

микобактерии. туберкулез



Микобактерии - палочковидные бактерии (0,2-0,7 x 1,0-10 мкм), иногда ветвящиеся, нитевидные и мицелиоподобные с гомогенной или зернистой цитоплазмой

- Грамположительны, неподвижны, спор не образуют, имеют микрокапсулу. Аэробы. Содержат в клеточной стенке большое количество липидов, миколовых кислот и арабиногалактан. Плохо воспринимают анилиновые красители, окрашиваются по Цилю-Нельсену и флюорохромами (аурамин). Устойчивы к кислотам, спирту, щелочам. Все виды делятся на медленно растущие (появление видимого роста после 7 дней) и быстро растущие (появление видимого роста до 7 дней). Некоторые виды микобактерий (*M. leprae*) не культивируются. 23 медленно растущих вида и 5 быстро растущих видов микобактерий связаны с патологией человека.
- 95% инфекций вызываются патогенными (*M. tuberculosis*, *M. leprae*) и условно-патогенными микобактериями (*M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* и др.) - возбудителями микобактериозов.

Классификация культивируемых микобактерий, обнаруживаемых в клинических образцах (медленно растущие)

- Возбудители туберкулеза

—

- *M. tuberculosis*
- *M. africanum*
- *M. bovis*

Нехромогенные

M. avium complex

M. xenopi

M. haemophilum

M. malmoense

M. shimoidei

M. genavense

M. celatum

M. ulcerans

M. terrae complex

M. triviale

M. gastri

Хромогенные

M. kansasii

M. marinum

M. simae

M. asiaticum

M. xenopi

M. goodii

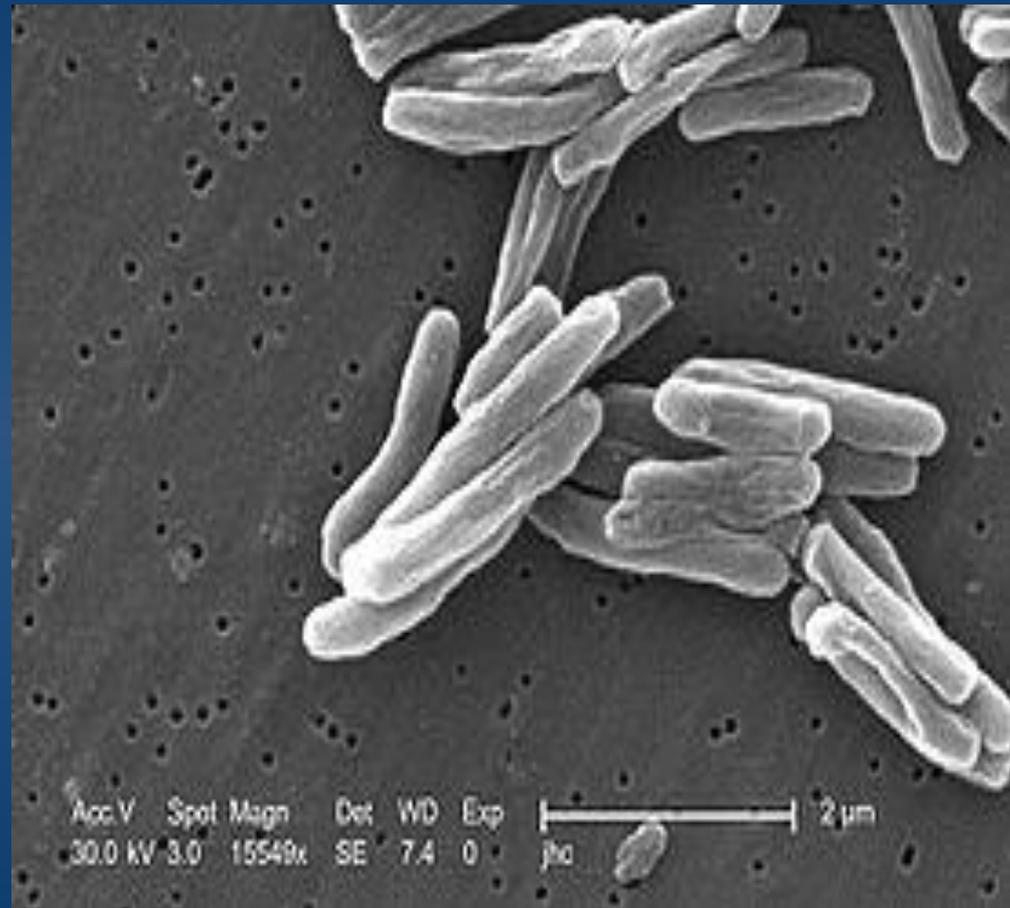
M. scrofulaceum

M. szulgai

M. flavescens

Быстро растущие

- Нехромогенные
 - *M. fortuitum*
 - *M. chelonae*
 - *M. abscessus*
 - *M. mucogenicum*
 - *M. smegmatis*
- Хромогенные
 - *M. phlei*
 - *M. vaccae*



Туберкулез – хроническая инфекция с длительным периодом выделения возбудителя, многообразием клинических проявлений, поражением различных органов и систем, что создает своеобразие эпидемического процесса и отличает ее от других инфекционных болезней

В настоящее время насчитывают более 100 видов микобактерий. По патогенным свойствам род *Mycobacterium* подразделяют на:

- **Патогенные микобактерии:** вызывающие туберкулез – *Mycobacterium tuberculosis complex* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) и лепру - *M. leprae*
- **Условно-патогенные** (вызывают микобактериозы): *M. avium-intracellulare complex*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. ulcerans* и др.
- **Сапрофиты:** *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. goodii*, *M. terrae* и др.

Мycobacterium tuberculosis complex –
M. tuberculosis, M. bovis, M. bovis BCG, M. africanum,
M. microti – микобактерии туберкулеза



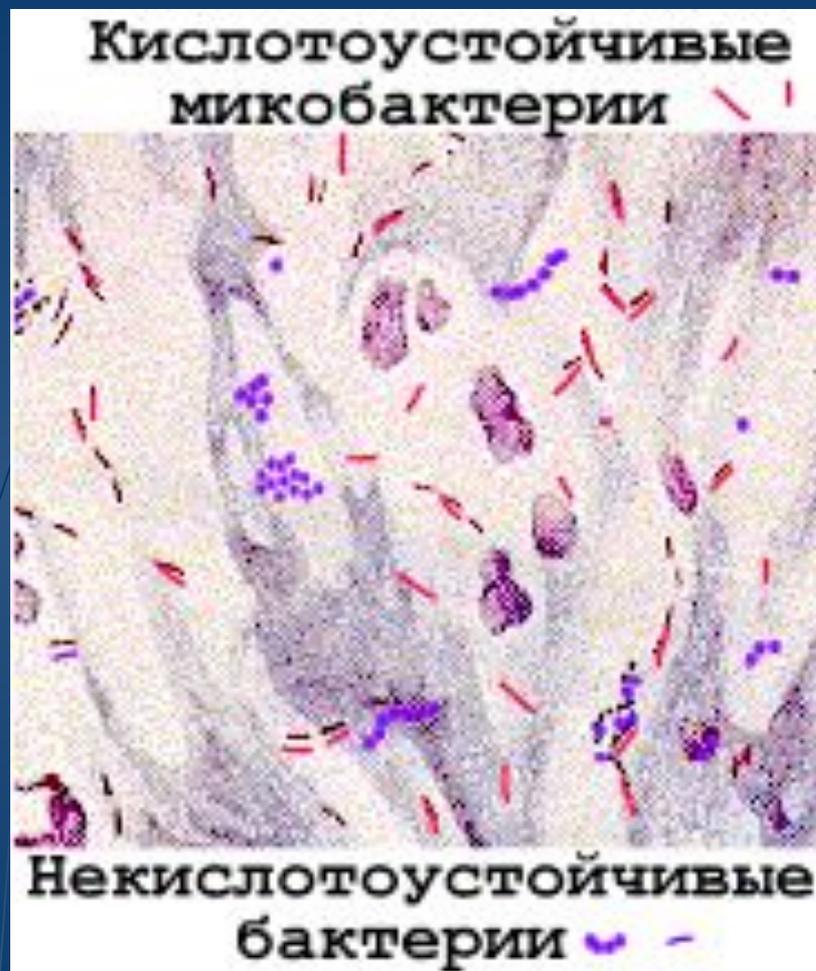
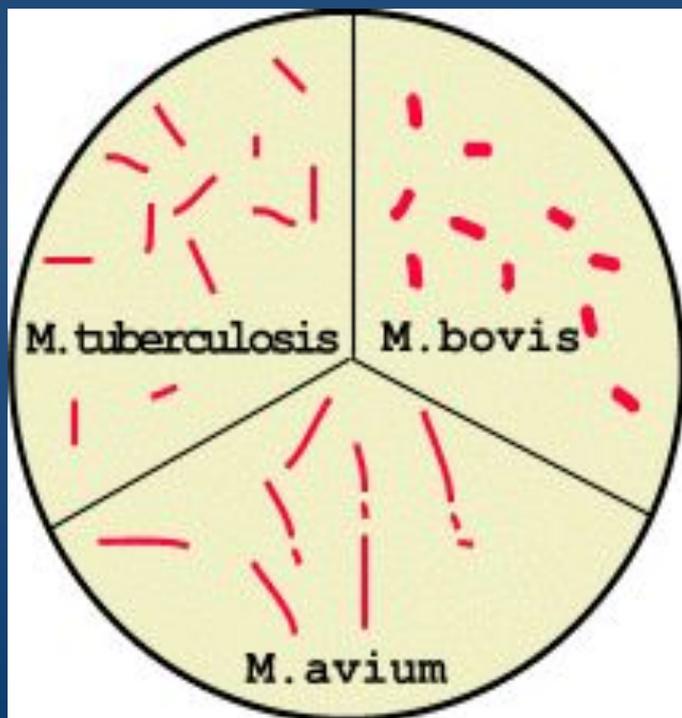
Микобактерии туберкулеза (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*)

- Микобактерии туберкулеза вызывают туберкулез (от лат. *tuberculum* - бугорок) - хроническую инфекцию человека и животных, протекающую с образованием гранулем, и творожисто-перерожденных очагов; сопровождается поражением различных органов.
- Возбудители: *M.tuberculosis* (человеческий вид - в 92% случаев туберкулеза),
- *M.bovis* (бычий вид - в 5% случаев),
- *M.africanum* (в 3% случаев).
- Основной механизм заражения - аэрогенный (воздушно-капельный, воздушно-пылевой), реже - алиментарный и контактный.

- Микобактерии туберкулеза - полиморфные бактерии: длинные тонкие палочки (*M.tuberculosis*), короткие толстые палочки (*M.bovis*) или слегка изогнутые, слабо ветвящиеся палочки, напоминающие грибы (название рода *Mycobacterium* от *Mycetes* - грибы + *bacterium*).
- Грамположительны, неподвижны, спор не образуют, имеют микрокапсулу. Наружный слой клеточной стенки содержит много липидов, представляющих арабиногалактан-миколат, состоящий из D-арабинозы, D-галактозы и миколовых кислот. Липиды определяют спирто-, кислото-, щелочеустойчивость.
- Основным фактором вирулентности *M.tuberculosis* является корд-фактор (англ. cord - жгут, веревка) - липид (6' 6'-димиколат трегалозы), вызывающий формирование микроколоний в виде "кос" и жгутов.
- Микобактерии туберкулеза плохо воспринимают красители и окрашиваются карболовым фуксином по Цилю-Нельсену в красный цвет. *M.tuberculosis* - аэроб. *M.bovis*, *M.africanum* - микроаэрофилы.

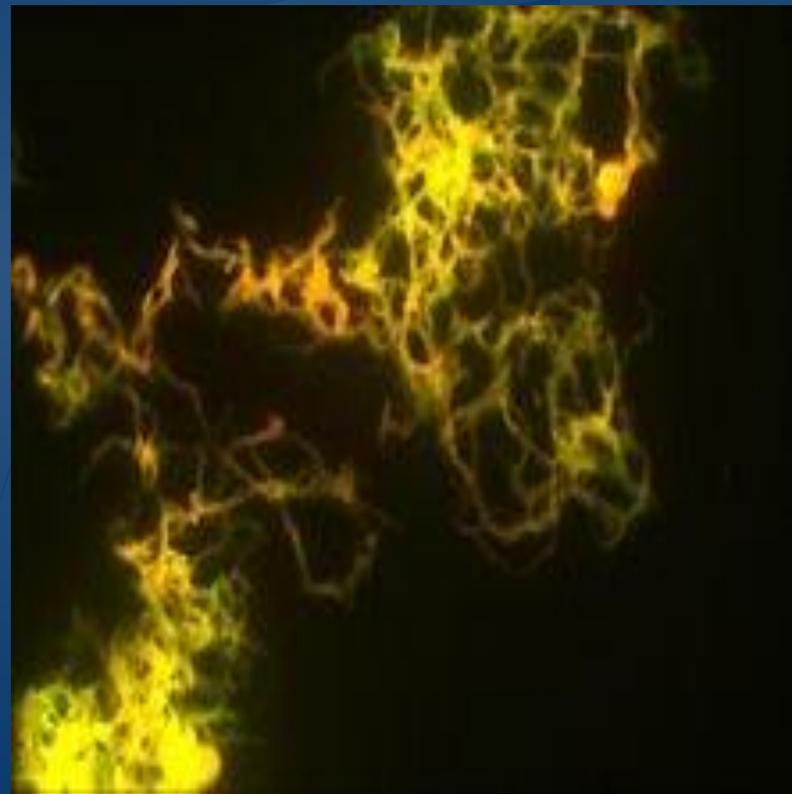
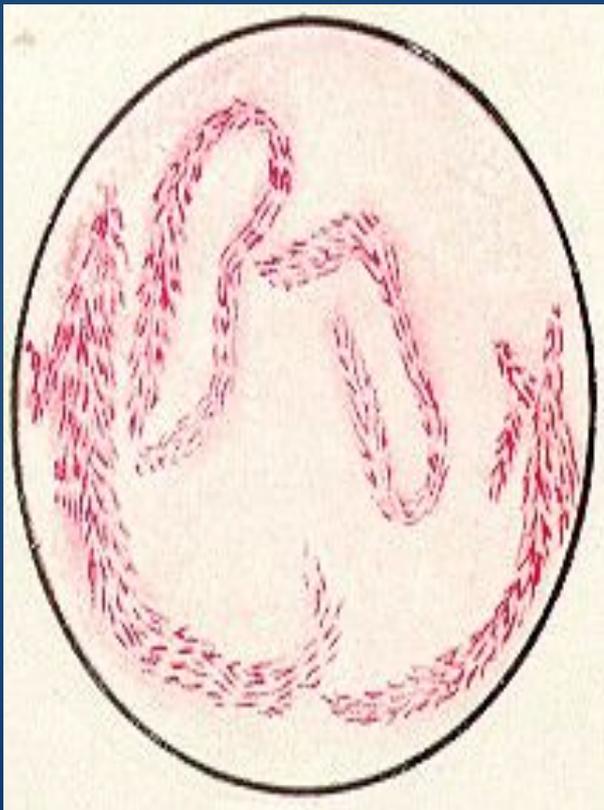
M.tuberculosis в мазке из мокроты (окраска по Цилю-Нельсену)

- Туберкулезные палочки в чистой культуре (рисунок)

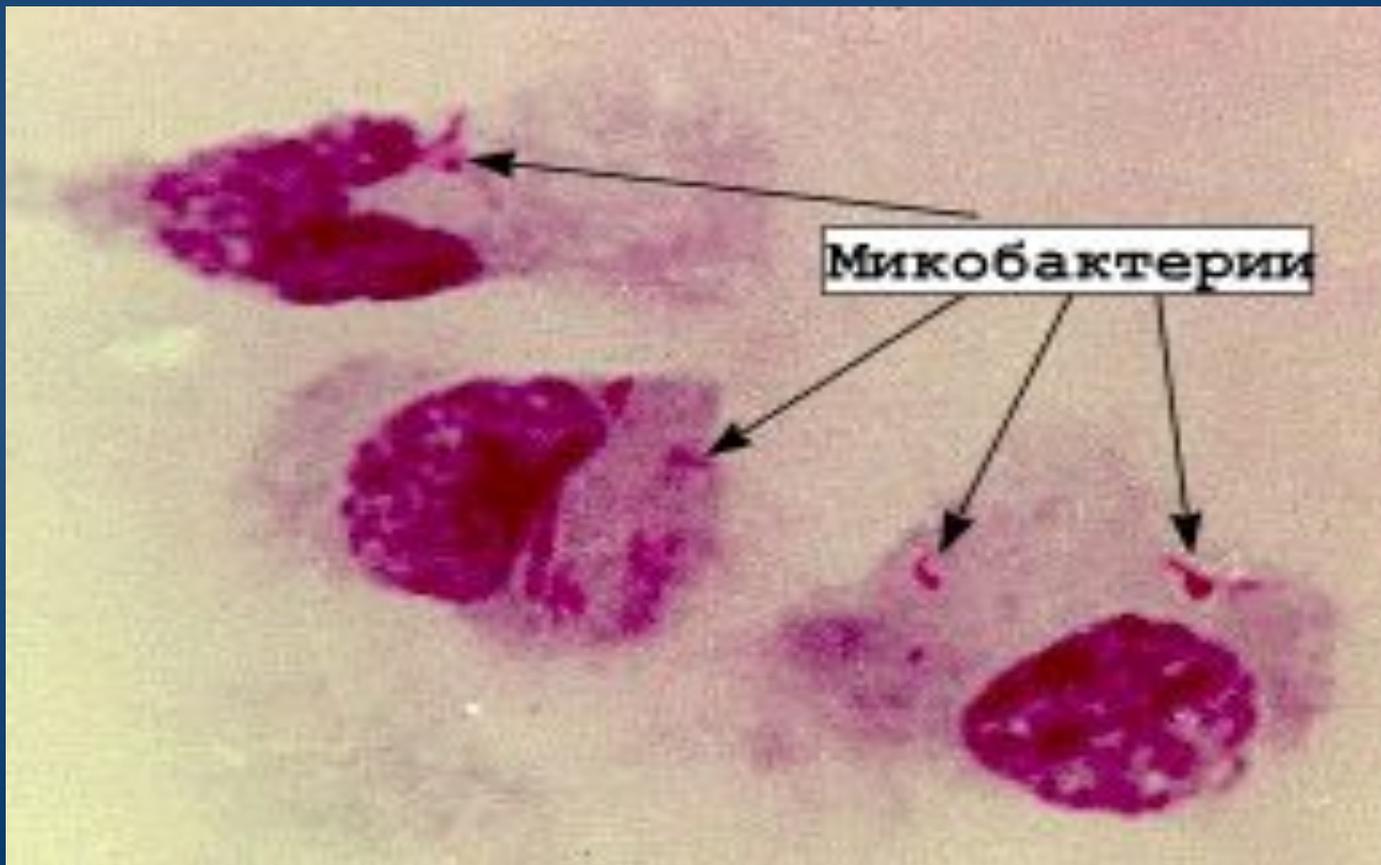


Корд-фактор *M.tuberculosis*: палочки, расположены
в виде "косы", жгутов

- Корд-фактор (рисунок- слева, люм.микроскопия- справа)



Незавершенный фагоцитоз микобактерий (окраска по Цилю-Нельсену)



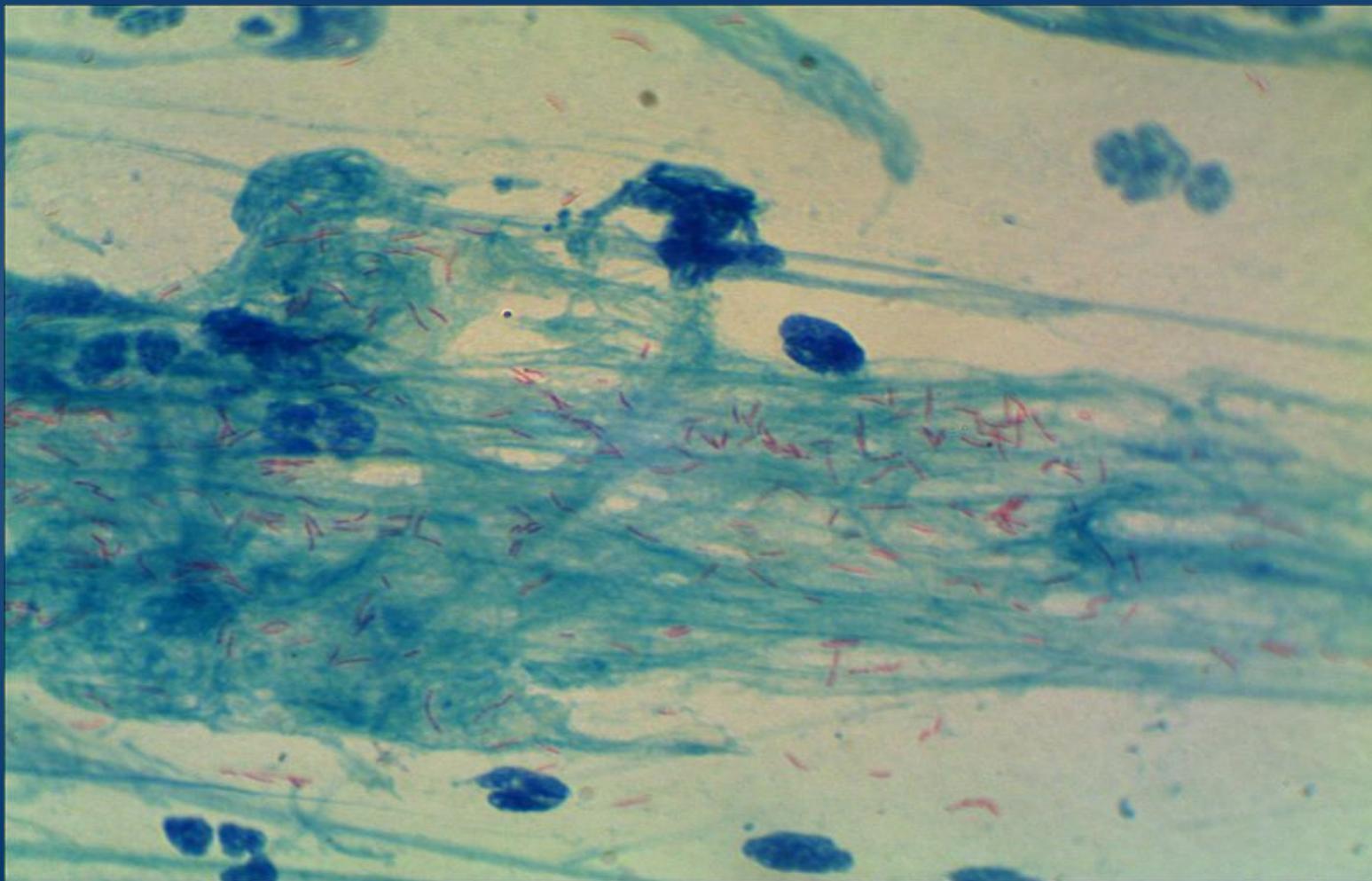
Микробиологическая диагностика туберкулеза

- **Бактериоскопический** метод: микроскопия мазков (окраска по Цилю-Нельсену) из патологического материала, в т. ч. из обогащенной мокроты гомогенизацией или флотацией.
- **Бактериологический** метод: посев на среду Левенштейна–Иенсена и др., микрокультивирование по Прайсу и др.
- **Серологический** метод: ИФА.
- **Биологический** метод: заражение морских свинок и кроликов.
- **Кожно-аллергические пробы** путем внутрикожного введения туберкулина. Более точная – проба Манту. Положительная реакция развивается через 6-10 недель после проникновения возбудителя. Препараты: туберкулин Коха, или альт-туберкулин (стерильный фильтрат культуры микобактерий); очищенные белковые дериваты – PPD и PPD-Л, производные альт-туберкулина.

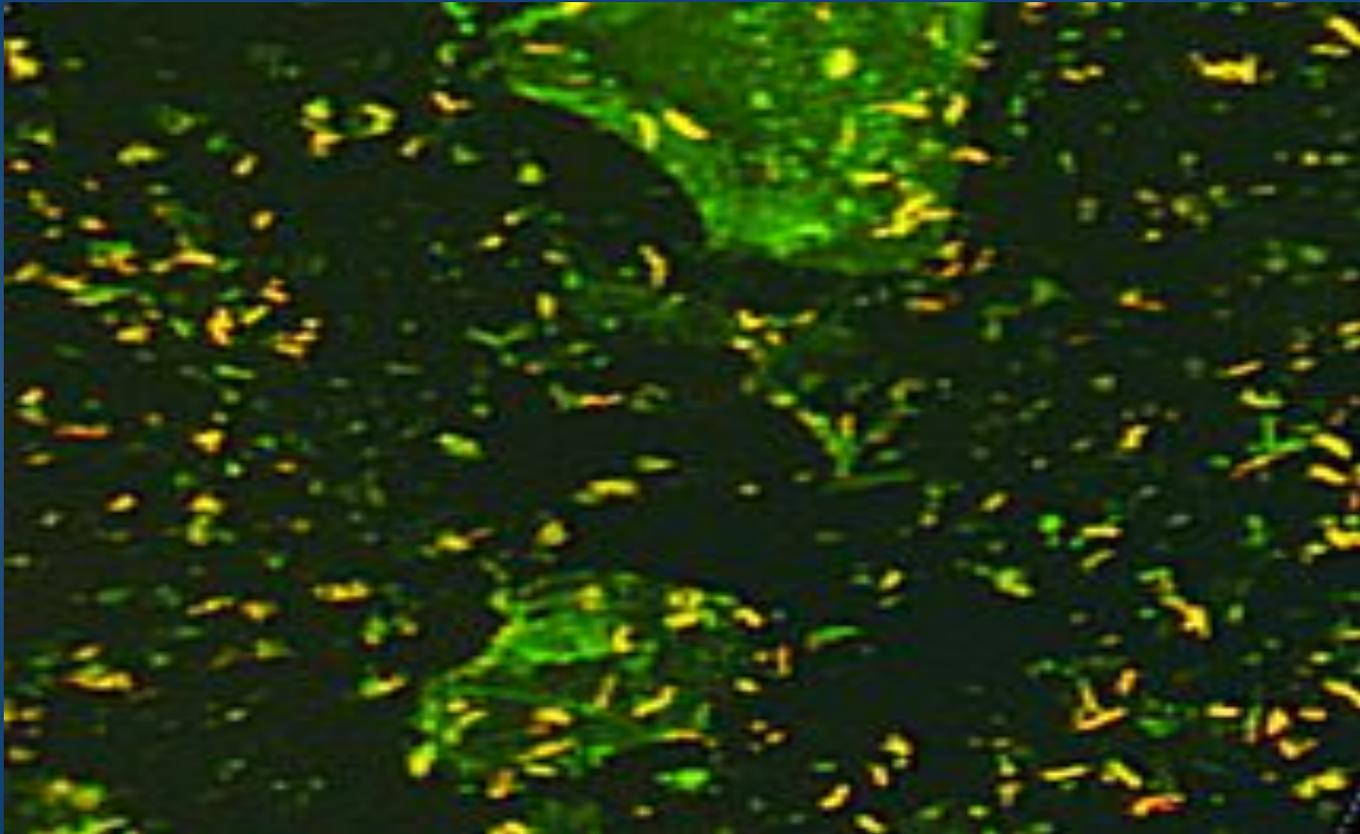
продолжение

- Молекулярно-генетический метод: ПЦР; метод геной дактилоскопии возбудителя - Саузерн-блот-гибридизация с использованием инсерционного элемента (IS) в качестве зонда.
- Специфическая профилактика. Применяется живая вакцина BCG (БЦЖ), впервые полученная Кальметом и Гереном из бычьего типа туберкулезной палочки путем многократных пересевов на картофельно-глицериновой среде с желчью. Вакцину вводят ребенку внутрикожно на 2-5 день после рождения и далее в сроки календаря прививок. Ослабленным детям вводят менее реактогенную вакцину BCG-M.

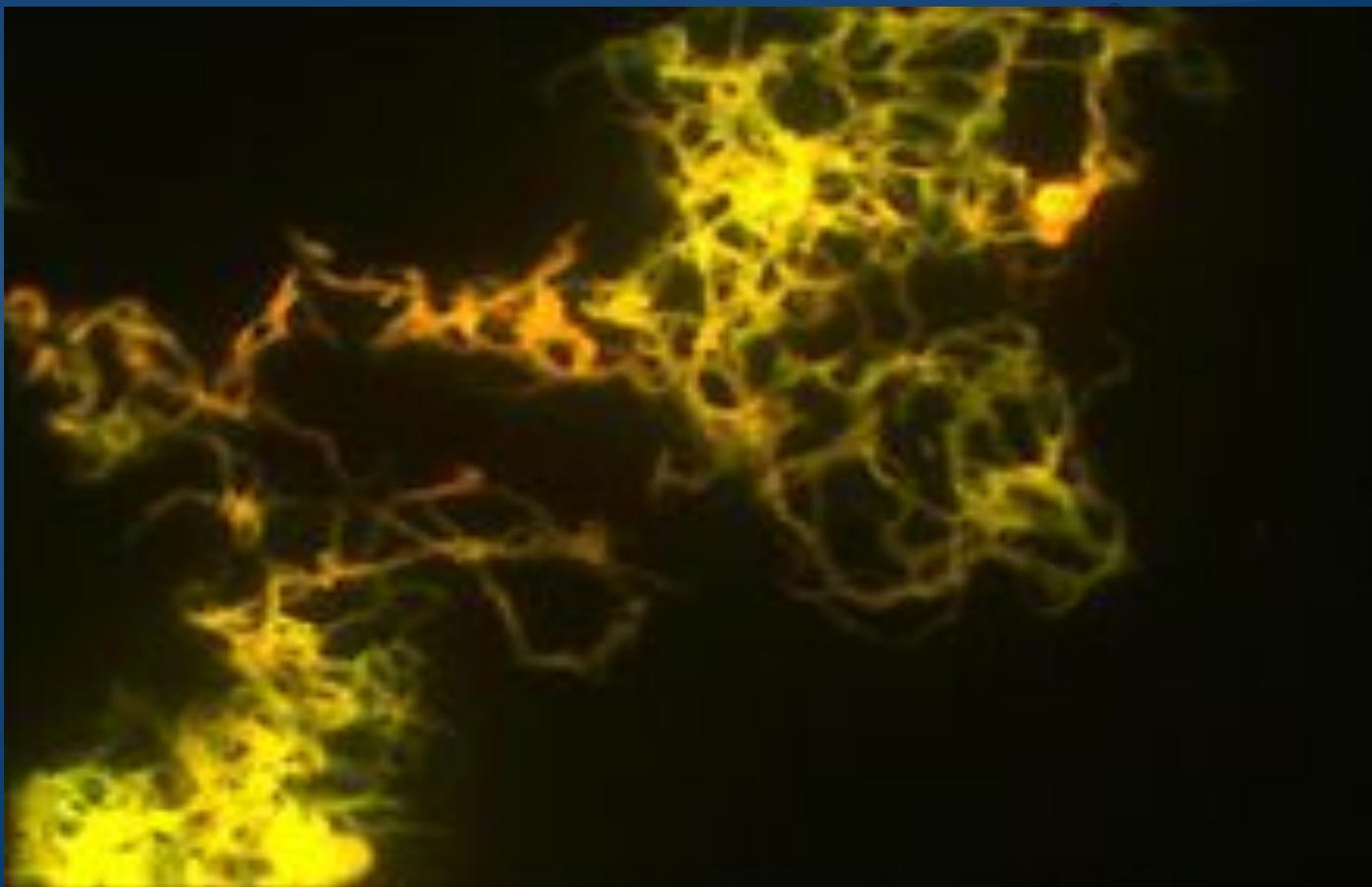
Микобактерии туберкулеза. Окраска по Цилю-Нильсену.



Люминисцентная микроскопия.



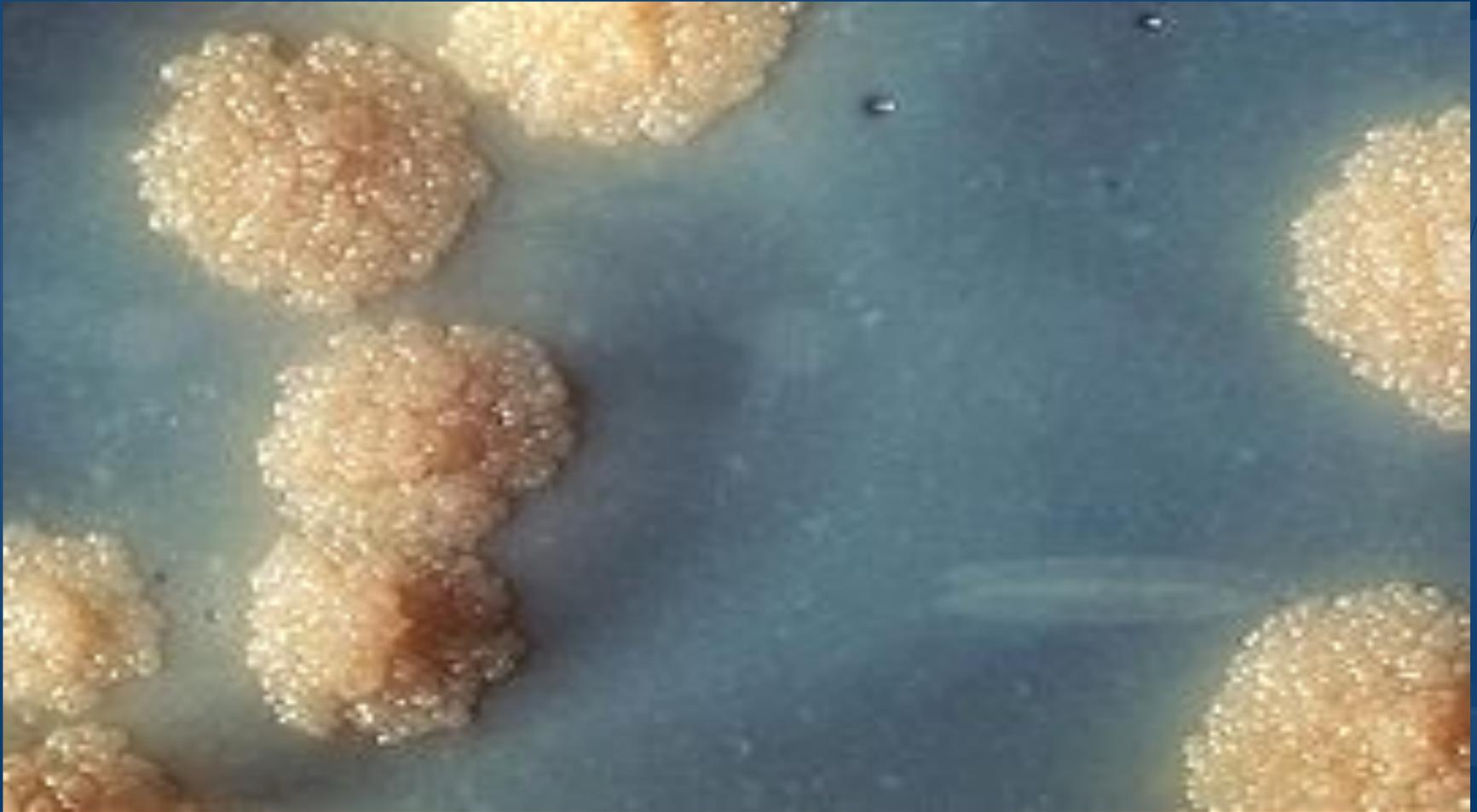
Корд-фактор при люминисцентной микроскопии



Посев культуры микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена



Колонии микобактерии туберкулеза



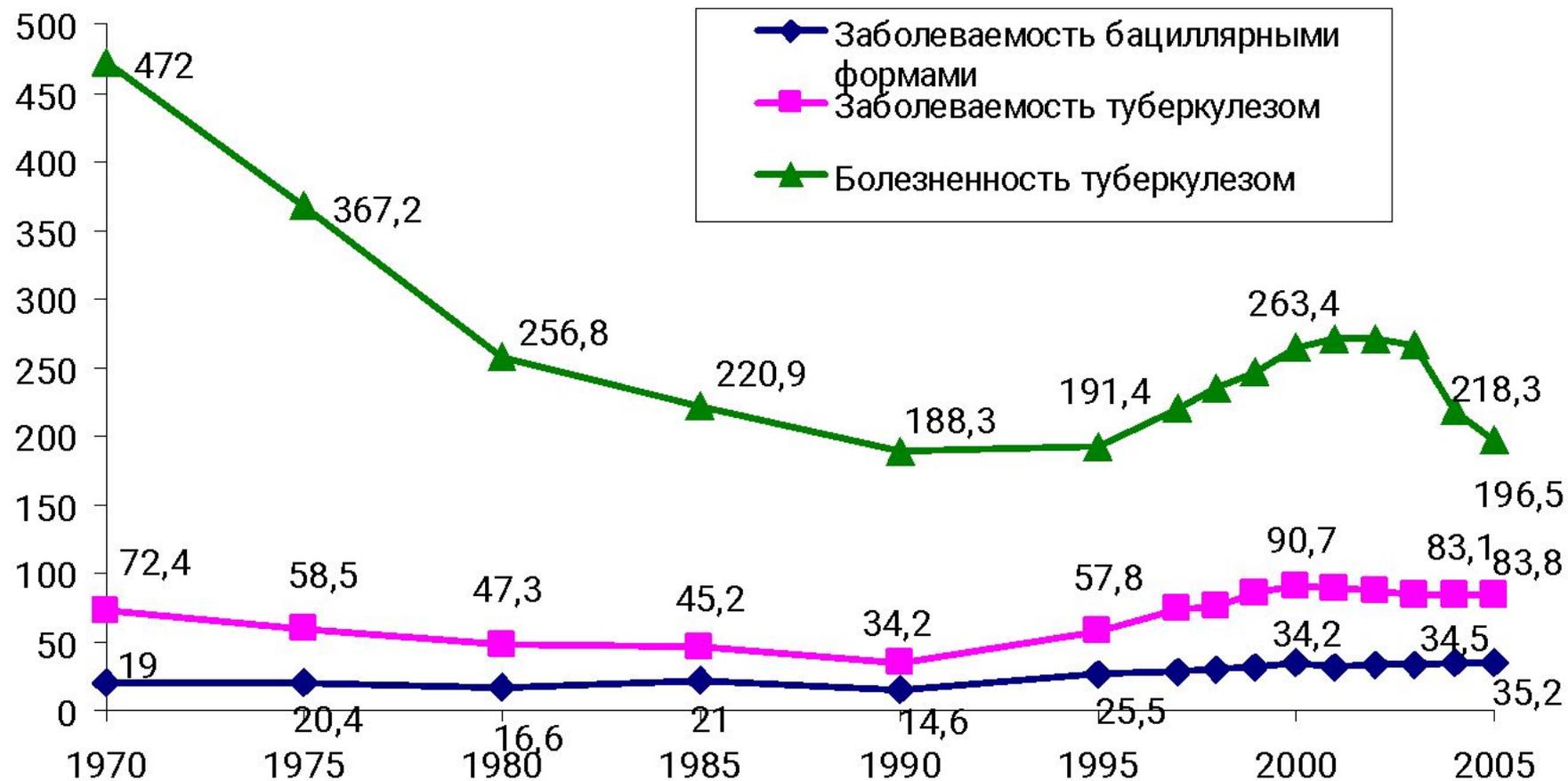
Эпидемиологическая ситуация

По данным ВОЗ в мире ежегодно заболевают открытой формой туберкулеза 8 млн. человек, закрытой формой – 10 млн. человек. Умирают от туберкулеза 3-4 млн.

Заболеваемость (на 100 тыс. человек) туберкулезом в развитых странах европейского региона (1997 г.)

Страна	Общая заболеваемость	Заболеваемость БК+
Австрия	16,5	4,5
Англия	10,1	1,5
Греция	7,3	2,7
Германия	13,6	4,1
Испания	17,5	7,5
Италия	8,5	3,3
Франция	11,4	4,0

Динамика заболеваемости туберкулезом, в том числе бациллярными формами, и распространенности туберкулеза (на 100 000 человек) в Российской Федерации



Эпидемиологическая ситуация в РФ (2005)

- **Туберкулез является основной причиной смерти от инфекционных и паразитарных заболеваний в России (87,2%)**
- С 1992 года увеличение заболеваемости туберкулезом в **2,5 раза**
- Заболеваемость – 83,8 на 100 тыс., распространенность – 196,5 на 100 тыс. населения
- Увеличение показателя заболеваемости детей - 16,4 на 100 тыс. детского населения
- 3290 пациентам диагноз туберкулеза установлен посмертно
- Значительный рост больных с рецидивами туберкулеза – 12,3% от общего числа впервые выявленных больных, в 2004 г. – 6,6% соответственно
- Мигранты, лица БОМЖ, освобожденные из мест лишения свободы - заболеваемость - 1561 на 100 тыс.

Профилактика туберкулеза – вакцинация и ревакцинация БЦЖ

- 1914 г. – исследователи из Франции А. Calmette и Ж. Guerin после 13 лет пассажей *M. bovis* на картофельной среде с глицерином и бычьей желчью получили аттенуированный штамм BCG
- Вакцинация BCG проводится в 64 странах, в 118 странах рекомендована ВОЗ
- Осложнения вакцинации – БЦЖ-иты:
 1. Наличие слабой вирулентности вакцинного штамма
 2. Проведение вакцинации
 - нарушение техники внутрикожного введения препарата
 - нарушение показаний к проведению прививки
 - сопутствующая патология у ребенка до прививки и в период развития прививочной реакции

Схема диагностического обследования на туберкулез (Визель А.А., Гурылева М.Э., 1999 г.)

■ Расспрос

а) жалобы: слабость, головная боль, повышение температуры тела, ночные поты, постоянное подкашливание, кашель с мокротой, кровохарканье, боль в грудной клетке, постепенно нарастающая одышка, снижение массы тела

б) анамнез: контакт с больными туберкулёзом, перенесённый туберкулёз, остаточные туберкулёзные изменения в лёгких, психические и физические травмы, гиперинсоляция (интенсивное ультрафиолетовое облучение), применение медицинских банок, лечение стероидными гормонами и иммунодепрессантами. Сопутствующие заболевания: сахарный диабет, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, пневмокониозы, алкоголизм, хронические заболевания органов дыхания.

■ **Физикальное обследование:** напряжение и/или болезненность мышц верхнего плечевого пояса, ограничение в подвижности половины грудной клетки при дыхании, притупление перкуторного звука, различная высота стояния диафрагмы или различная подвижность нижних краёв лёгких; различные локальные аускультативные феномены (при диссеминированном туберкулёзе — двусторонние).

■ **Туберкулиновая чувствительность:** переход реакции на пробу *Манту* из отрицательной в положительную в течение последнего года, резко положительная реакция, везикуло-некротическая реакция. При тяжёлом состоянии — отрицательная реакция.

■ **Лабораторные исследования:** увеличение СОЭ до 16-40 мм/ч при незначительном лейкоцитозе или его отсутствии, лимфопения, моноцитоз, умеренный нейтрофильный сдвиг лейкоцитарной формулы влево. Выявление микобактерий в мазке мокроты, при исследовании с использованием флотации и при посеве.

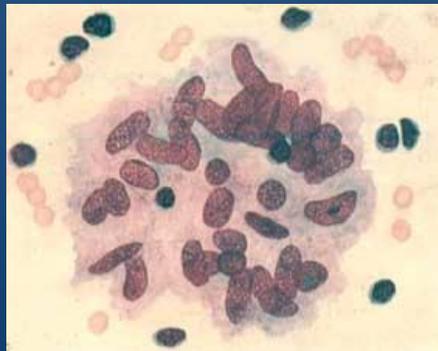
■ **Рентгенологическое исследование:** наличие диссеминации с преобладающей или исключительной локализацией в верхних отделах лёгких. Локальные поражения I, II, VI сегментов (очаги, инфильтраты, особенно инфильтраты с распадом, полости без уровня жидкости, фокусы). Одностороннее или асимметричное изменение корней лёгких, наличие кальцинатов, подтянутость корней вверх.

■ **Бронхологическое исследование:** признаки активного туберкулёза бронха, рубцы, деформация бронхов, неспецифический регионарный эндобронхит, наличие бронхо-нодулярных фистул.

Комплексная диагностика туберкулеза

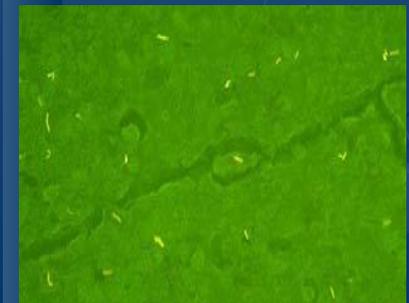
Прямые методы (выявление МБТ)

- Бактериоскопия - с окраской по Ziehl-Neelsen или с помощью флуорохромных красителей
- Культуральный – посев на плотные питательные среды – Левенштейна-Йенсена и Финна II
- ПЦР
- гистология

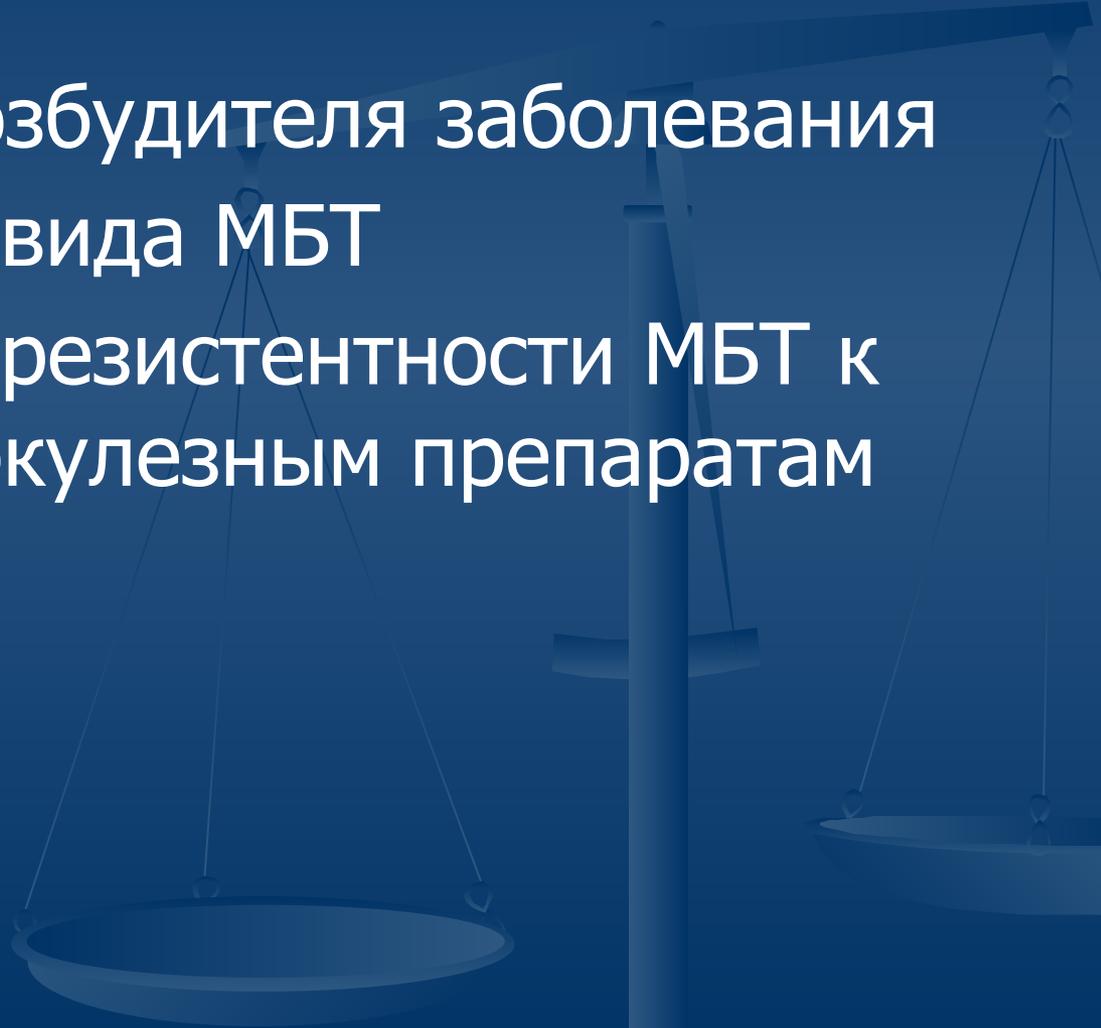


Косвенные методы

- Лучевая диагностика
- Туберкулинодиагностика
- Клинические данные
- Терапия ex juvantibus



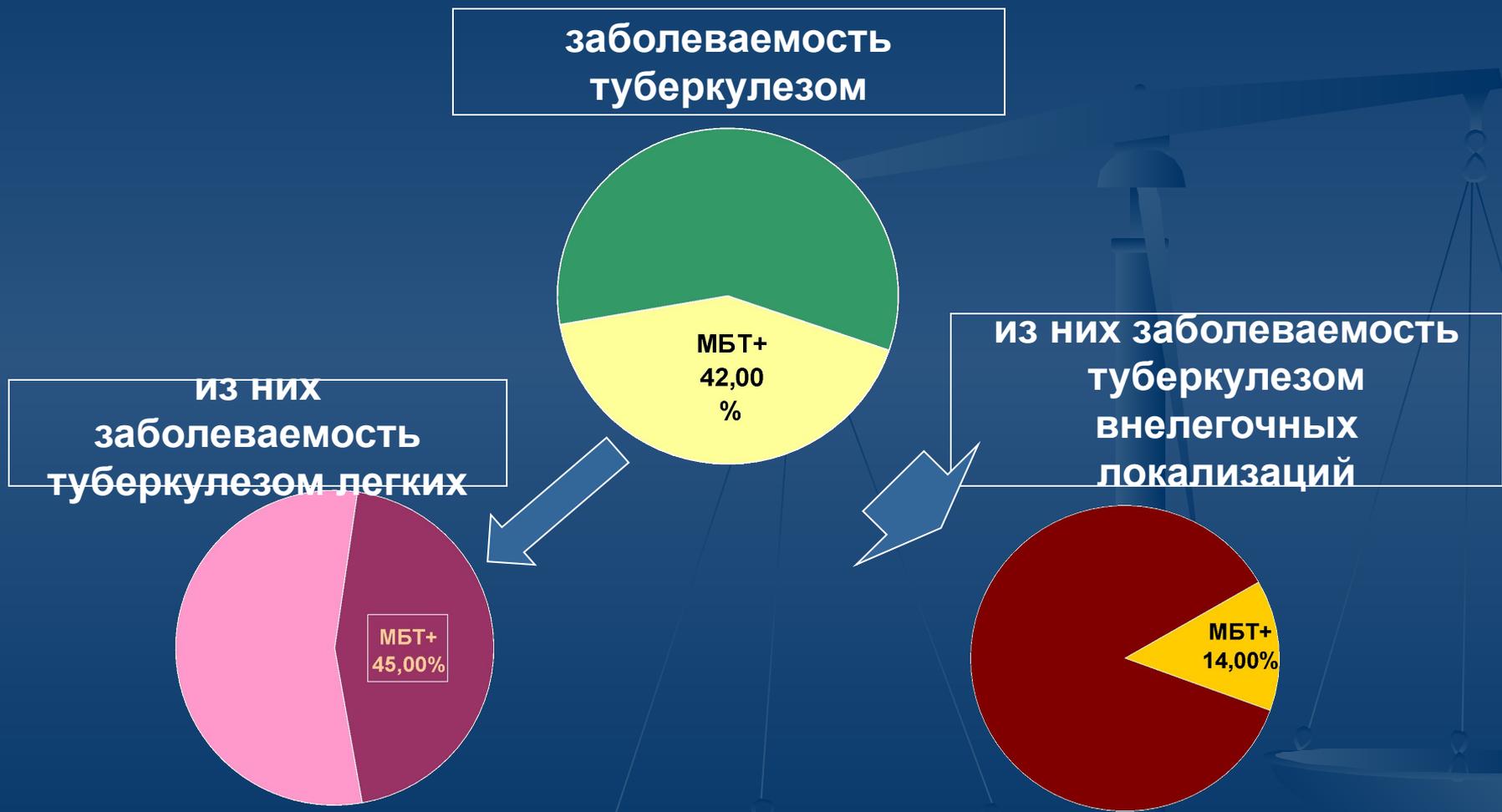
Микробиологическая диагностика туберкулеза

- выявление возбудителя заболевания
 - определение вида МБТ
 - определение резистентности МБТ к противотуберкулезным препаратам
- 

Методы выявления и дифференцирования микобактерий туберкулеза

	бактериоскопия	культуральный метод	биопроба	ПЦР
Аналитическая чувствительность	10^5-10^6 мт/мл	10^3-10^4 мт/мл	Единицы в заражаемой дозе	10^2-10^4 коп./мл
Аналитическая специфичность	Низкоспецифичный	Высокоспецифичный (б/х тесты)	Высокоспецифичный	Высокоспецифичный
Возможность дифференцирования	нет	M. tuberculosis/ M.bovis + M.bovis BCG	M. tuberculosis/ M.bovis + M.bovis BCG	M. tuberculosis/ M.bovis / M.bovis BCG
Длительность анализа выявления	1 день	от 4 до 12 недель	от 4 до 12 недель	1 день
Длительность анализа дифференцирования	-	3-9 недель от начала роста	После забоя органы исследуют микробиологически и гистологически	1 день

Частота заболеваемости туберкулезом с бактериовыделением при различных его локализациях в России (2005 г.)



Министерство здравоохранения Российской
Федерации

Приказ

от 21 марта 2003 года № 109

О совершенствовании противотуберкулезных
мероприятий в Российской Федерации

Москва
2003 г.

Аналитические характеристики бактериоскопии при выявлении микобактерий

Чувствительность: 10^5 – 10^6 бактерий/мл

Специфичность: «Бактериоскопическое исследование – не позволяет дифференцировать микобактерии комплекса *Mycobacterium tuberculosis* от нетуберкулезных и сапрофитных микобактерий. Различную степень кислотоустойчивой окраски можно наблюдать не только у микобактерий, но и у других микроорганизмов. Это могут быть *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Legionella*, а также цисты *Cryptosporidium* и *Isospora*.

На основании микроскопического исследования возможно сделать заключение только о наличии или отсутствии в препарате **кислотоустойчивых микобактерий (КУМ).**»

Приказ от 21 марта 2003 года № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации»

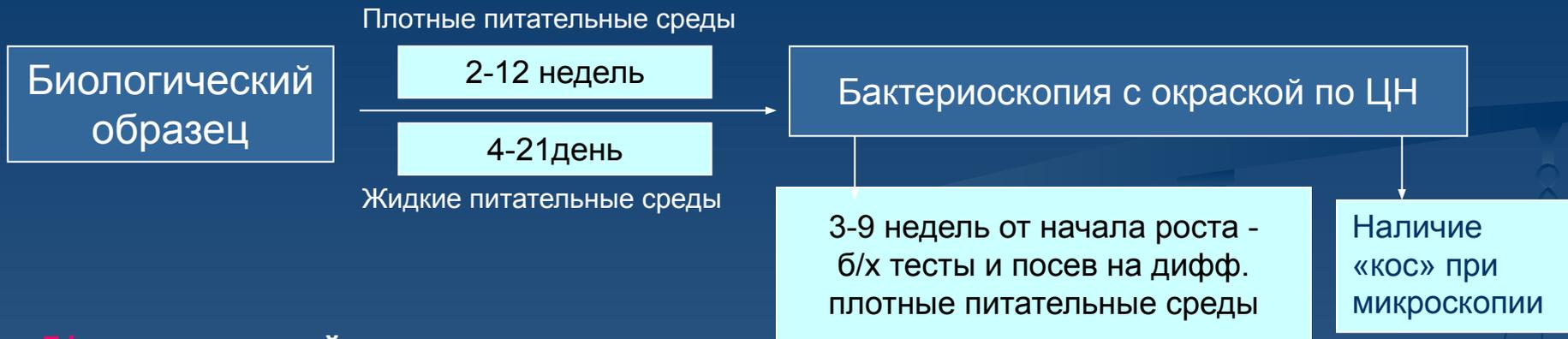
Ложноположительные результаты бактериоскопии

- Плохая обработка многоразовых флаконов для сбора материала, в которых могут оставаться микобактерии
- Повторное использование предметных стекол после положительного предыдущего мазка
- Применение предметных стекол с царапинами, в результате чего появляются артефакты, которые могут быть ошибочно приняты за микобактерии
- Использование раствора фуксина, содержащего кристаллы
- Наличие микобактерий в иммерсионном масле, если пипетка, которой оно наносилось на мазок, случайно соприкасалась с положительным мазком
- Недостаточное обесцвечивание мазка, что может привести к сохранению красной окраски на некоторых некислотоустойчивых бактериях
- Пыльца некоторых видов сосны, которая может обнаруживаться в виде редко встречающихся в препарате коротких кокковидных палочек

Идентификация культур микобактерий комплекса *Mycobacterium tuberculosis*

- При культуральном исследовании ответ о выделении кислотоустойчивых микобактерий дается только после микроскопии окрашенного по Ziehl-Neelsen мазка из выросших колоний
- Предварительное заключение о выделении МБТ м.б. сделано опытным бактериологом на основании характерных признаков, но подтверждение принадлежности выделенной культуры микобактерий к комплексу *M.tuberculosis* на основании специальных биохимических лабораторных тестов является обязательным.
- Необходимо сочетание вышеуказанных характерных признаков с результатами биохимических тестов (ниациновый тест, наличие нитратредуктазной активности, наличие термостабильной каталазы, наличие роста на среде с салициловокислым натрием и др.)

Методы дифференцирования микобактерий туберкулеза



Б/х тесты выросшей культуры для дифференцирования от НТМБ:

основные

- ниациновый тест
- наличие нитрат-редуктазной активности
- наличие термостабильной каталазы
- наличие роста на среде с салициловокислым натрием (1 мг/мл)

дополнительные

- наличие роста на среде с паранитробензойной кислотой
- наличие роста на среде с 5% хлоридом натрия

для дифференцирования *M. tuberculosis* от *M. bovis*

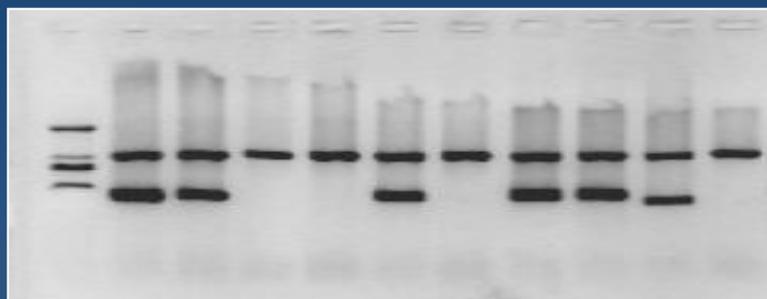
- ниациновый тест
- наличие нитрат-редуктазной активности
- наличие пиразинамидазы
- рост на среде, содержащей 2 мкг/мл гидразида тиофен -2 карбоксилловой кислоты (ТСН)

Биологическая проба – разная чувствительность морских свинок и кроликов к *M. tuberculosis* и *M. bovis*

Дифференцирование *Mycobacterium tuberculosis* complex – специфичность до 95%

Тест-системы для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* производства ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

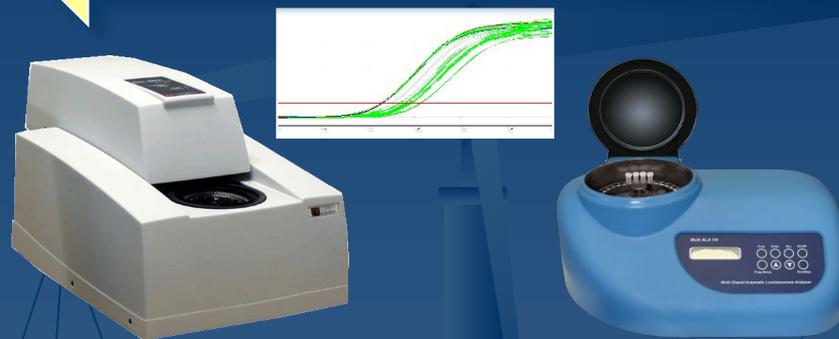
Электрофоретическая детекция



- Строгая организация ПЦР-лаборатории
- Существует риск контаминации

«АмплиСенс® МБТ»

Флуоресцентная детекция



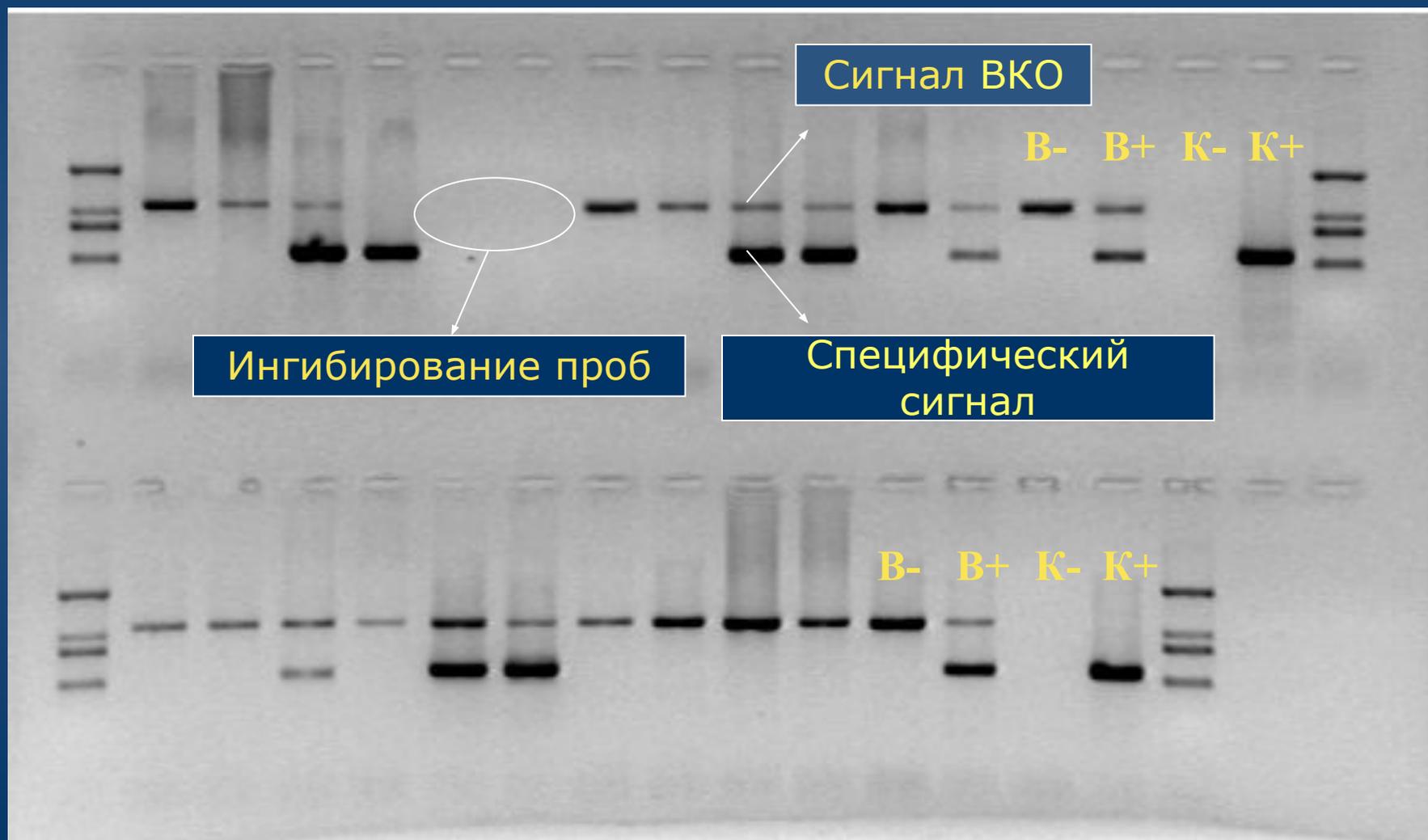
В ходе реакции – **RealTime (FRT)** По конечной точке – **EndPoint (FEP)**

- Существенно быстрее
- Риск контаминации минимален

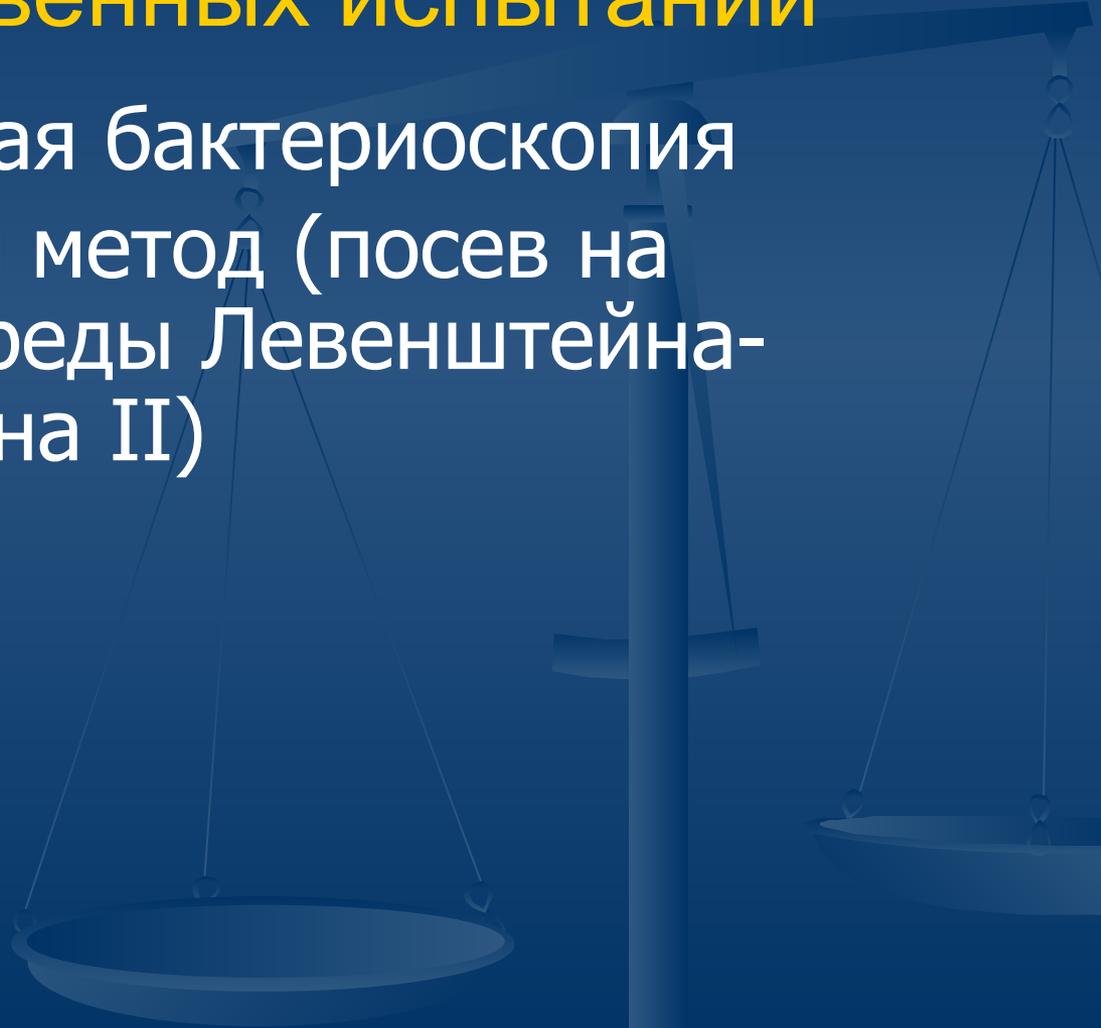
«АмплиСенс® МТС–FI/**FRT**»

«АмплиСенс® МТС–FI/**FEP**»

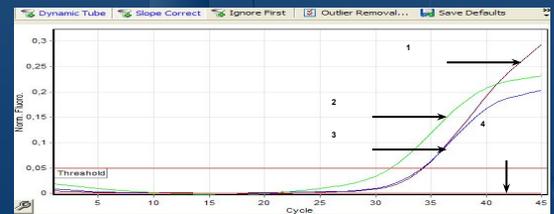
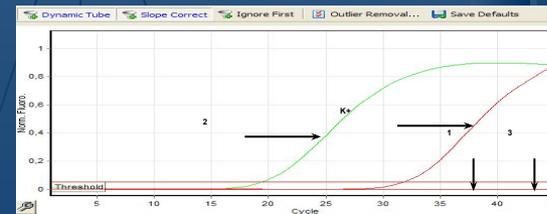
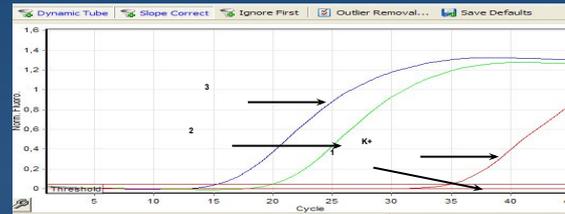
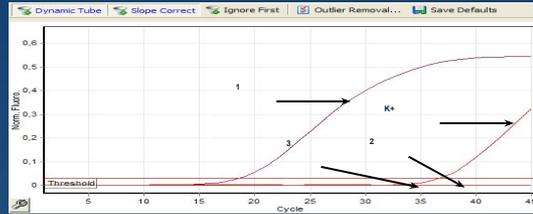
Выявление ДНК микобактерий туберкулеза с помощью ПЦР-тест-системы «АмплиСенс® МБТ»



Методы лабораторной диагностики, включенные в программу Государственных испытаний

- Люминесцентная бактериоскопия
 - Культуральный метод (посев на питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финна II)
 - ПЦР
- 

Тест-система «АмплиСенс® МТС diff-FI» адаптирована для прибора Rotor Gene 6000



Образец	Наименование теста	Результат
Sample1	mtodiff	M. tuberculosis
Sample2	mtodiff	M. bovis BCG
Sample3	mtodiff	M. bovis
B-	mtodiff	neg
K+	mtodiff	M. tuberculosis + M. bovis + M. bovis BCG



Внелегочный туберкулез

❖ Туберкулез органов пищеварительной системы

❖ Туберкулез глаз.



❖ Туберкулез центральной нервной системы и мозговых оболочек



❖ Туберкулез органов мочеполовой системы

❖ Туберкулез костей и суставов



❖ Туберкулез кожи



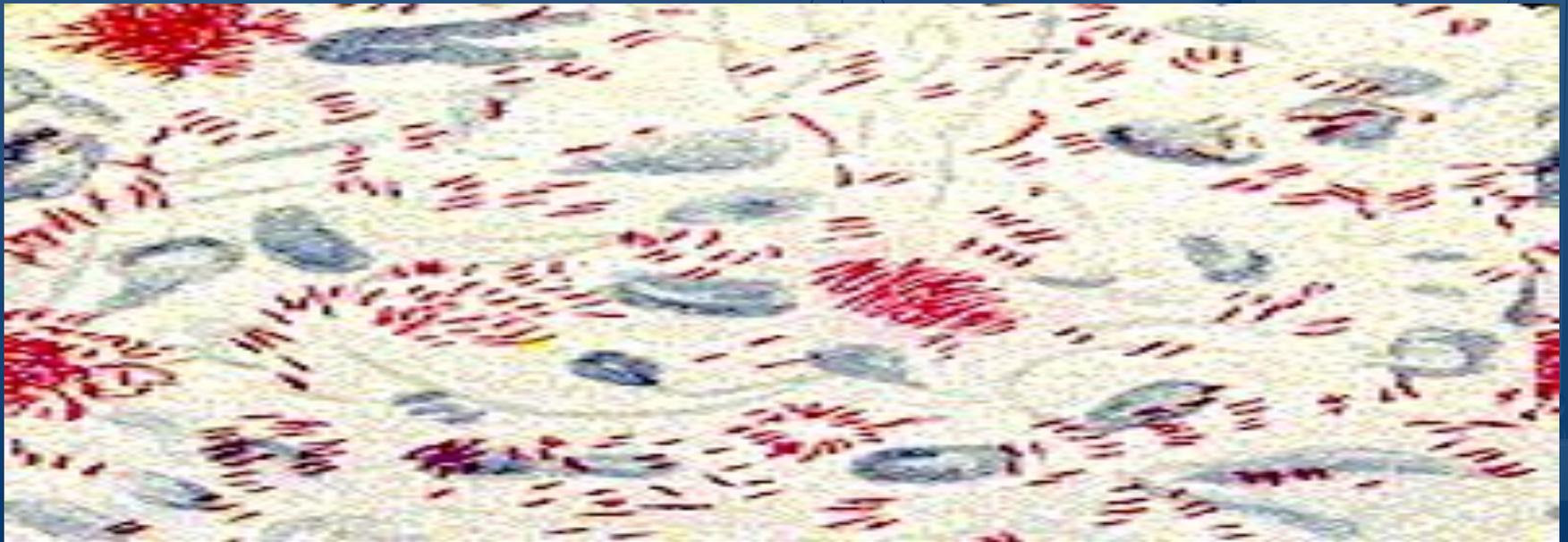
Микобактерии проказы (лепры) - *Mycobacterium leprae*

- *Mycobacterium leprae* - микобактерии, вызывающие проказу (лепру, или болезнь Гансена) редко встречающееся хроническое заболевание, протекающее в виде трех клинических форм - лепроматозной, туберкулоидной и недифференцированной. Поражаются кожа, слизистые оболочки и периферическая нервная система, верхние дыхательные пути, глаза, яички.
- Заражение происходит от человека к человеку воздушно-капельным и контактным путем.
- *M. leprae* - облигатный внутриклеточный паразит; на питательных средах не растет; культивируется на животных (только на броненосцах).

Микобактерии проказы (лепры) - *Mycobacterium leprae*

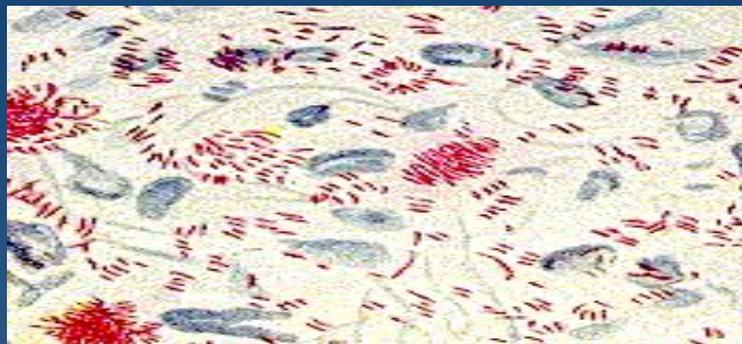
Mycobacterium leprae - микобактерии, вызывающие проказу (лепру, или болезнь Гансена) редко встречающееся хроническое заболевание, протекающее в виде трех клинических форм - лепроматозной, туберкулоидной и недифференцированной.

Поражаются кожа, слизистые оболочки и периферическая нервная система, верхние дыхательные пути, глаза, яички. Заражение *M. leprae* - облигатный внутриклеточный паразит; на питательных средах не растет; культивируется на животных (только на броненосцах).

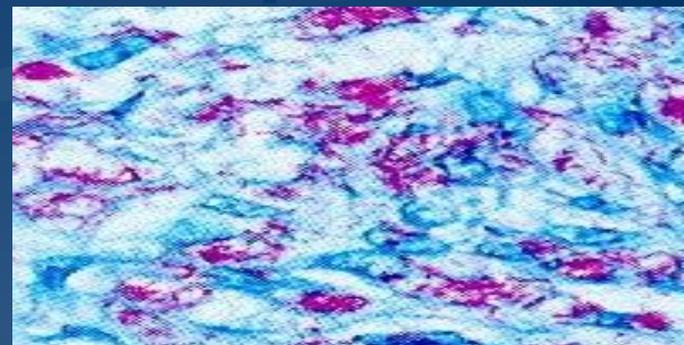


Mycobacterium leprae в лепрозном бугорке (окраска по Цилю-Нельсену)

Рисунок



Препарат



M. leprae - по морфологическим и тинкториальным признакам сходны с туберкулезными палочками; отличаются меньшей кислотоустойчивостью. Окрашиваются по Цилю-Нельсену в красный цвет. Неподвижны. Располагаются внутриклеточно: параллельными рядами, наподобие пачки сигар, очень редко по одиночке или под углом

Микробиологическая диагностика

- . Бактериоскопический метод: в мазках из соскоба кожи, препаратах из лепром, окрашенных по Цилю-Нельсену, обнаруживают внутриклеточно параллельно расположенные кислотоустойчивые палочки. Возбудитель выявляется, обычно, только при лепроматозной форме болезни.
- Кожно-аллергическая проба путем внутрикожного введения лепромина (суспензии убитых микобактерий лепры, полученных из лепром больного человека или броненосца): ранняя реакция развивается через 48 ч. (реакция Фернандеса), поздняя реакция – через 3-4 недели (реакция Мицуды). При лепроматозной форме реакция Мицуды обычно отрицательная, а при туберкулоидной – резко положительная (диаметр более 5 мм).
- Биологическая проба – заражение броненосцев.