

ГОУ ВПО «Московский государственный медицинский университет»

Николаева Елена Николаевна

профессор

кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии

ЛЕКЦИЯ № 5

Микобактерии. Туберкулез.

Основные вопросы

1. Краткая характеристика рода

***Mycobacterium*.**

2. Основные свойства *M. tuberculosis*.

3. Патогенез, иммунология и лабораторная диагностика туберкулеза.

4. Микобактериозы.

5. Лепра.

Таксономия



Царство *Bacteria*

Тип *Actinobacteria*

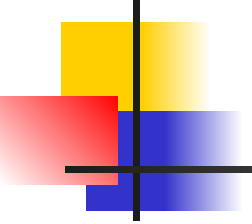
Подотдел 4: Бактерии с высоким %
содержания G+C

Порядок *Actinomycetales*

Подпорядок *Corynebacterineae*

Семейство *Mycobacteriaceae*

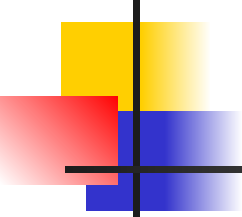
Род *Mycobacterium*

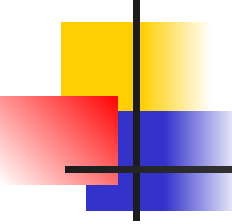


Род *Mycobacterium* насчитывает свыше 100 видов, большинство из которых являются сапрофитными микроорганизмами, широко распространенными в окружающей среде.

Он также включает патогенные виды микробов, вызывающих тяжелые заболевания, в том числе **туберкулез** и **лепру**.

Группа медленно растущих микобактерий

- 
1. ***M. tuberculosis*** – основной возбудитель **туберкулеза человека**
 2. ***M. bovis*** – возбудитель туберкулеза **КРС**, возбудитель **туберкулеза человека**
 3. ***M. africanum*** - возбудитель **туберкулеза человека**
 3. ***M. leprae*** – возбудитель **лепры**
 4. ***M. avium complex*** (около 20 видов) – возбудители **микобактериозов**



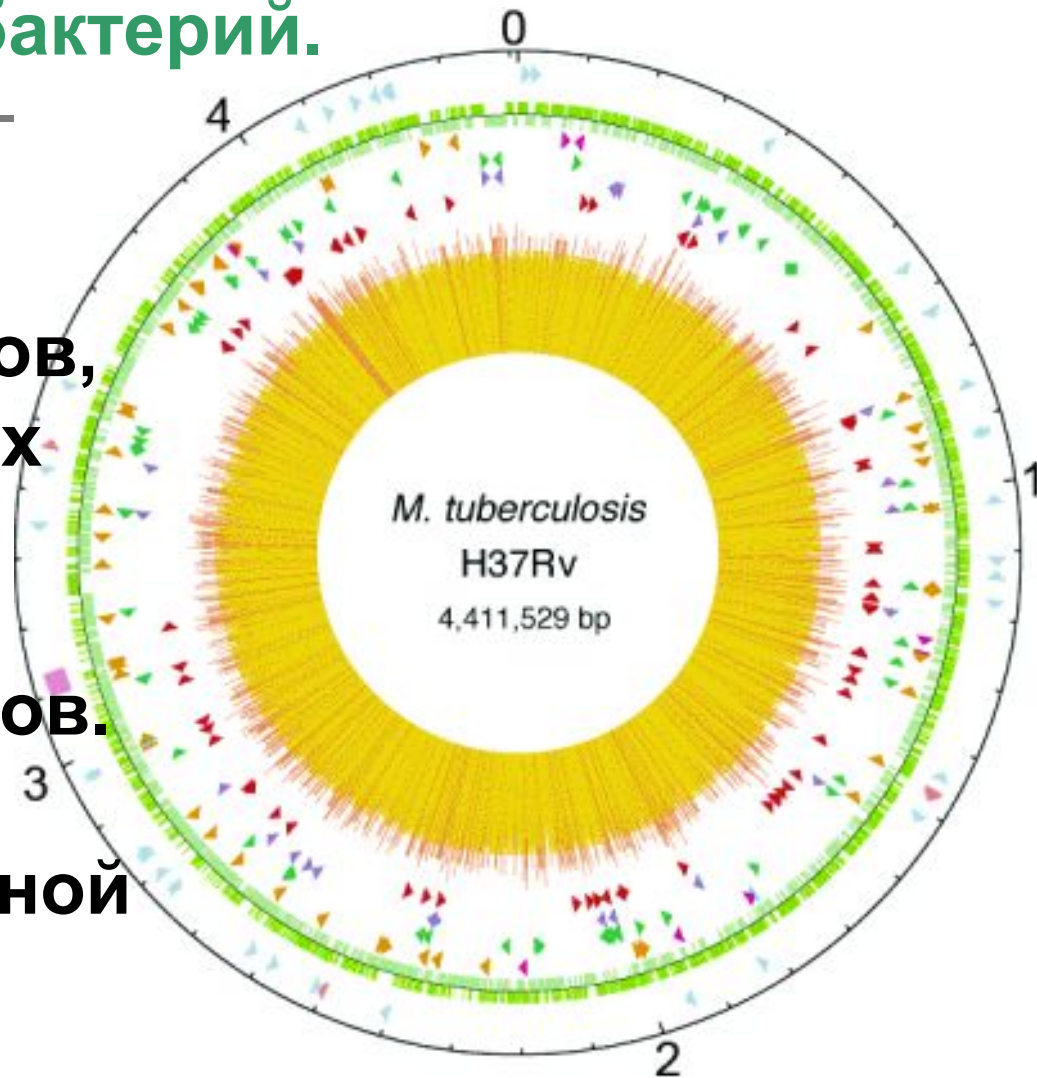
Этимологически слово «**микобактерия**» происходит из греческих слов **myces** — **гриб** и **bacterium, bactron** — **палочка, прутик**.

Приставка "**муco**" имеет двойное значение – **грибы** и **воск**.

Компонент названия «гриб» обусловлен тенденцией этих микроорганизмов образовывать **нитчатые и ветвящиеся формы**, похожие на плесень, а также наличие **восковых соединений** в клеточной стенке бактерий.

**Геном МБТ содержит 4000 генов
существенно отличается от генома других
бактерий.**

**Большая доля
кодирующих участков,
содержащих богатых
глицином повторов,
предназначена для
продукции ферментов.
Это может являться
источником антигенной
изменчивости.**

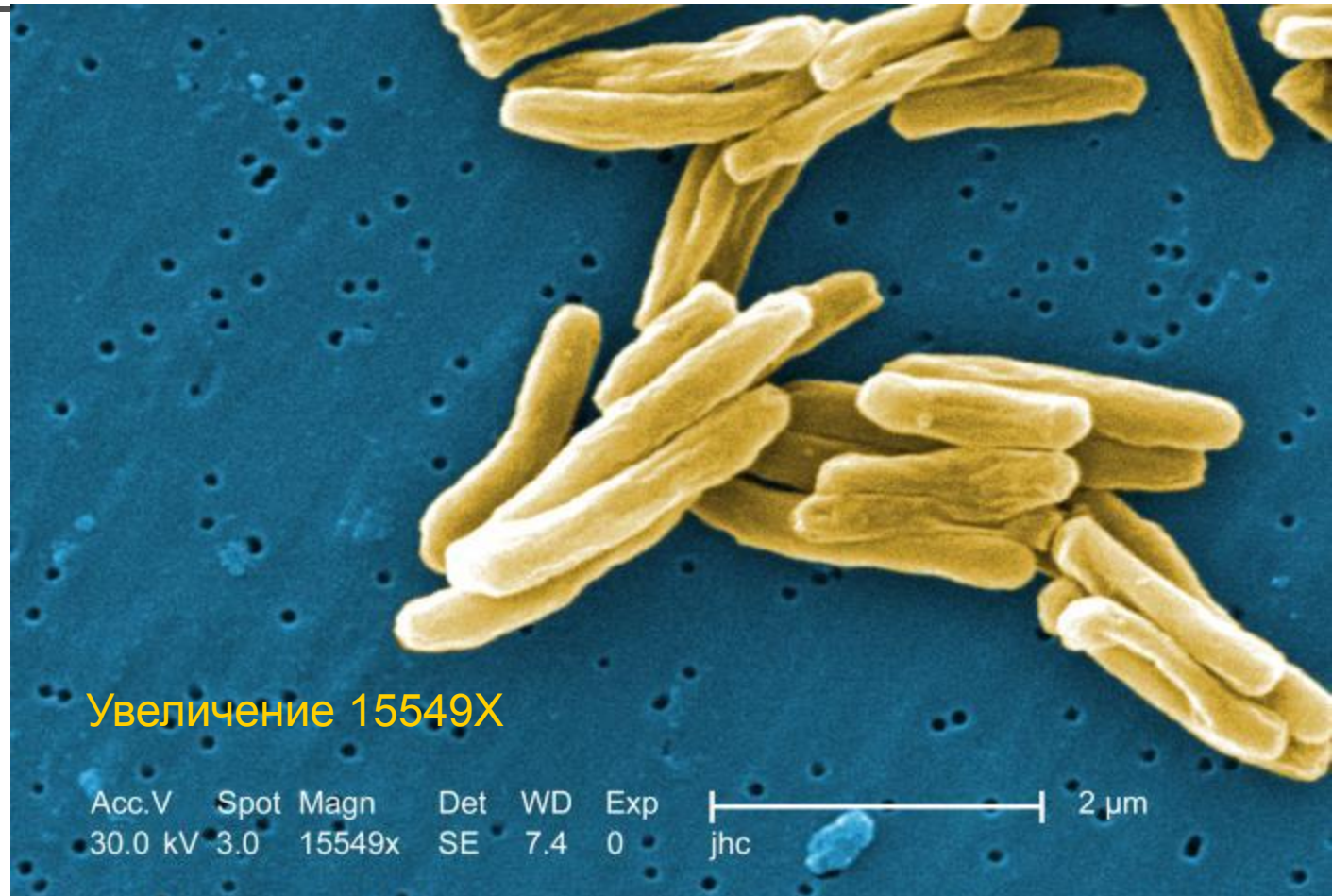


Морфологическая характеристика возбудителя:

Микобактерии

Полиморфные прямые или изогнутые палочки.

Неподвижны
(не имеют
жгутиков),
не образуют
спор



Сканирующая электронная микрофотография *Mycobacterium tuberculosis*.

Трансмиссионная электронная микрофотография

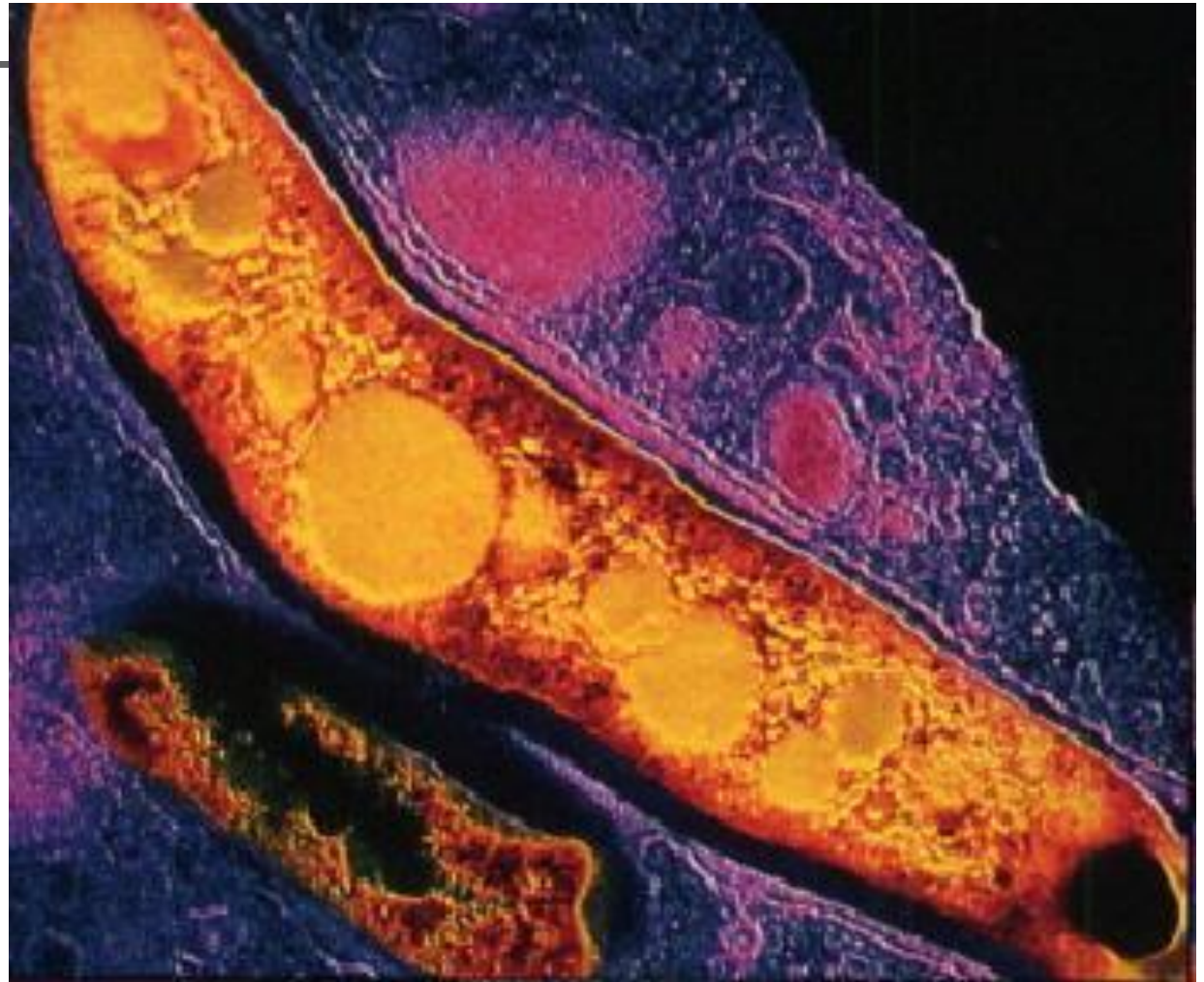
M. tuberculosis



имеют микрокапсулу

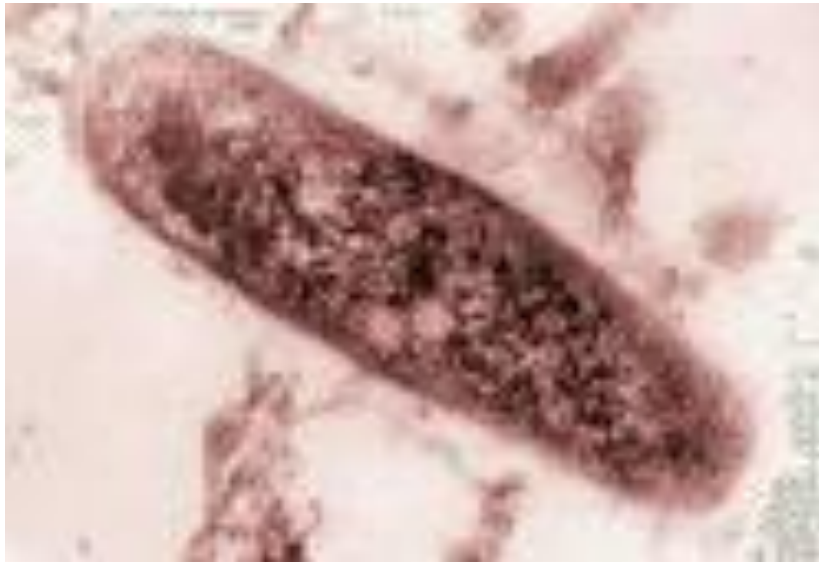
Трансмиссионная электронная микрофотография

M. tuberculosis



имеют микрокапсулу

способны образовывать
нитевидные и
мицелиальные структуры,
кокки, L-формы.





Микобактерии

Не окрашиваются
генцианвиолетом,
но имеют признаки
грамположительного типа
(не имеют **наружной**
мембраны).

Устойчивы к кислотам и
спиртам

По Цилю-Нильсену окрашены в красный цвет.

На фоне синего мазка красные палочки.

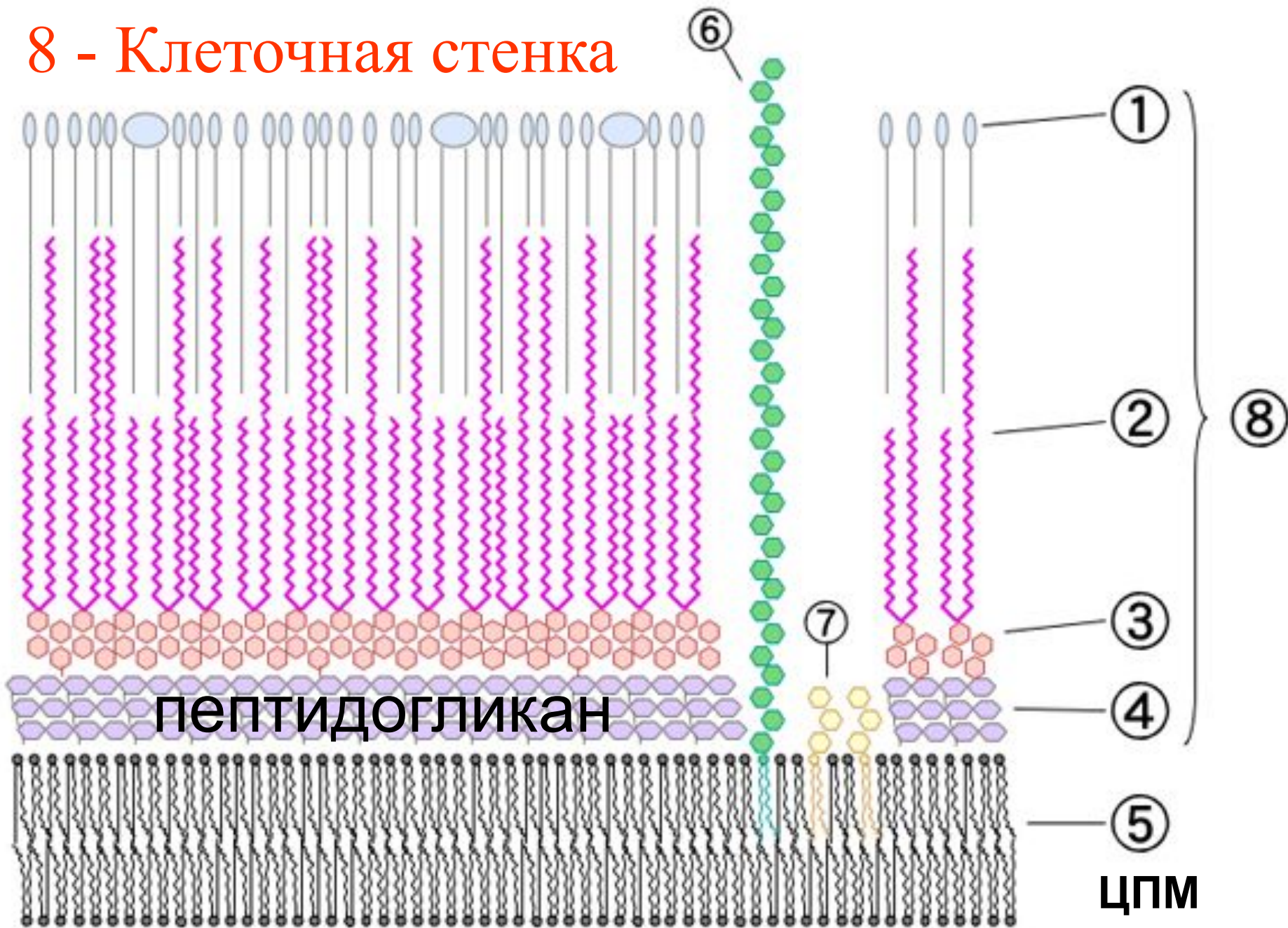




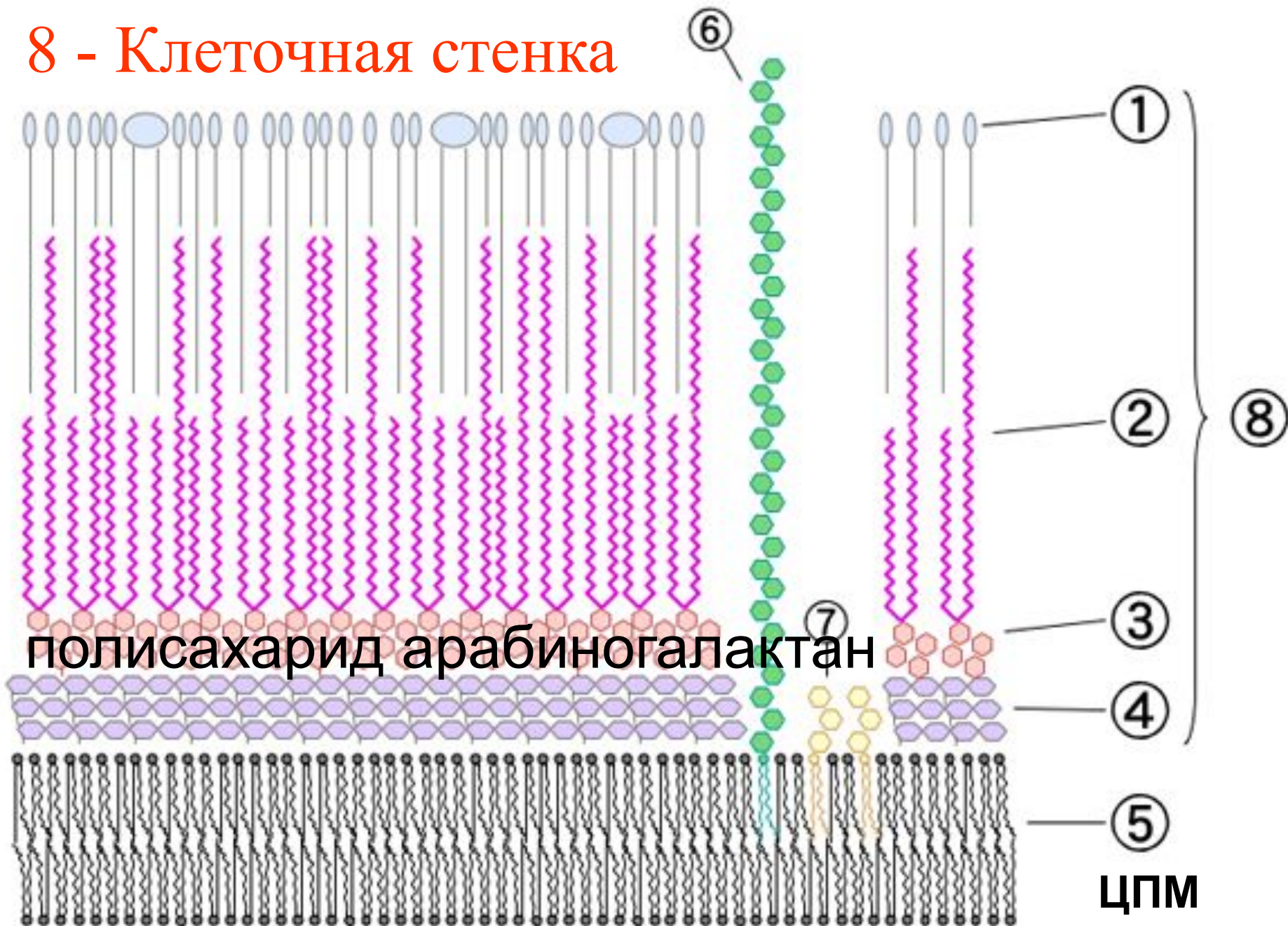
Кислотоустойчивость туберкулезных
палочек зависит от строения
клеточной стенки.

Она толще, чем у других бактерий,
гидрофобна, содержит много восков,
миколовых кислот/миколатов
(на 10 - 40 % и более состоит из липидов).

8 - Клеточная стенка



8 - Клеточная стенка

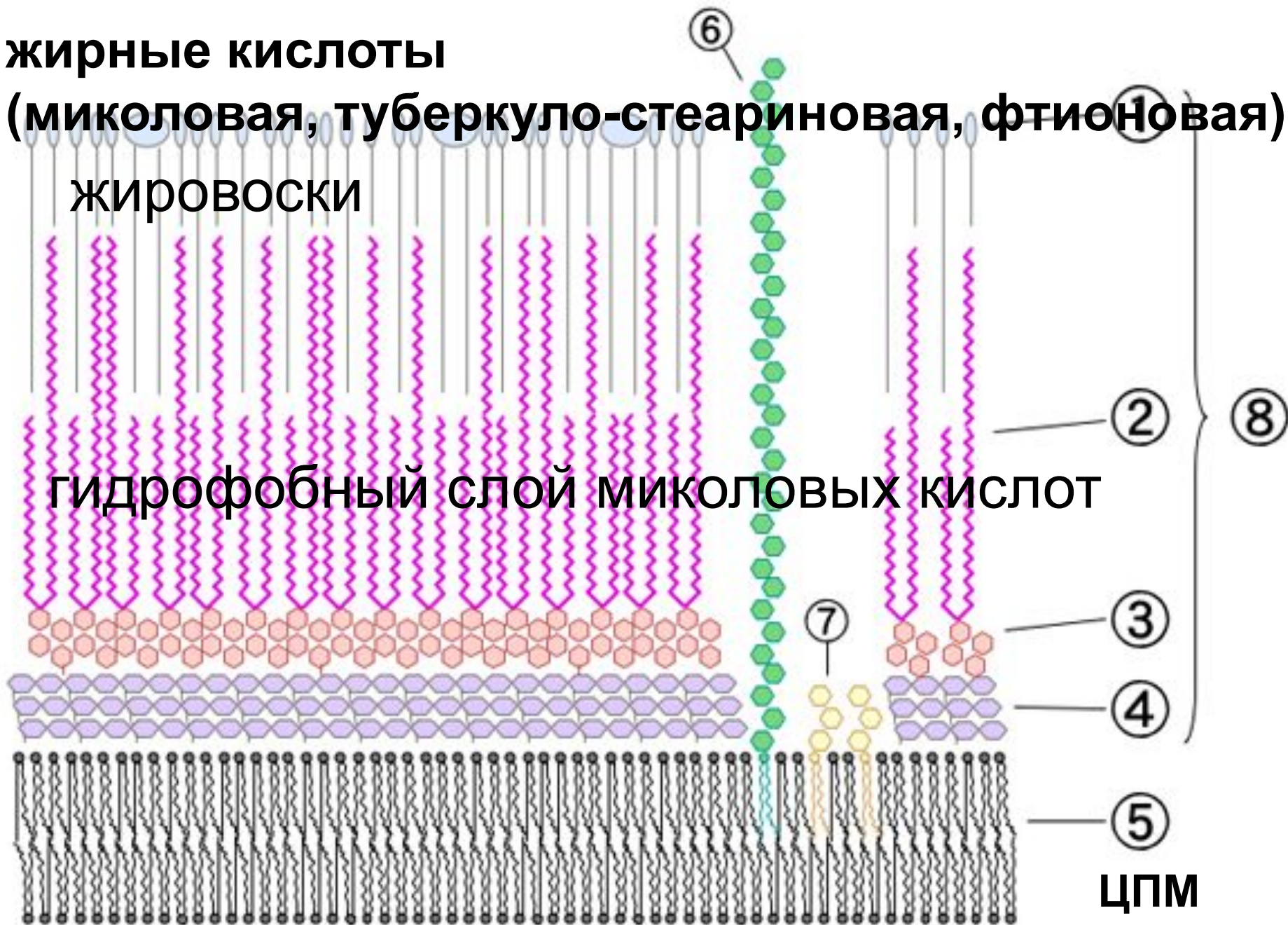


жирные кислоты

(миколовая, туберкуло-стеариновая, фтионовая)

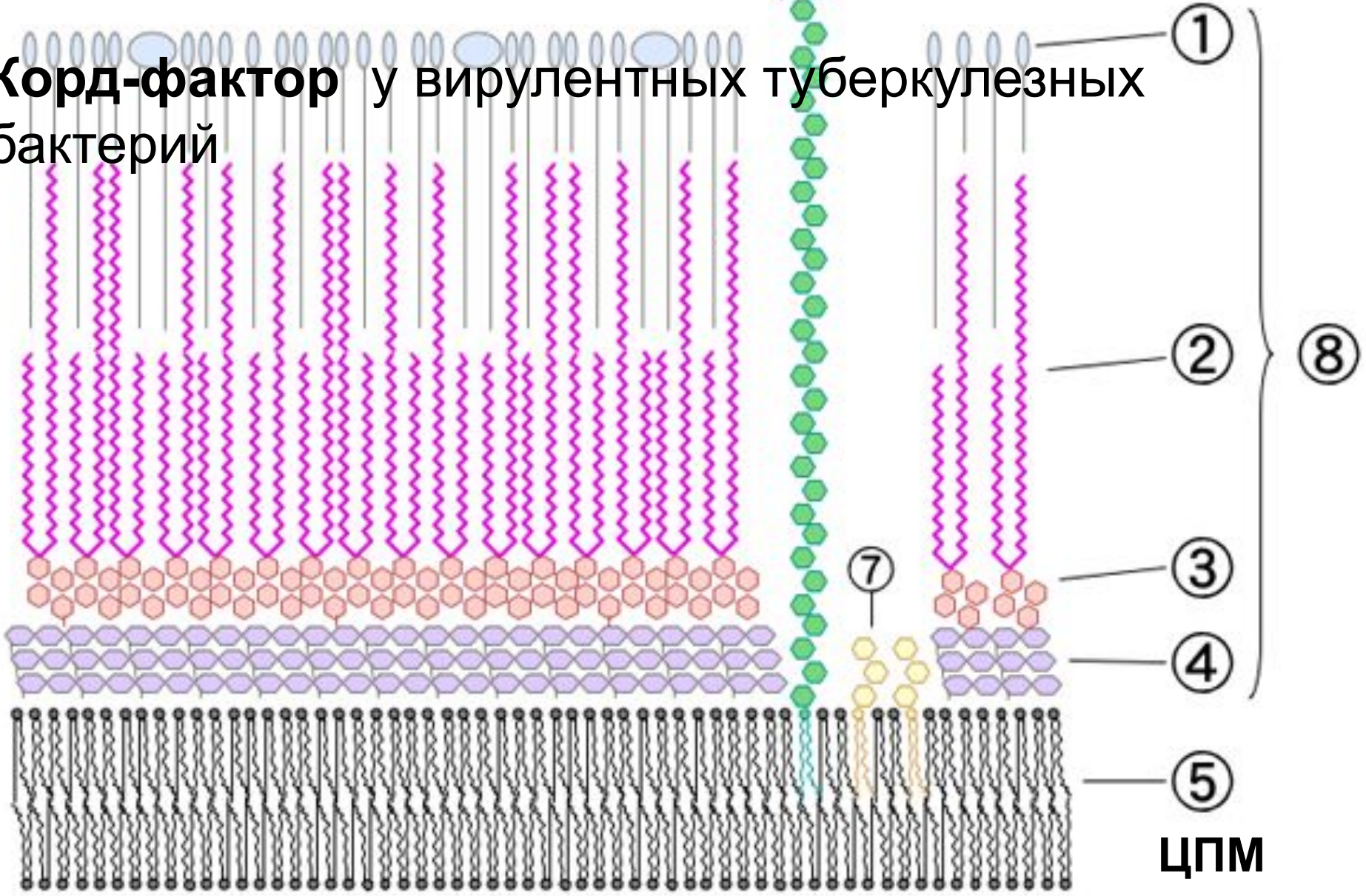
жировоски

гидрофобный слой миколовых кислот



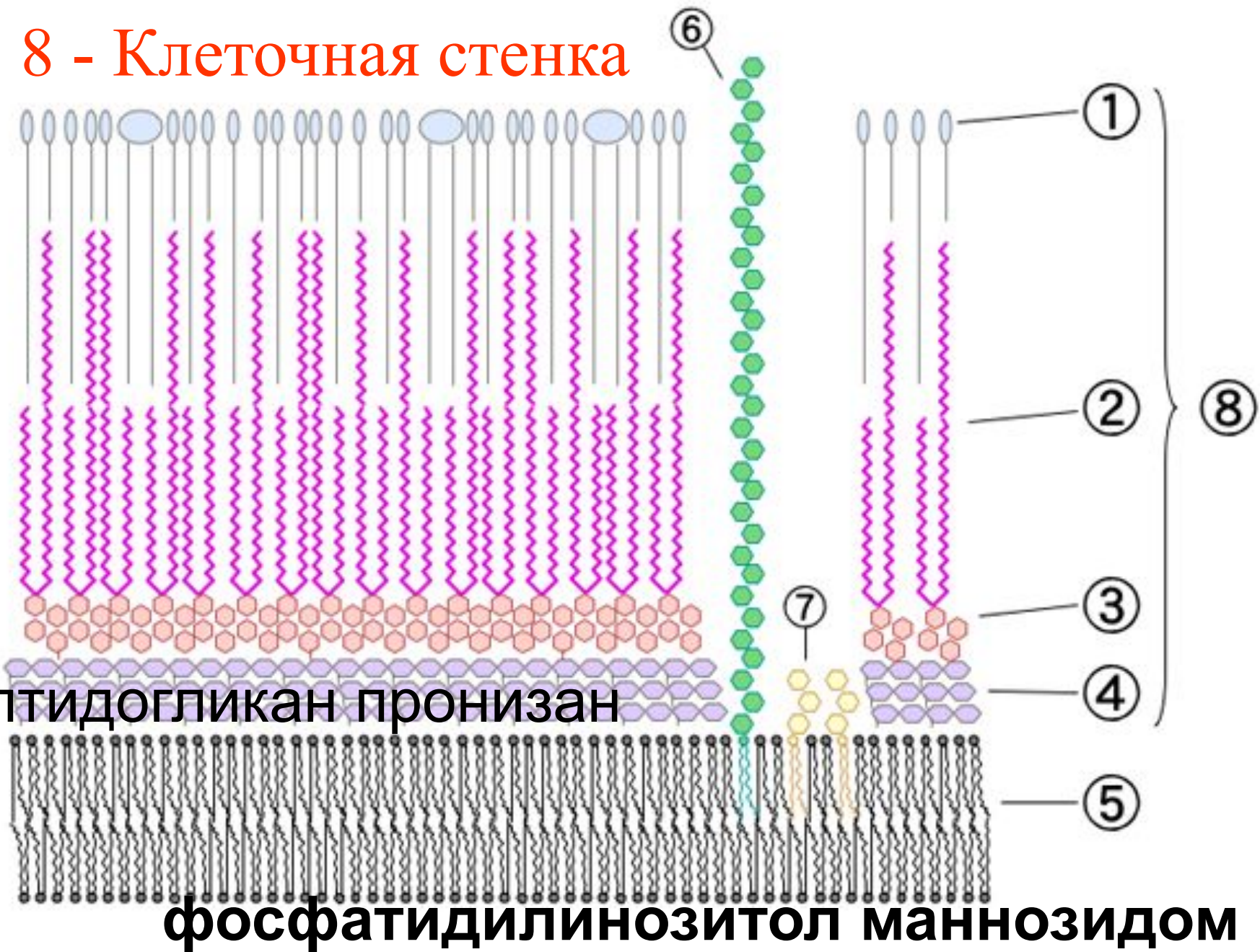
Поверхностные липиды

Корд-фактор у вирулентных туберкулезных бактерий

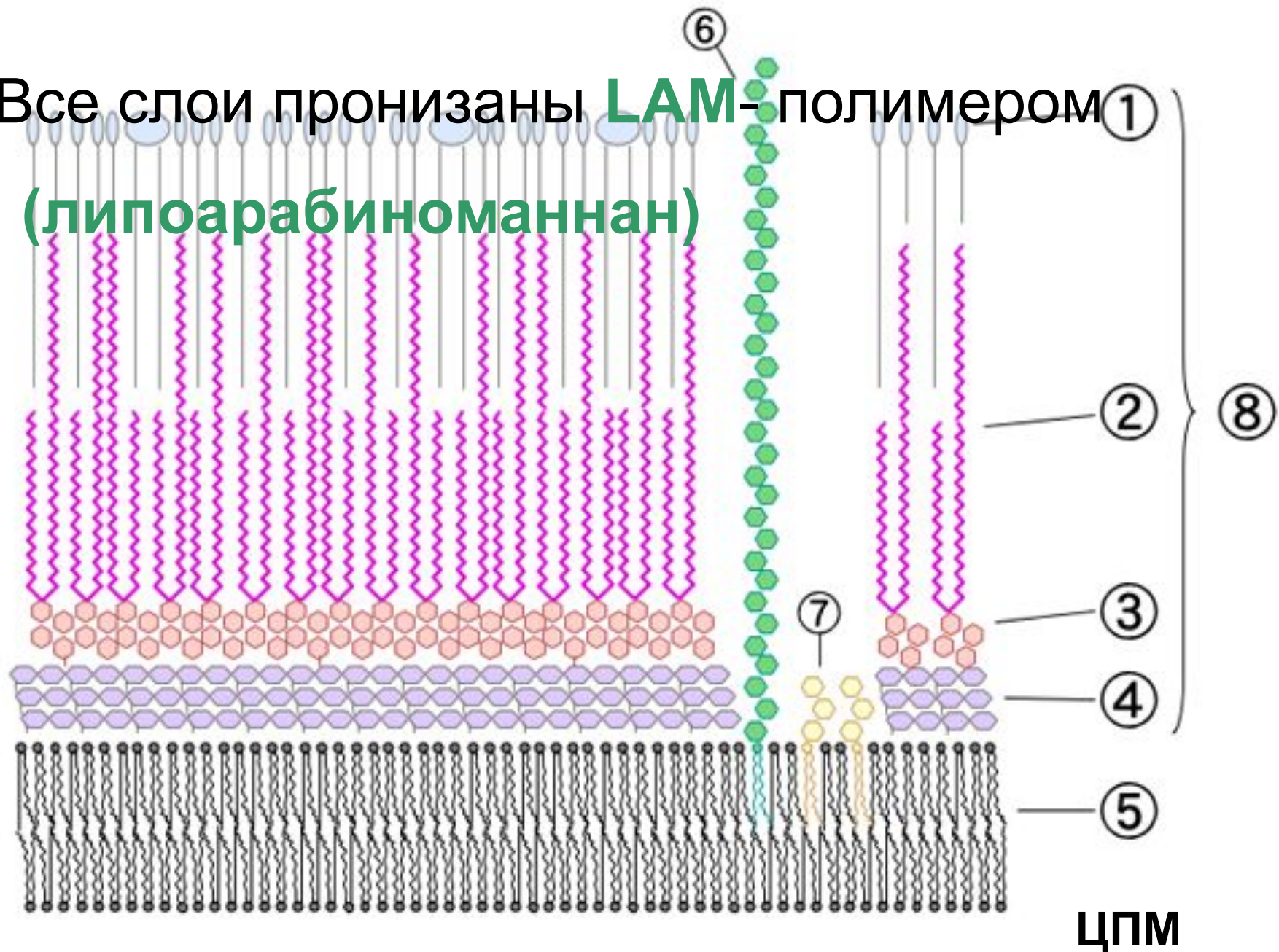


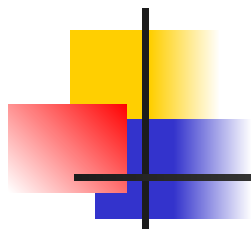
ЦПМ

8 - Клеточная стенка

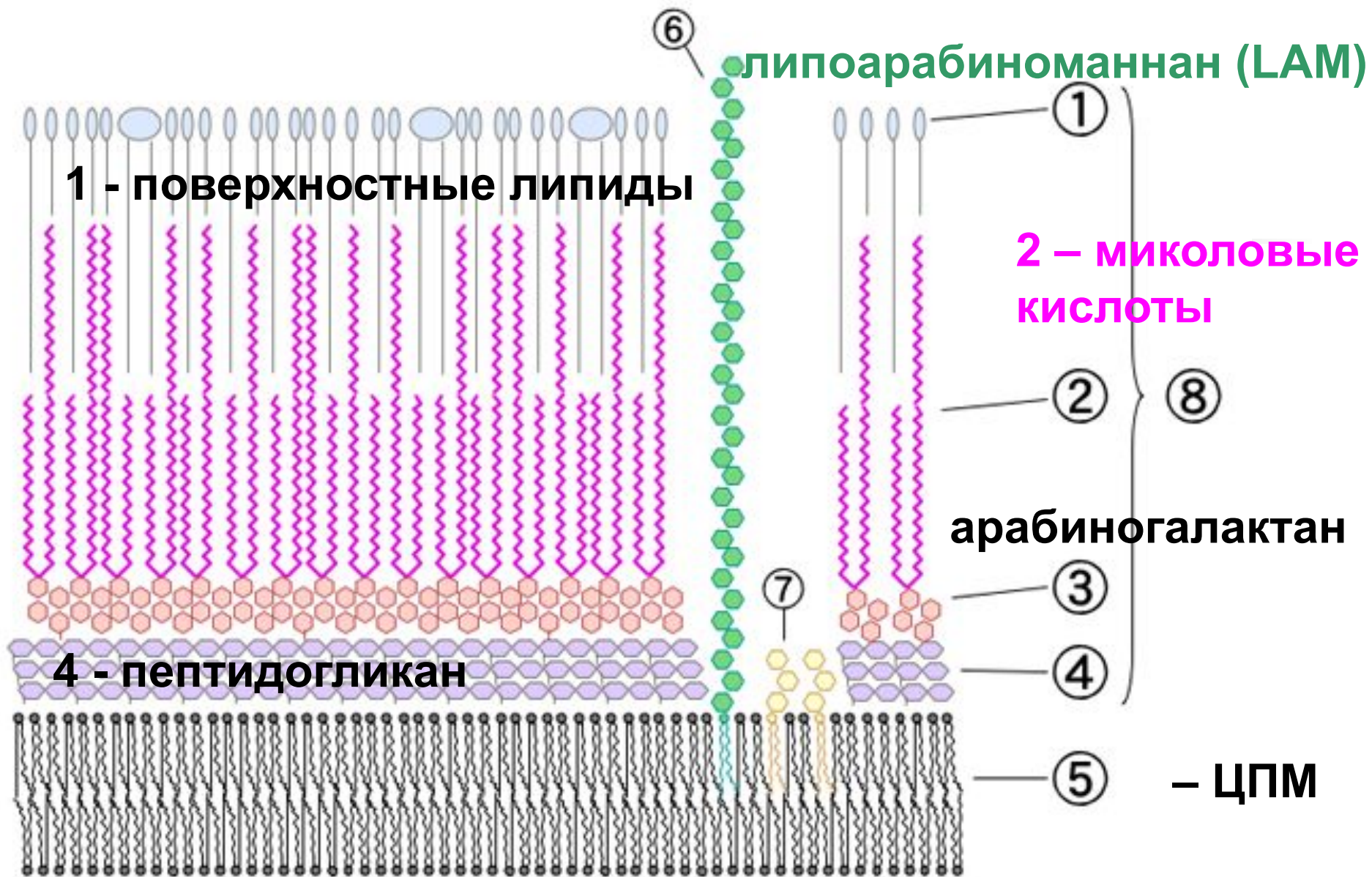


Все слои пронизаны **LAM**-полимером
(липоарабиноманнан)





**Терминальные фрагменты
ЛАМ - полимера не
специфически подавляют
активацию Т-лимфоцитов и
лейкоцитов периферической
крови.
Это приводит к нарушению
иммунного ответа на
микобактерии.**



7 – фосфатидилинозитол маннозид

Высокое содержание липидов и восков в клеточной стенке



обеспечивает устойчивость к

- кислотам,
- спиртам,
- щелочам,
- дезинфицирующим средствам,
- высушиванию и солнечным лучам,
- патогенность.

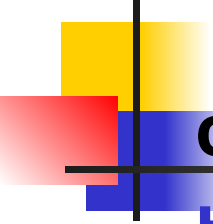
Липиды

(фосфолипиды, воск Д,
корд-фактор, миколовая,

туберкулостеариновая, фтионовая
кислоты).

- препятствуют фагоцитозу,
- нарушают проницаемость лизосом,
- вызывают развитие специфических гранул,
- разрушают митохондрии клеток,
- являются адъювантами

M. tuberculosis



сохраняют жизнеспособность при очень низких температурах, а повышение до **80°C** могут выдерживать в течение **5 мин.**

Во внешней среде микобактерия туберкулеза достаточно устойчива.

В воде она может сохраняться до **150 дней.**

Высохшие микобактерии вызывают туберкулез у морских свинок через **1-1,5 года,**

лиофилизированные и **замороженные** жизнеспособны до **30 лет.**



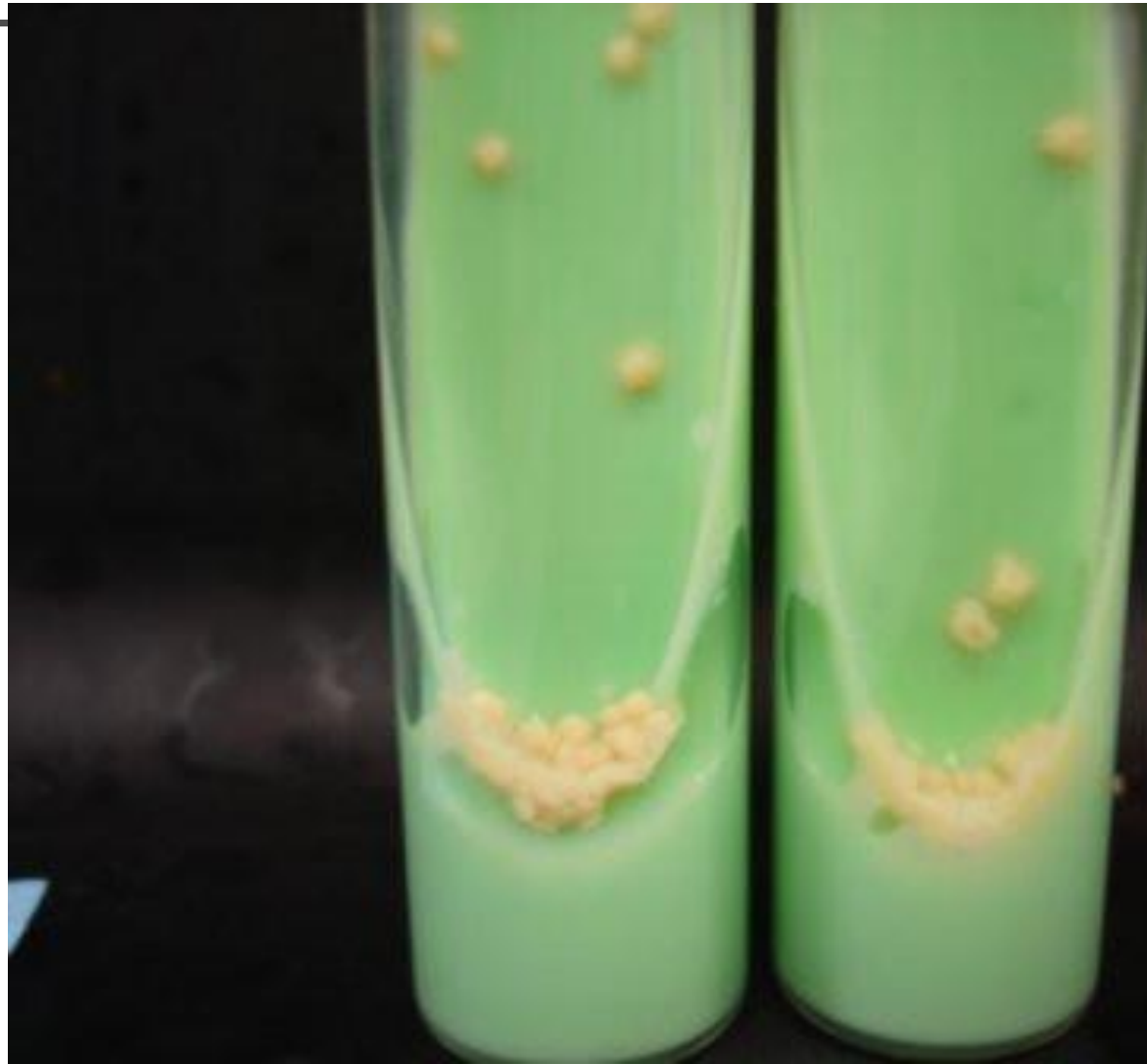
Культуральные свойства.

Тип дыхания – аэробы,

Требовательны к питательным средам.
глицеринозависимы.

Среды, для выделения чистой культуры.

Ловенштейна – Йенсена



Картофельно-глицериновая среда
с добавлением яиц.

малахитовая зелень

задерживает рост бактерий
кроме **туберкулезной палочки**



Ловенштейна – Йенсена



Среда Сотона

(B. Sauton, умер в 1916 г., французский микробиолог)

– синтетическая среда, содержит
аспарагин,
глицерин,
цитрат железа,
фосфат калия.

Финна 2

Отличие от среды **Ловенштейна – Йенсена** -
вместо β -аспарагина в ней используется глутамат натрия

Медленный рост (недели) в аэробных и факультативно-анаэробных **усло**виях

Двукратное увеличение количества бактерий

M. tuberculosis

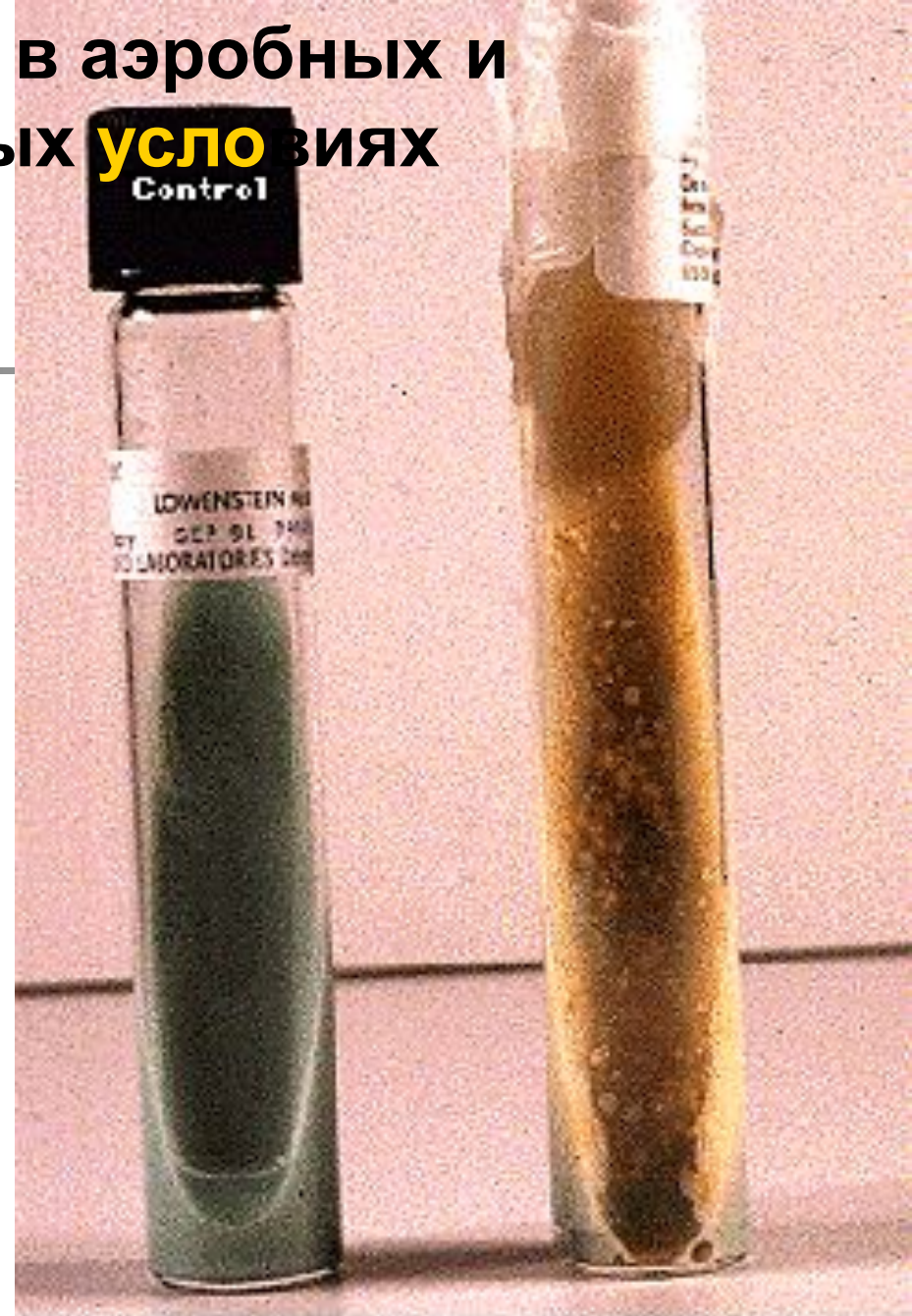
происходит в течение 14-18 часов

E. coli – 20 минут.

M. leprae – 20 дней

Видимые на глаз колонии

M. tuberculosis появляются через 2-3 недели.

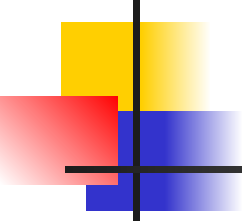


Mycobacterium tuberculosis
Lowenstein-Jensen media

Колонии на среде Ловенштейна-Йенсена

(сухой морщинистый налет светло - кремового цвета с неровными краями (R-формы) – «цветная капуста»)





На жидких **синтетических** средах с белком и глицерином, факторами роста через 5-7 дней они дают рост в виде **сухой морщинистой пленки** кремового цвета.

У вирулентных штаммов через 48-72 часа выявляют **корд-фактор**.

Липиды поверхностной стенки микобактерий определяют ее вирулентность и способность к образованию в культуре скоплений бактерий в виде кос





Антигенные свойства

**сложные, схожи с др.
микобактериями
(*M. bovis*, *M. microti*),
общие антигены с
коринебактериями и
актиномицетами.**



Антигенные структуры

**Туберкулиновые протеины,
Полисахариды,
Фосфатиды,
Корд-фактор.**

Факторы патогенности.



КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ:

корд-фактор – токсичный гликолипид,
тормозит окислительное
фосфорилирование в митохондриях
макрофагов (фагоцитоз),
обеспечивает расположение
микобактерий в виде кос, корда;

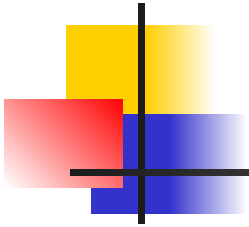
Факторы патогенности.



КОМПОНЕНТЫ клеточной стенки:

фтионовая, миколовая, туберкулостеариновая и др. жирные кислоты способствуют блокаде фагосома-лизосомального слияния, воспалительной реакции на микобактерии.

***M. tuberculosis* – основной возбудитель туберкулеза.**



Эпидемиология.



Возбушно-капельная и воздушно-пылевая инфекция.

Источник – больной туберкулезом человек, животные (*M. bovis*).



Пути передачи туберкулеза:

- 1) воздушно-капельный;**
- 2) алиментарный (через пищеварительный тракт);**
- 3) контактный;**
- 4) внутриутробное заражение туберкулезом.**

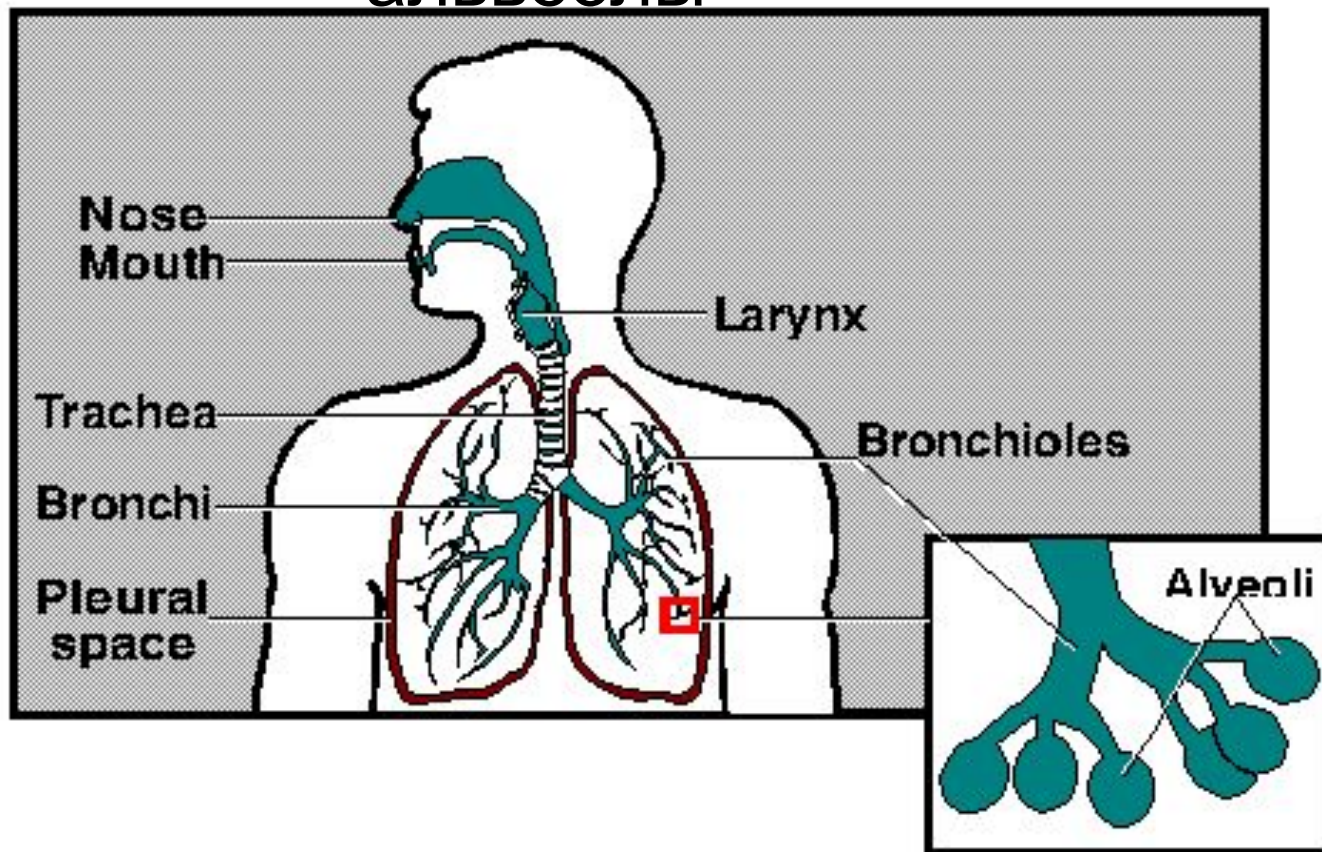
Основное значение – социально ущербные группы.



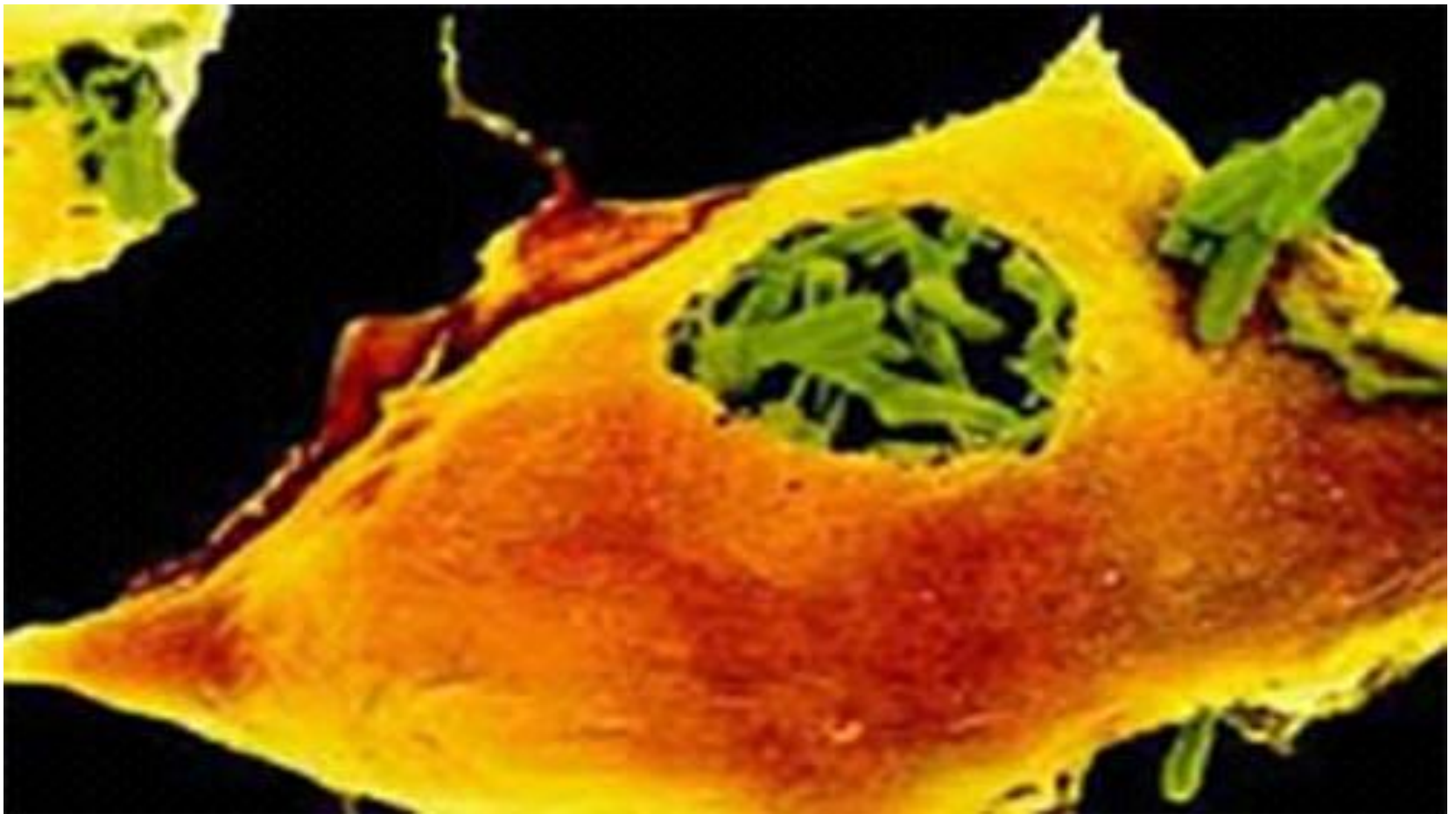
***M.tuberculosis* – основной возбудитель туберкулеза.**

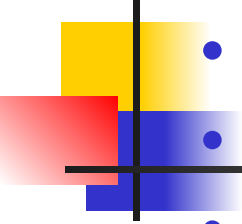
Патогенез

Заболевание начинается, когда капли достигают альвеолы



Микобактерии поглощаются альвеолярным макрофагом на участке внедрения, где МБТ в течении нескольких дней размножаются (внутриклеточное размножение).

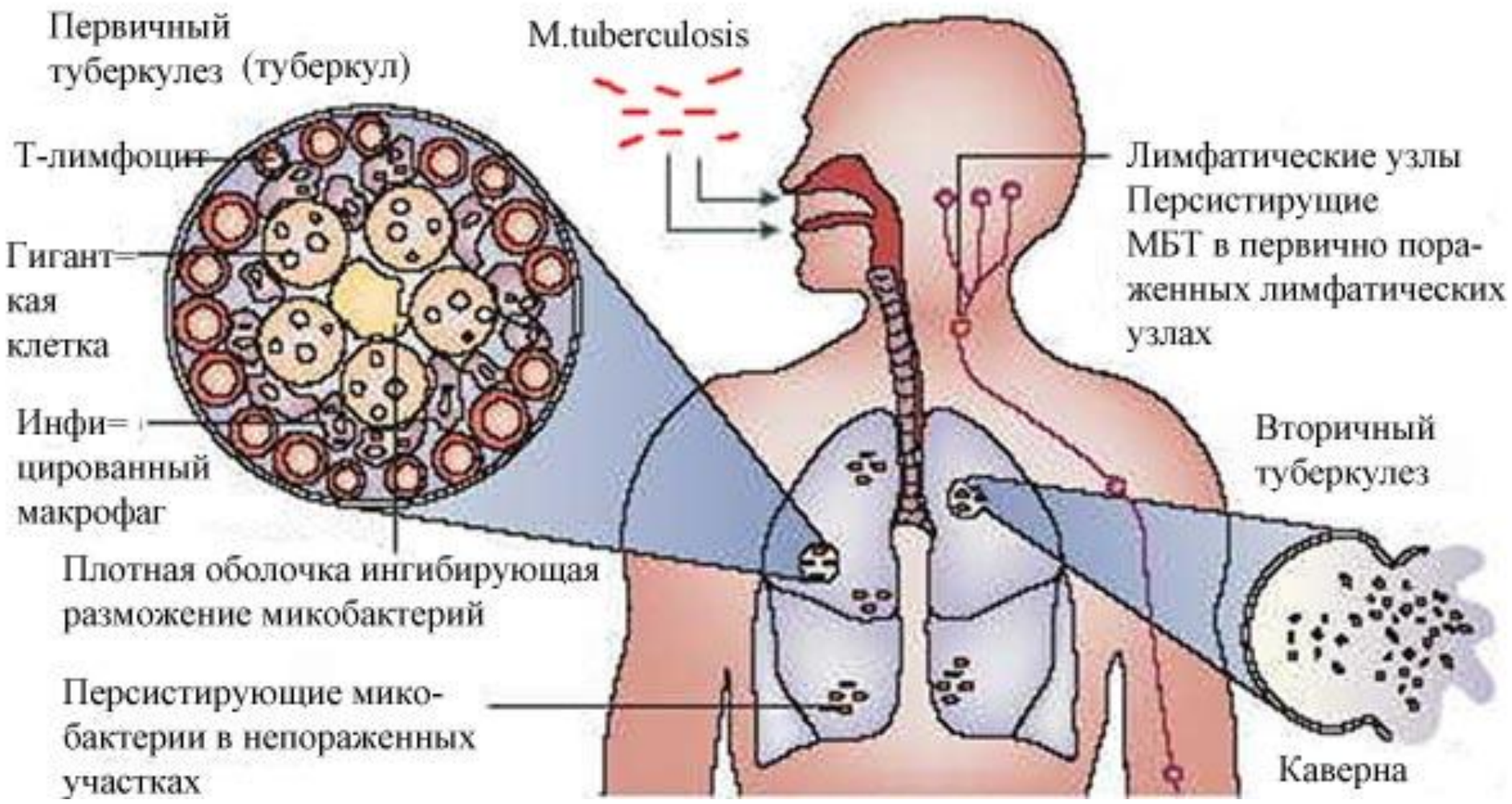


- 
- Макрофаг в конечном счете погибает
 - МБТ высвобождаются и
 - заглатываются другими макрофагами.
 - формируется первичное специфическое поражение

1-10 туберкулезных палочек достаточно, чтобы индуцировать развитие первичного аффекта.

Первичный очаг характеризуется образованием бугорков (гранулем) по ходу лимфатических путей.

Гранулема – клеточная реакция ГЗТ на компоненты микобактерий.



МБТ транспортируются в другие лимфатические узлы, дренирующие область первичного повреждения. Пораженные лимфатические узлы увеличиваются в размерах, а МБТ размножаясь внутри клеток, разрушают увеличенный лимфатический узел.

МБТ + антигены

MBT + antigen s

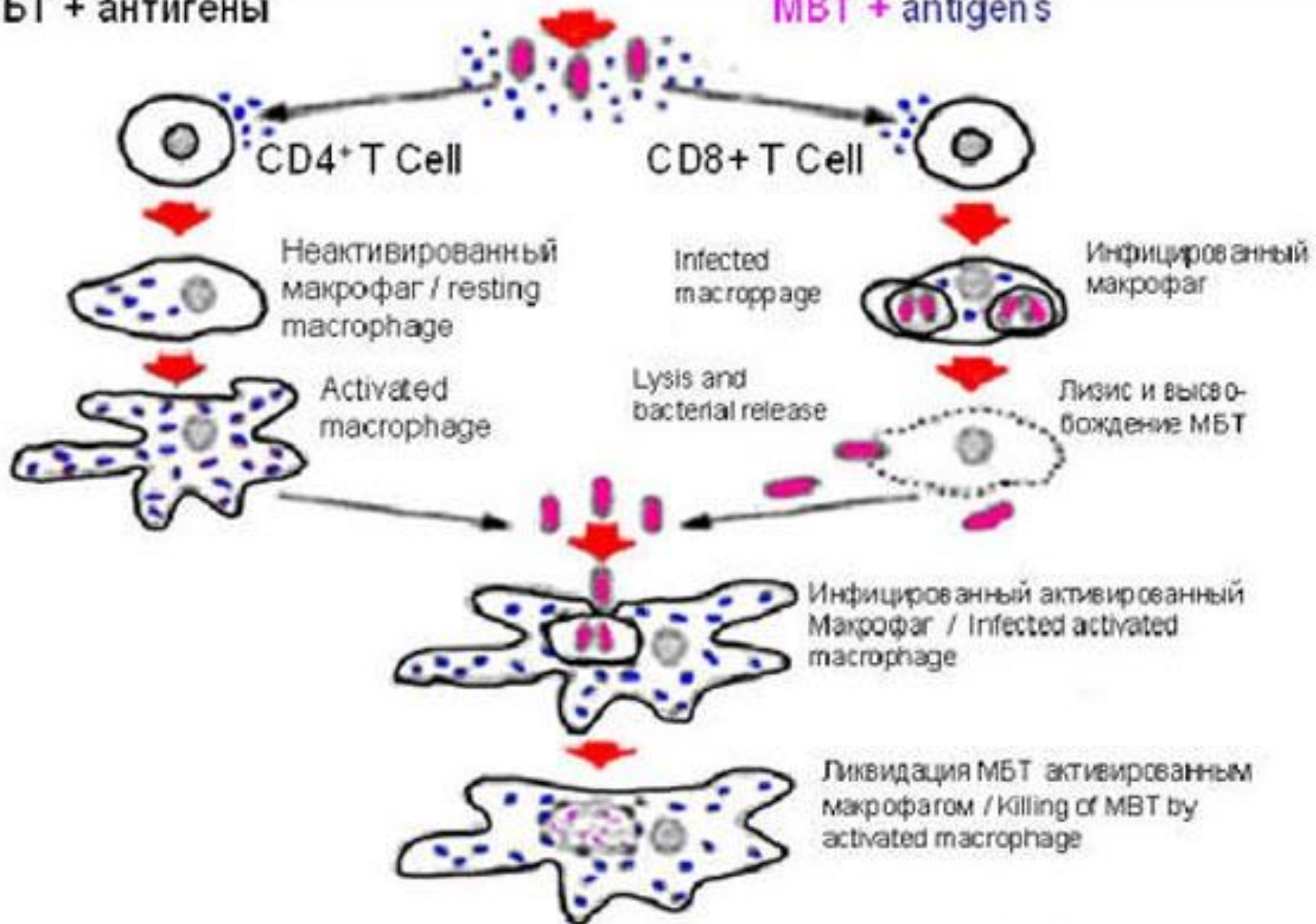
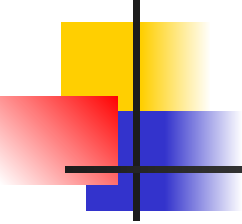
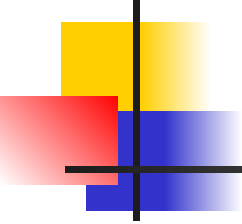


Схема активации Т-лимфоцитов или деструкции макрофагов

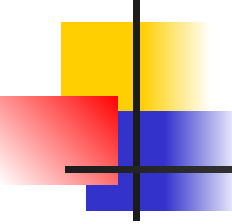


После победы в схватке с фагоцитами палочка Коха не позволяет им предъявить организму «ориентировку» на нарушителя иммунного барьера. Фагоциты не только умирают, но своей гибелью не могут помочь организму.



В случае с *M.tuberculosis* и еще шестью видами микобактерий, вызывающих у человека туберкулез, начало классической схемы фагоцитоза остается неизменным.

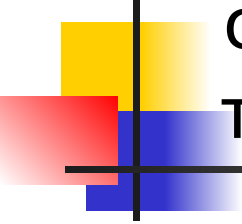
А вот дальнейшей судьбе наших защитников не позавидуешь: пузырек, содержащий бактерию, вместо того чтобы слиться с другим «пищеварительным» пузырьком, отправляется в свободное плавание по цитоплазме фагоцита. Через некоторое время вся клетка оказывается заполненной многочисленными микобактериями.



Даже при неблагоприятном для себя исходе схватки с паразитом фагоциты «думают» исключительно о благе всего организма, который научился извлекать пользу даже из гибели клеток иммунной системы.

Апоптоз – запрограммированная клеточная гибель – сопровождается образованием пузырьков, содержащих бактериальные антигены, в такой форме уже легко усваиваемые другими иммунными клетками. **При апоптозе** выделяются сигнальные молекулы, информирующие об опасности и заставляющие перестроить иммунные реакции.

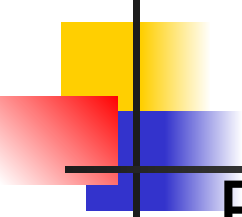
Микобактерии нарушают один из важных этапов апоптоза – сшивание друг с другом молекул аннексина-1 с образованием активной молекулы.



Дело в том, что вышеописанные свойства не объясняют хронического и затяжного течения туберкулеза. Ведь рано или поздно антигены

микобактерии должны распознать и запустить производство антител со всеми вытекающими для палочки Коха последствиями.

Однако происходит это, как правило, с большим опозданием, когда у лимфоцитов уже недостаточно ресурсов для массового уничтожения расплодившихся бактерий.



Если дело происходит в легких, то не способная уничтожить инфекцию иммунная система «заключает» её в непроницаемую кальциевую оболочку. Именно эти капсулы – так называемые **очаги Гона** – и высматривают врачи на ежегодной флюорографии.

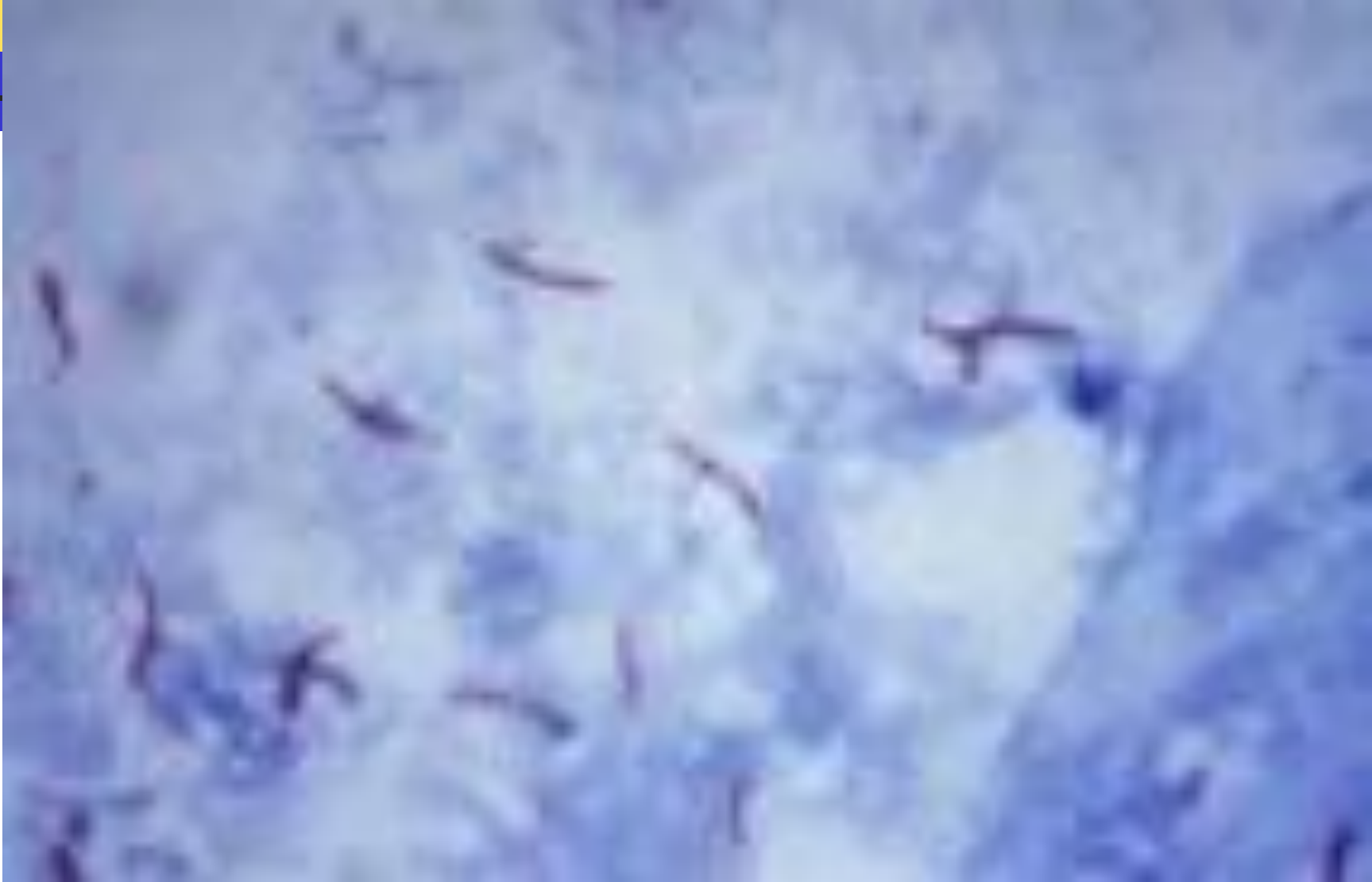
Лабораторная диагностика.



Применяют

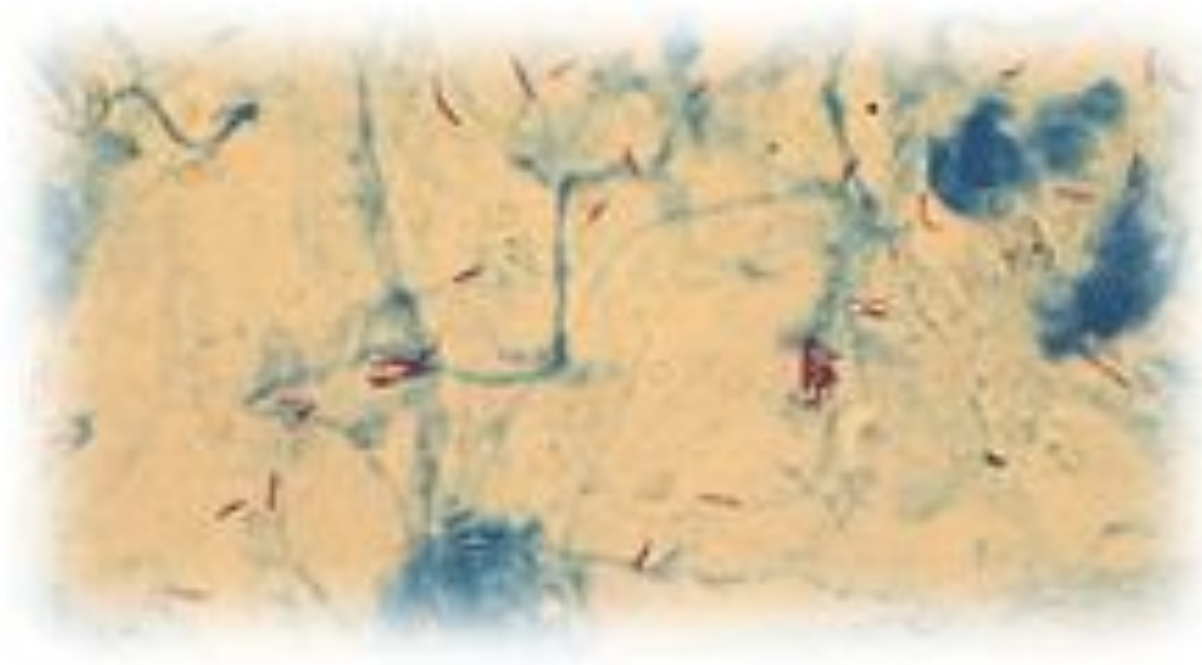
- микроскопические,
- бактериологические,
- биологические,
- аллергологические,
- серологические и
- молекулярно-биологические методы.

***Mycobacterium tuberculosis*. Acid-fast stain**

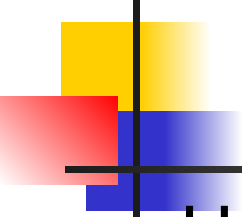


Недостатки микроскопического метода:

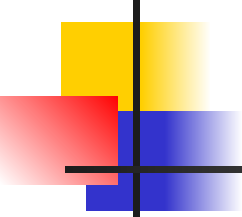
- Туберкулезную палочку можно найти, если ее много в исследуемом материале (**100 тысяч на мл**).



Недостатки микроскопического метода:

- 
-
- Наряду с **кислото - устойчивыми** формами встречаются кислотоподатливые (не отличаются от фона).
 - Существуют **атипичные** микобактерии, не вызывающие туберкулез, но вызывающие воспаление легких, адениты и др.

Атипичные микобактерии.



Фотохромогенные
(фотохроматогенные) – образуют
пигмент на свету.

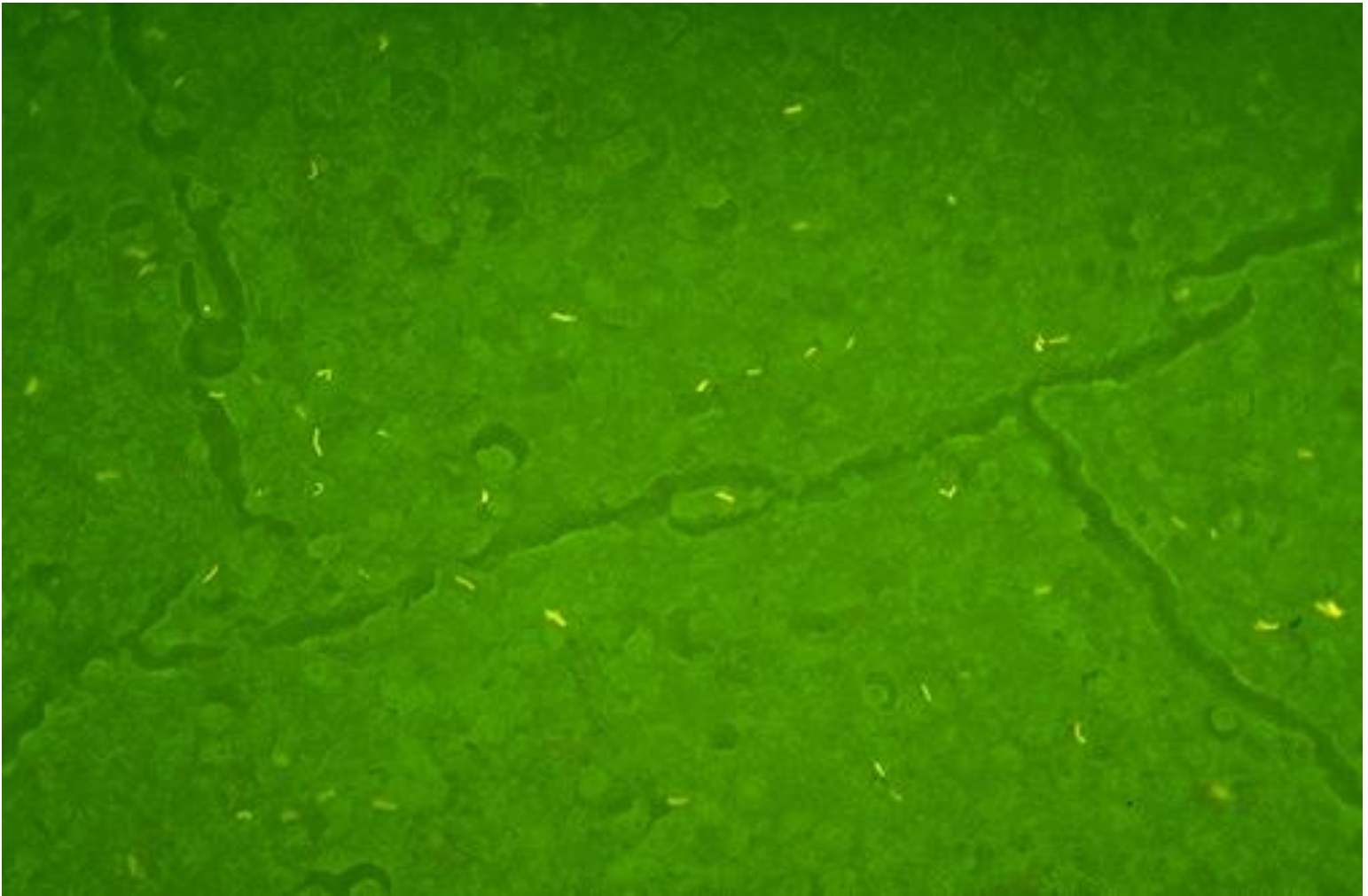
Скотохромогенные – образуют
пигмент на свету и в темноте.

Нехромогенные – не образуют
пигмента.

Быстрорастущие – образуют
колонии в течение 1-ой недели.

Микроскопия

нативных материалов, методы накопления
(флотация), люминесцентная микроскопия
(родамин).





Бактериологический метод

**Более чувствителен
(200 микобактерий в мл),
однако длителен.**

Культивирование и определение чувствительности к лекарственным препаратам





Бактериологический метод

Ускоренные методы (метод Прайса).



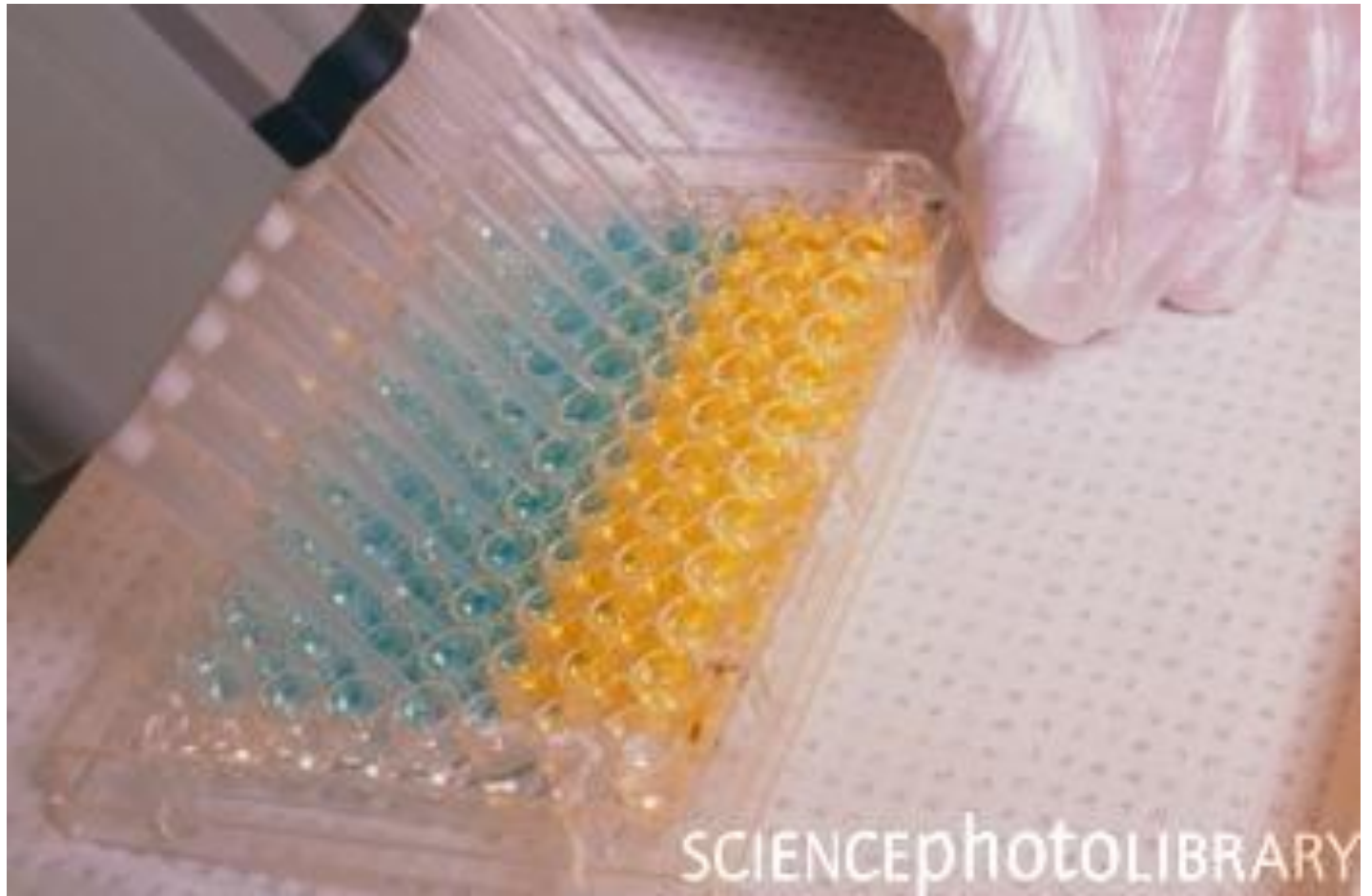
Биологический

(биопроба на морских свинках)

требует режимных условий,
более чувствительный



Серологические методы недостаточно специфичны.



ПЦР- диагностика

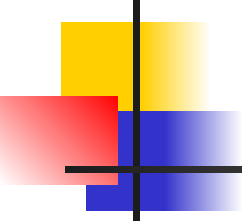


позволяет

- идентифицировать любой штамм микобактерий
- определять причину устойчивости к лекарствам

• существуют проблемы в дифференциации вирулентных и вакцинальных штаммов

Иммунопрофилактика туберкулеза.



Для специфической профилактики
используют

живую вакцину БЦЖ – BCG (Bacille
Calmette Guerin).

Штамм БЦЖ получен Кальметтом и
Гереном многократным пассированием
туберкулезных палочек *M. bovis* на
картофельно-глицериновой среде с
добавлением желчи. Получена
культура со сниженной
вирулентностью.

Профилактика туберкулеза (вакцинация БЦЖ)

*Техника введения
вакцины БЦЖ*
(внутрикожно,
в левое плечо,
на границе верхней
и средней трети)

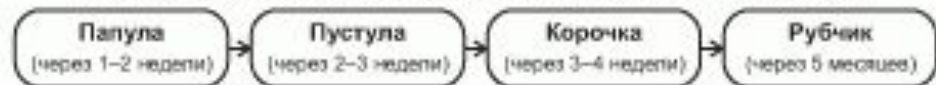


Вакцинацию против туберкулеза проводят всем детям на 5-7 день жизни внутрикожным методом.

Развитие местной поствакцинальной реакции на 1-м году жизни



Развитие местной поствакцинальной реакции в 7 и 14 лет

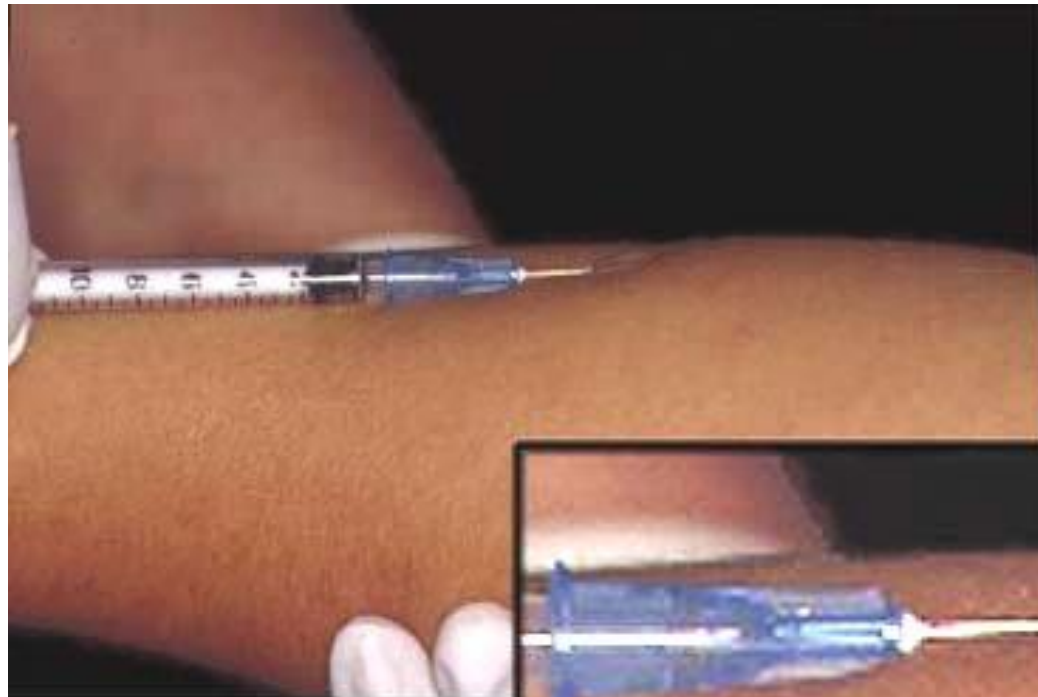


При отрицательной пробе Манту проводится ревакцинация каждые 5-7 лет до 30-летнего возраста. Создают таким образом инфекционный иммунитет, при котором возникает реакция ГЗТ.



Перед ревакцинацией ставится проба
Манту с туберкулином.

(Ранее применяли туберкулин Коха,
сейчас – PPD – очищенный белковый дериват
туберкулезных палочек.




Положительная проба Манту

свидетельствует об инфицированности организма туберкулезными бактериями. Она не говорит о том, что человек болен или здоров.

Ревакцинации подлежат лица с отрицательной пробой Манту.

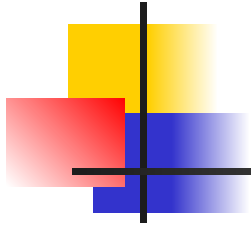


Иммунитет.



При введении вакцины **BCG** возникает доброкачественный туберкулезный очаг. Основу этого очага составляют сенсibilизированные лимфоциты. **Сенсibilизированные лимфоциты** – это лимфоциты, на поверхности которых есть рецепторы к антигену (туберкулезных бактерий).

Иммунитет.



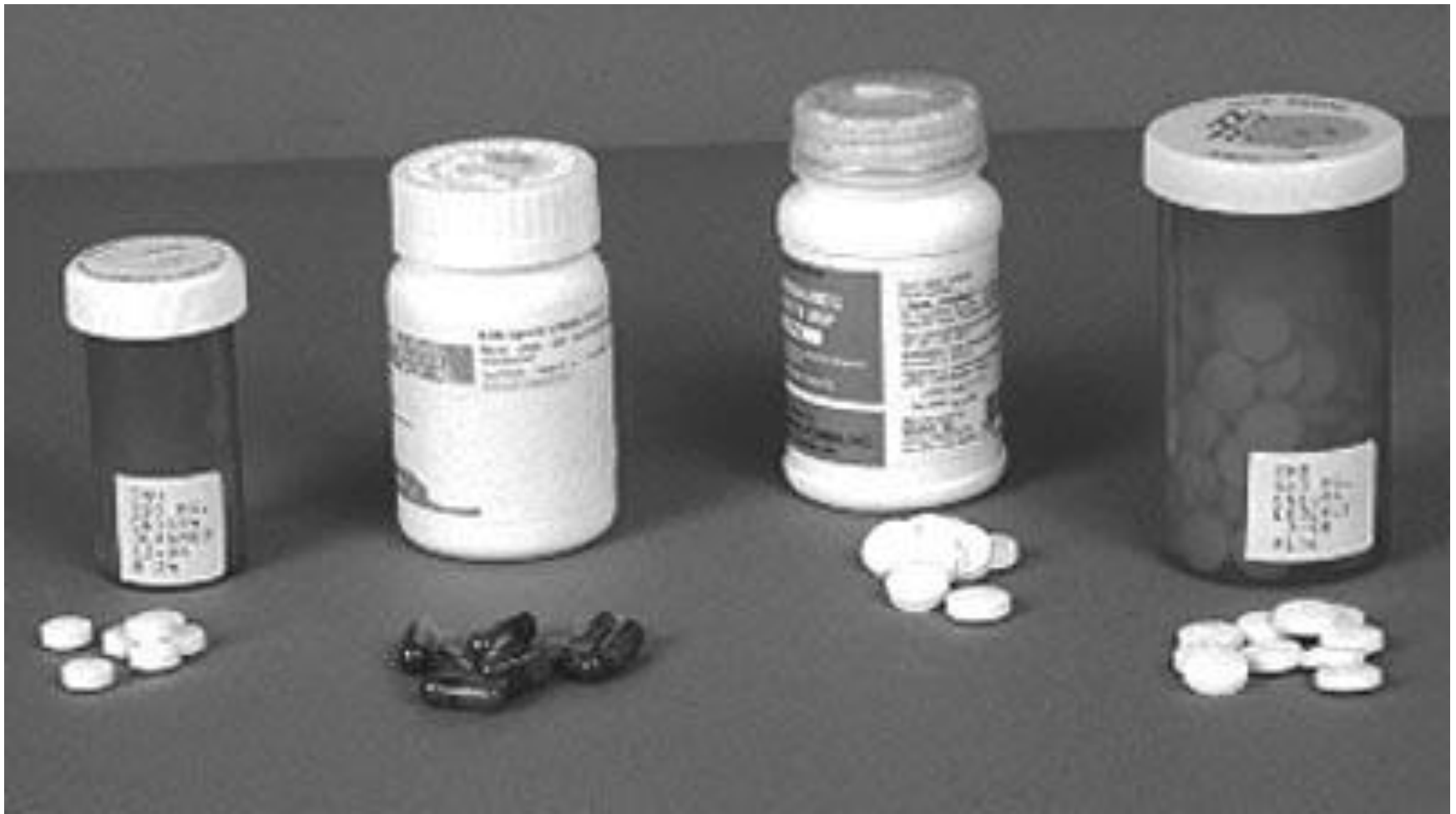
**Если в организм проникает
вирулентный штамм туберкулезных
бактерий,
они взаимодействуют с этими
рецепторами и лимфоциты выделяют
лимфокины,
которые активируют макрофаги.
После этого макрофаги захватывают и
переваривают туберкулезные палочки.**



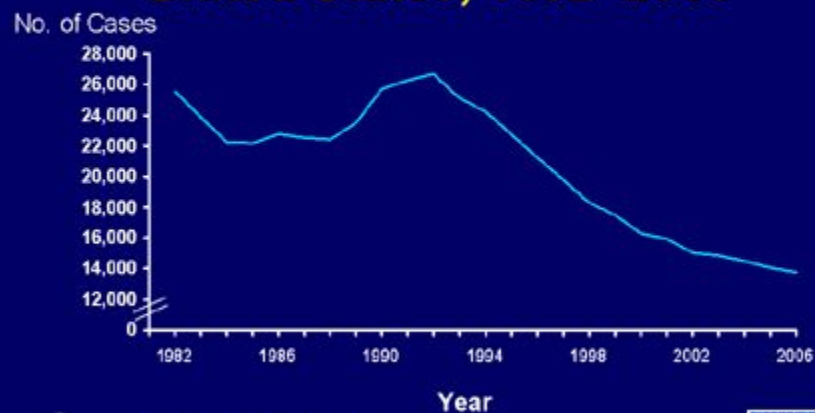
Иммунитет.

Аллергическая перестройка (ГЗТ) свидетельствует о формировании нестерильного приобретенного иммунитета и может быть выявлена внутрикожной пробой Манту на туберкулин.

**Drugs used to treat TB disease. From left to right
isoniazid, rifampin, pyrazinamide, and
ethambutol. Streptomycin (not shown) is given
by injection**



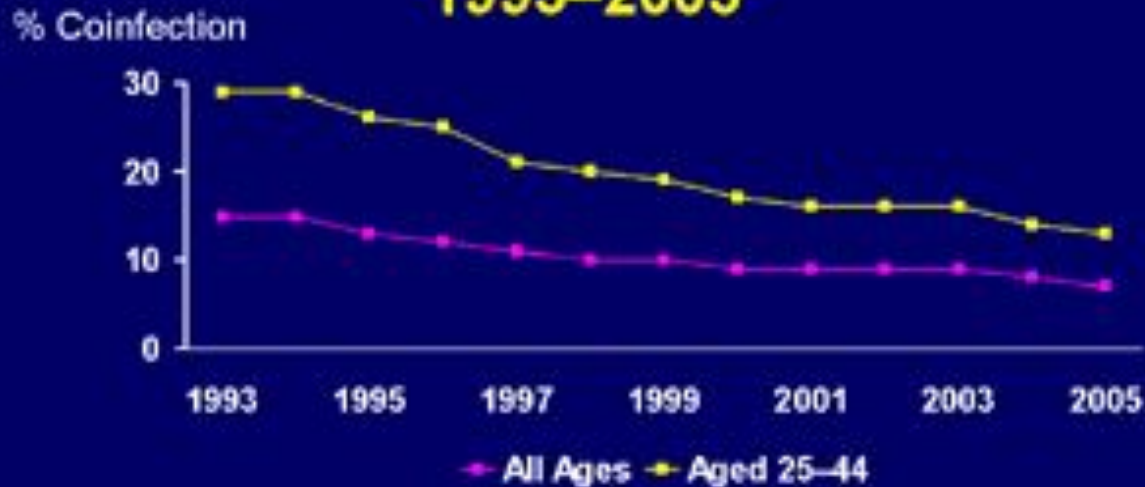
Reported TB Cases* United States, 1982–2006



*Updated as of April 6, 2007.



Estimated HIV Coinfection in Persons Reported with TB, United States, 1993–2005*

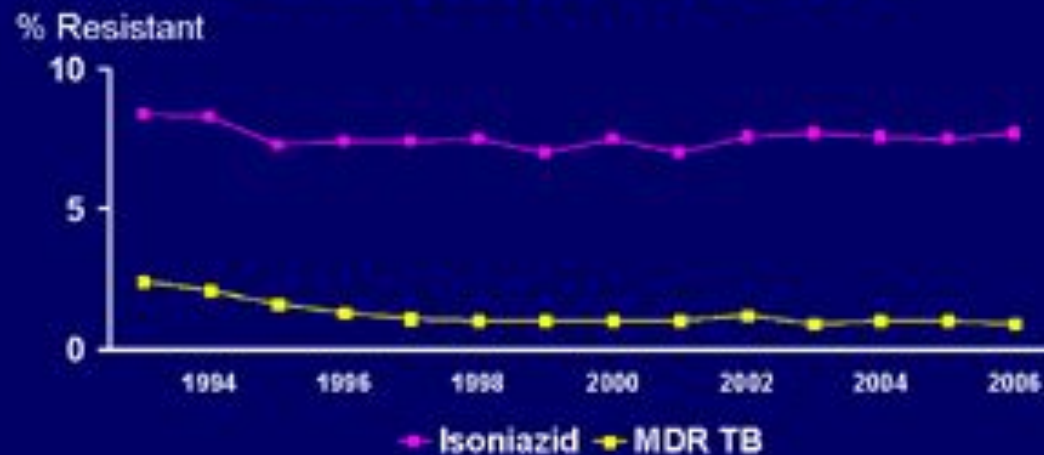


*Updated as of April 6, 2007.

Note: Minimum estimates based on reported HIV-positive status among all TB cases in the age group.



Primary Anti-TB Drug Resistance United States, 1993–2006*



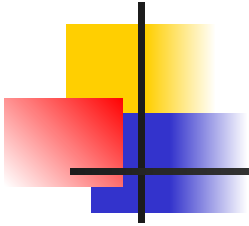
*Updated as of April 6, 2007.



Note: Based on initial isolates from persons with no prior history of TB.
MDR TB defined as resistance to at least isoniazid and rifampin.



Причины появления антибиотикоустойчивых форм туберкулезных бактерий



Строение клеточной стенки (см. выше).
Мутации.

Антибиотик **изониазит** проникают в туберкулезную палочку в неактивной форме. Под действием ферментов туберкулезной палочки он переходит в активную форму, которая повреждает или убивает палочку. Среди туберкулезных бактерий появляются мутанты, у которых отсутствует фермент, переводящий изониазит из неактивной формы в активную.

Рифампицин обычно прикрепляется к ферменту ДНК-зависимой РНК-полимеразе. При этом нарушается процесс считывания генетической информации, нарушается синтез белка.

Сейчас появляются мутанты, у которых изменен отрезок фермента к которому прикрепляется рифампицин и он не может оказать токсического действия на бактерию.

Резистентность *M. tuberculosis* к антибиотикам

- 
1. Естественная.
 2. Приобретенная.
-

Дикий штамм - это штамм микобактерий туберкулеза, который ранее не подвергался воздействию какого-либо антимикобактериального препарата. Естественной резистентностью обладают штаммы в отношении специфического препарата.

Например, *Mycobacterium bovis* - к пиразинамиду,
Mycobacterium tuberculosis - к пенициллину

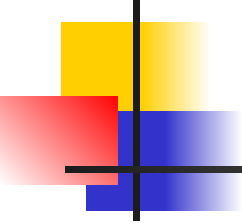
Приобретенная (вторичная)

резистентность МБТ возникает в результате воздействия на штамм

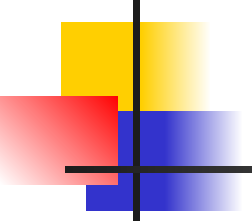
противотуберкулезными препаратами, с последующей селекцией мутантных резистентных микобактерий.

Первичная резистентность МБТ имеет место в случаях, когда пациент инфицирован другим лицом выделяющим МБТ с приобретенной (вторичной) резистентностью к одному или более противотуберкулезным препаратам.

*Причины резистентности *M. tuberculosis* к антибиотикам*

- 
-
1. Высокогидрофобная клеточная поверхность служит своего рода физическим барьером для терапевтических агентов и антибиотиков.
 2. Главная причина устойчивости закодирована в структуре генома туберкулезной палочки.
 3. Нуклеотидные замены (мутации) в генах, кодирующих различные ферменты, которые непосредственно взаимодействуют с лекарственными средствами

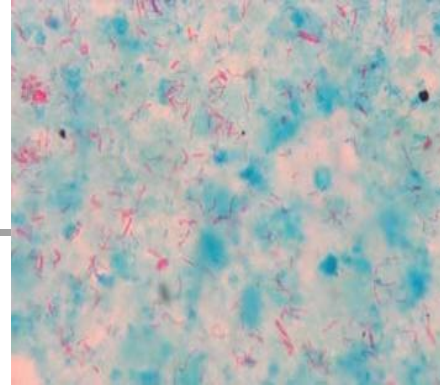
Причины резистентности *M. tuberculosis* к антибиотикам



Резистентность некоторых штаммов *M. tuberculosis* к **изониазиду** связана с **мутациями в гене katG**, приводящими к замене некоторых аминокислот в ферментах — каталазе и пероксидазе.

Нечувствительность *M. tuberculosis* к **стрептомицину** связана с **миссенс-мутацией в гене rpsL**, кодирующем S12 митохондриальный белок, или с нуклеотидными заменами в гене rrs, кодирующем 16S РНК.

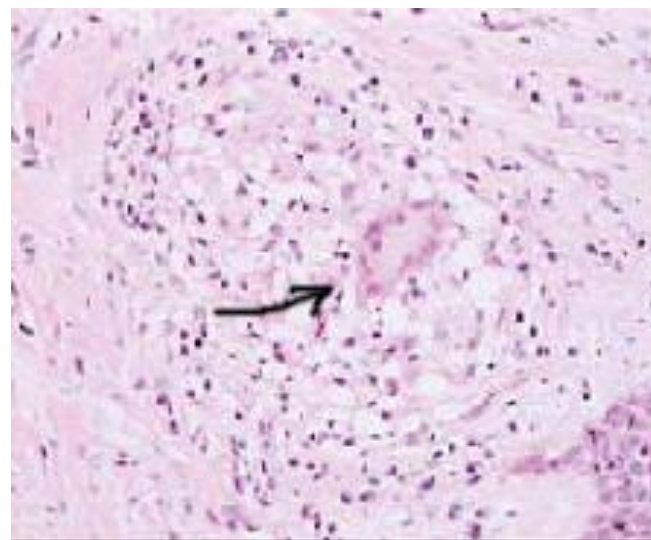
Одновременная лекарственная устойчивость МБТ к нескольким препаратам в последние годы значительно снижает эффективность лечения туберкулеза



Туберкулезная язва, расположенная на слизистой верхней губы, распространяющаяся на щеку.



Туберкулезный гингивит.
На снимке предствалены диффузное,
формирующиеся дольками,
увеличение десен на протяжении от
правого до левого клыков

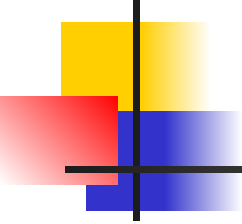


Микропрепарат (увеличение 40х),
на котором представлены
гранулома, содержащая
эпителиодные и гигантские клетки
Пирогова-Ланганса

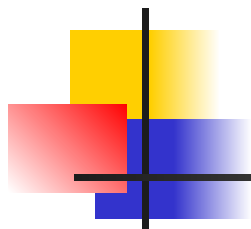


Туберкулезный ГИНГИВИТ

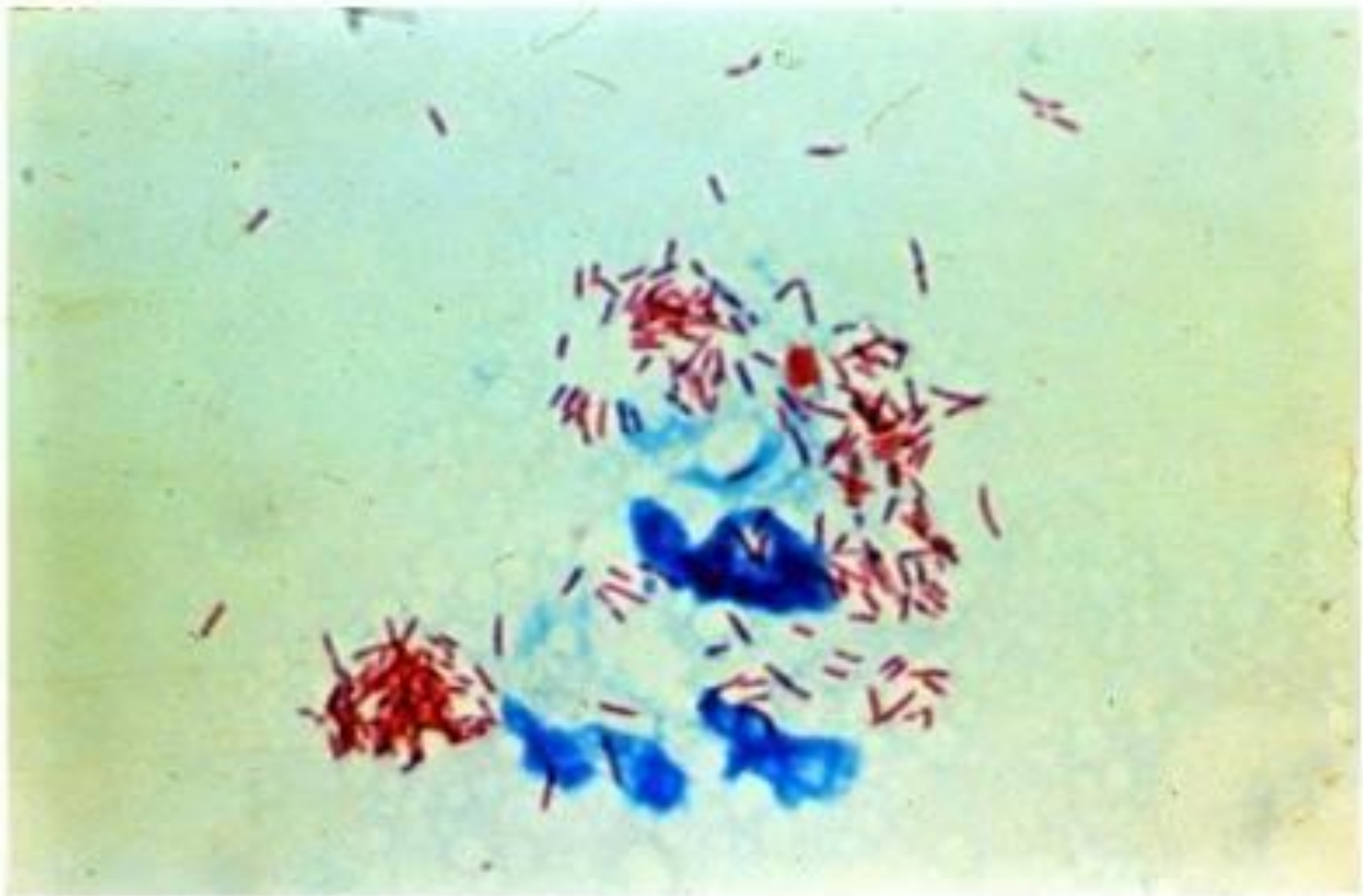
Другие микобактерии



M.bovis как возбудитель туберкулеза человека имеет второстепенное значение, выявлен у 60 видов животных, в том числе у домашних и сельскохозяйственных. Основное значение – КРС, олени, человек заражается преимущественно через молочные продукты.



M.leprae – возбудитель лепры – хронической генерализованной инфекции с преимущественным поражением производных эктодермы (покровные ткани, периферическая нервная система). Облигатные внутриклеточные паразиты, в мазках расположены параллельно (пачка сигарет) или шаровидными скоплениями. Диагностика – микроскопия, от микобактерий туберкулеза дифференцируют по биопробе на белых мышах (непатогенны), на питательных средах плохо культивируются. Возбудитель передается контактно-бытовым и воздушно-капельным путем, заболевание мало контагиозно, зависит от индивидуальной резистентности и генетической предрасположенности.



らい菌（赤く棒状のもの、皮膚スメア検査、1000倍拡大）

Возбудители микобактериозов

Микобактерии *M.avium* комплекса (около 20 видов) вызывают **нетуберкулезные** воспалительные процессы, местные и генерализованные - **микобактериозы**, возникающие преимущественно на фоне иммунодефицита, часто сопутствуют ВИЧ-инфекции.



A small, raised, erythematous lesion developed on the dorsum of the hand of a 35-year-old man who worked in a pet shop



Nguyen, C. N Engl J Med 2004; 350: 8e

Туберкулез



Правосторонний первичный туберкулезный комплекс



Правосторонний ателектазный бронхоаденит

Внутрикожная проба Манту**Техника введения туберкулина****Проверка реакции****Виды реакций на пробу Манту**

Отрицательная реакция
(папула 0–1 мм)



Сомнительная реакция
(папула 2–4 мм
или гиперемия любого размера)



Положительная реакция
(папула 5 мм и более)



Гиперергическая реакция
(папула 16 мм и более
или папула любого размера
+ везикуло-некротическая
реакция)



Кожная градуированная проба Пирке



Отрицательная реакция



Положительная реакция



Первичный туберкулез

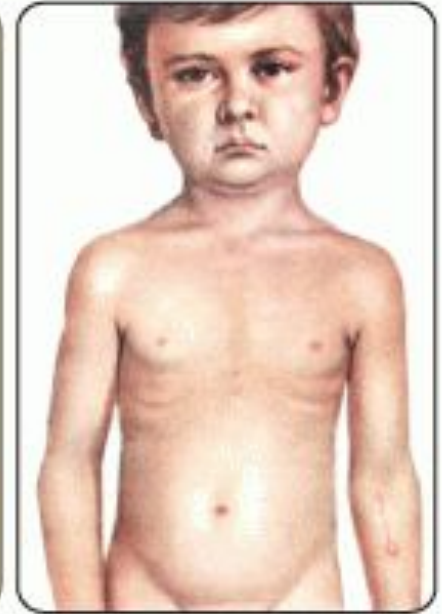


Фолликулярный
каратамоконъюнктивит



Уловчатые васкулиты

Параспецифические реакции



*Впервые положительная
туберкулиновая проба*



Первичный комплекс



Туберкулезный бронхоаденит