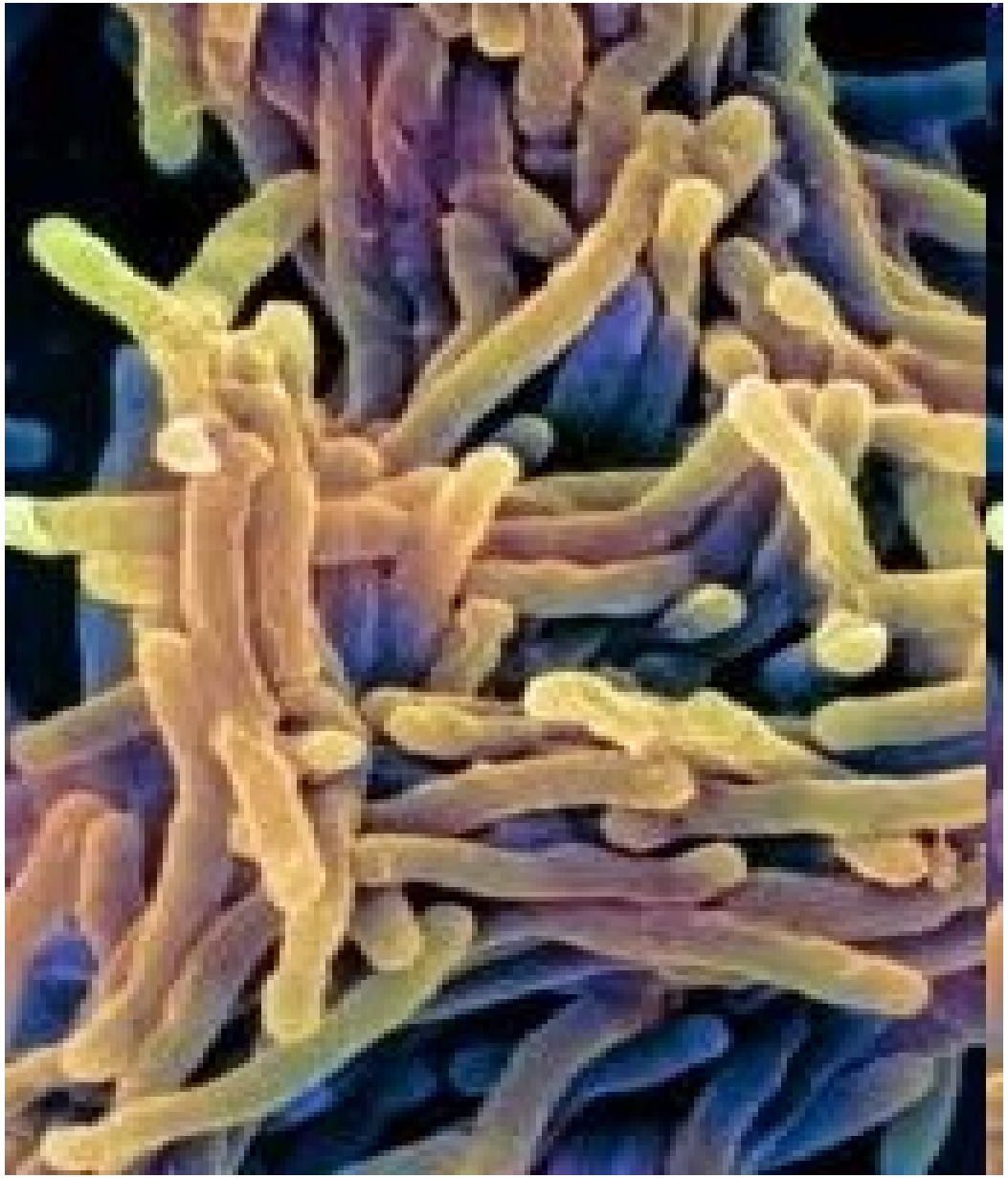
Ускоренные методы выделения микобактерий

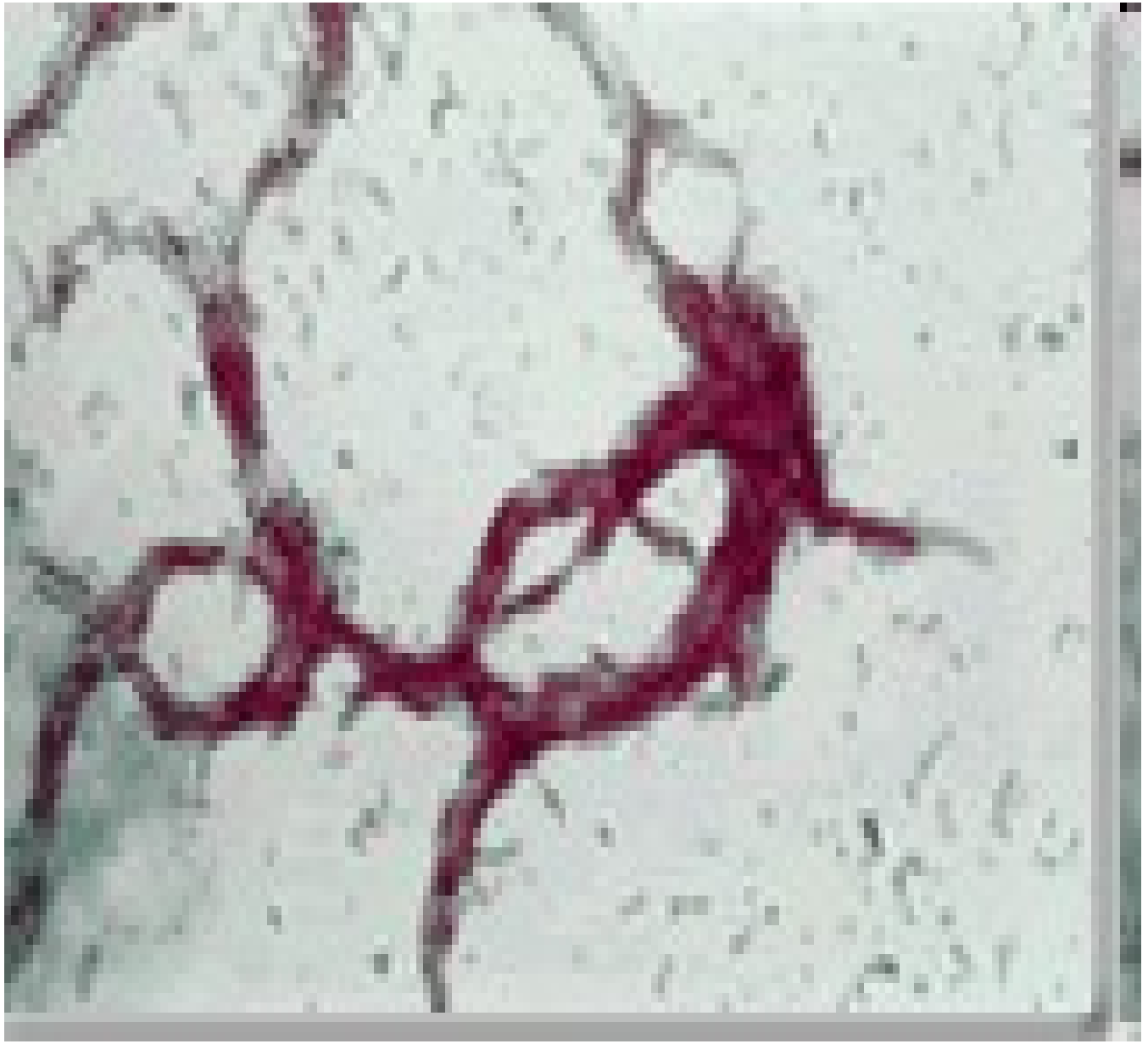
Метод Прайса

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 но Цилю-Нильсену. При микроскопии обнаруживают микроколонии микобактерии возбудителя туберкулеза. Вирулентные бактерии образуют змеевидные, а невирулентные — аморфные колонии.

Метод Прайса







Идентификация микроорганизмов по биохимической активности. M. tuberculosis

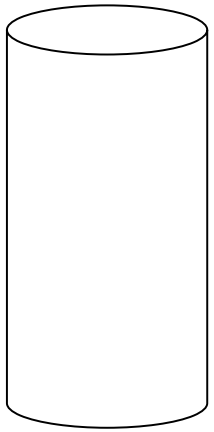
- Проба на каталазную активность – чистую культуру возбудителя прогревают 30 мин. при Т=68С и проводят тест (у патогенного возбудителя фермент каталаза термолаби-лен, а у атипичных видов - термостабилен)
- Ниациновый тест (проба Конно) – M.tub. Синтезирует никотин в среду Сотона. При добавлении цианистого калия к среде образуется ниацин, который при соединении с 5% хлорамином дает ярко-желтое окрашивание M. Bovis не накапливает ниацин.

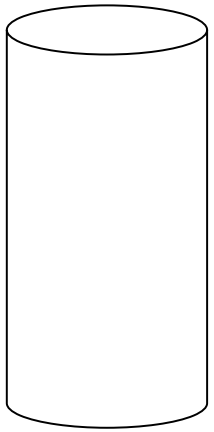


Практическое задание

- Учёт и зарисовка результата ниациновой пробы: синтезируемая M. tuberculosis никотиновая кислота вступает в реакцию с цианистыми соединениями (например, KCN) в жидкой питательной среде с образованием ниацина, что проявляется ярко-желтым окрашиванием среды в присутствии 5% раствора хлорамина:

Стерильная





Измененная

Идентификация по биохимическим свойствам

Биохимический признак	M. tuberculosis	M. bovis	Другие микобактерии
Потеря каталазной активности при нагревании до 68°C (термолабильная каталаза)	Да	Да	Нет
Образование никотиновой кислоты	Да	Нет	Да/Нет
Восстановление нитратов в нитриты	Да	Нет	Да/Нет

Биологический метод

M. tuberculosis



M. bovis



Кожно аллергические пробы. Внутрикожная проба Манту





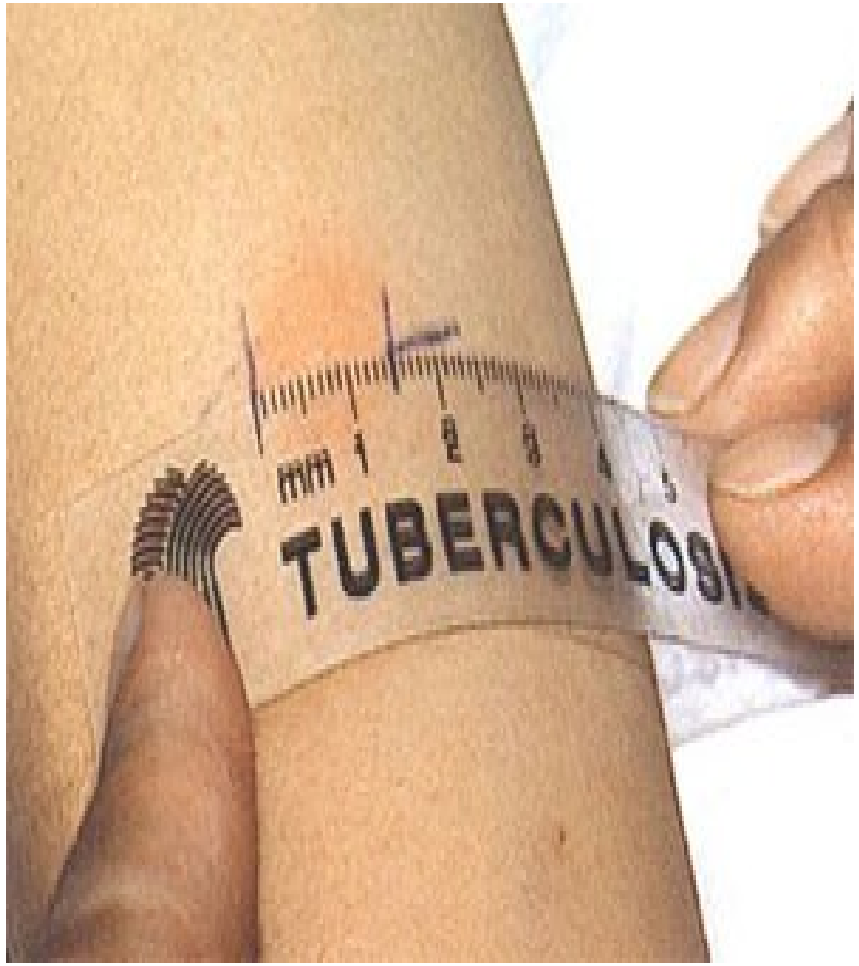
Для определения специфической сенсибилизации организма к микобактериям туберкулеза проводят туберкулинодиагностику

Туберкулин-глицериновый экстракт бульонной культуры микобактерии) с активностью 2 туберкулиновых единиц в 0,1 мл.

- При пробе Манту используют 2 единицы туберкулина. Через 72 часа проводят учет путем измерения размера инфильтрата (папулы) в мм

Положительные реакции (более 16 мм) подтверждают наличие сенсибилизации организма

Валидность результатов. Бустерный эффект пробы Манту



Эффект усиления (boost (англ.) – усиление), т.е. увеличения диаметра папулы при частой (чаще чем раз в год) постановке пробы; по всей видимости связан с увеличением чувствительности лимфоцитов к туберкулину.

Бустерный эффект имеет и обратную сторону – лица, инфицированные туберкулезной палочкой, с годами теряют способность реагировать на туберкулин и в конце концов результат пробы становится ложноотрицательным

Усиление кожной реакции или ложно положительный результат кожного теста

- Контакт или инфекция нетуберкулезными микобактериями
- Вакцинация BCG
- Травма или раздражение кожи в месте введения туберкулина перед оценкой результата теста…

Диагностика туберкулеза – метод QuantiFERON® -TB Gold IT



QFT в 6 раз точнее кожного теста прогнозирует развитие активного туберкулеза

2 мая 2005 г новый invitro тест QuantiFERON® -TB Gold (QFT-G, Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) был окончательно одобрен Продовольственной и Лекарственной Администрацией США, как средство диагностирования МБТ

Чувствительность при активном туберкулезе

QFT на 34% более чувствителен, чем кожный тест при активном туберкулезе

2 мая 2005 г новый invitro тест QuantiFERON® -TB Gold (QFT-G, Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) был окончательно одобрен Продовольственной и Лекарственной Администрацией США, как средство диагностирования МБТ. С 2010 года в РФ



QuantiFERON тест регистрирует секретируемый гамма-интерферон в цельной крови, которая была инкубирована со смесью синтетических пептидов имитирующих два белка, присутствующих в МБТ

Эти антигены обеспечивают большую специфичность, нежели возможно при помощи тестов, использующих очищенные белковые производные в качестве туберкулезных антигенов

Диаскинтест

- Диаскинтест - раствор для внутрикожного введения, который представляет собой рекомбинантный белок, присутствующий в вирулентных штаммах M. tuberculosis и отсутствующий в вакцинном штамме БЦЖ, который продуцируют генетически модифицированные культуры E. coli.
- Используется для проведения внутрикожной пробы с целью диагностики туберкулеза и оценки активности процесса.
- Диаскинтест используют для дифференциальной диагностики туберкулеза, инфекционной и поствакцинальной аллергии, а также для проведения оценки эффективности противотуберкулезной терапии в комплексе с другими методами.

Диаскинтест

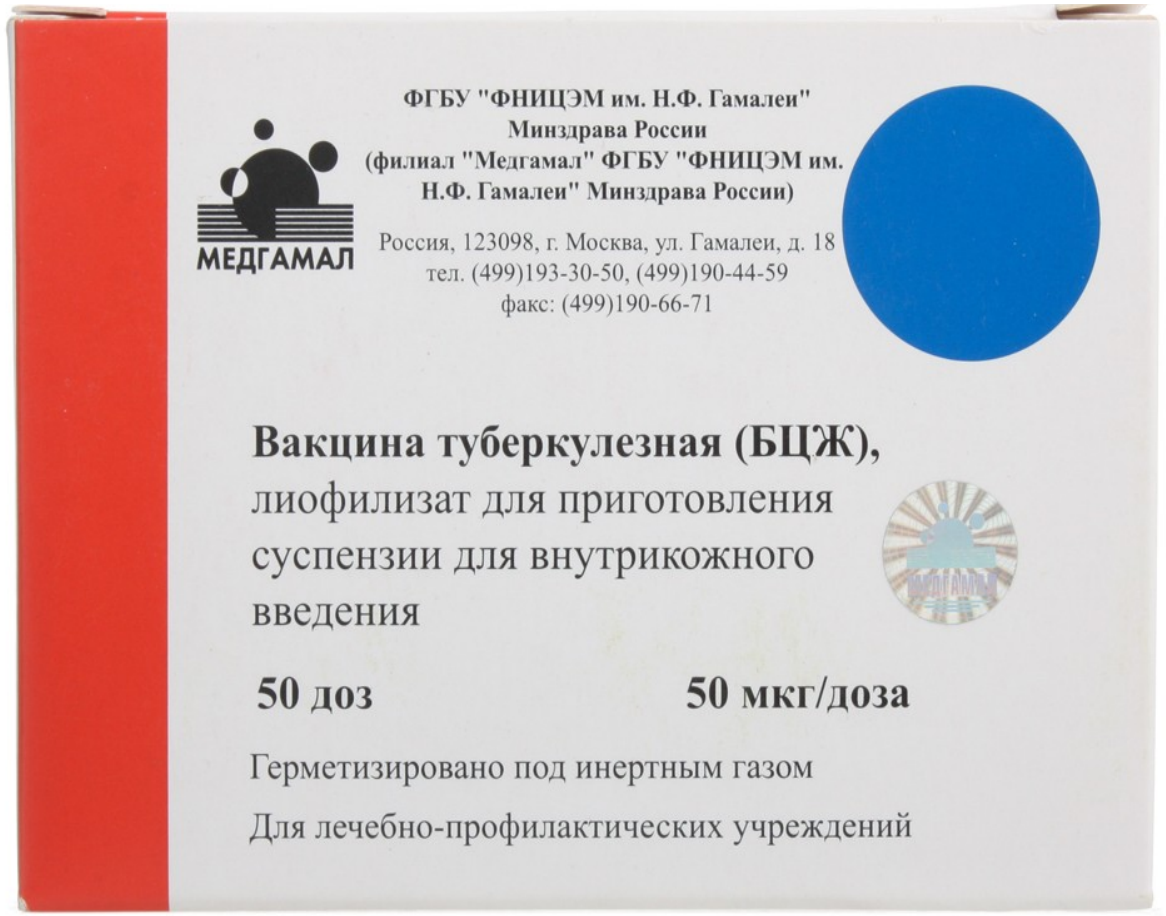


- Положительная проба Манту означает, что человек либо контактировал с возбудителем туберкулеза, либо недавно получил прививку БЦЖ, либо его организм инфицирован непатогенными микобактериями.
- Диаскинтест дает положительный результат только в том случае, когда человек заражен возбудителем туберкулеза или уже болеет туберкулезом.

Профилактика туберкулеза

Вакцина ВЦЖ

Содержит: Живые микобактерии вакцинного штамма БЦЖ-1(BCG-1)
Получена: путем культивирования микобактерий вакцинного штамма БЦЖ (BCG - Bacillus Calmette-Guerin) на питательной среде с последующим сбором микробных клеток, ресуспендированием и леофильным высушиванием
Применяется: для создания активного иммунитета против возбудителя туберкулеза



Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Загрязненность воздуха закрытых помещений микробами определяется по двум показателям:

1) общему количеству микробов, содержащихся в 1 м3 воздуха;
2) качественному составу микрофлоры воздуха, определяемому по выявлению золотистых стафилококков и стрептококков и спорообразующих бактерий.

- Обнаружение санитарно-показательных в воздухе свидетельствует о неблагополучии, так как они выделяются от больных или бактерионосителей.
- Появление спорообразующих - показатель загрязненности воздуха микроорганизмами почвы.

Санитарно-микробиологическое исследование воздуха

Аспирационный метод более точный по сравнению с седиментационным

Для определения общей бактериальной обсемененности воздуха закрытых помещений используют две чашки Петри с мясо-пептонным агаром и пропускают через аппарат по 100 л воздуха

- Седиментационный метод (по Коху) - оседание микробов на поверхность твердой питательной среды под действием силы тяжести.
- Для исследования воздуха помещений чашки Петри со средой открывают на 5-10 мин (для определения общей обсемененности воздуха) и на 40 мин (для учета кокковой флоры)

Благодарю за внимание

Тема следующего занятия

Коллоквиум