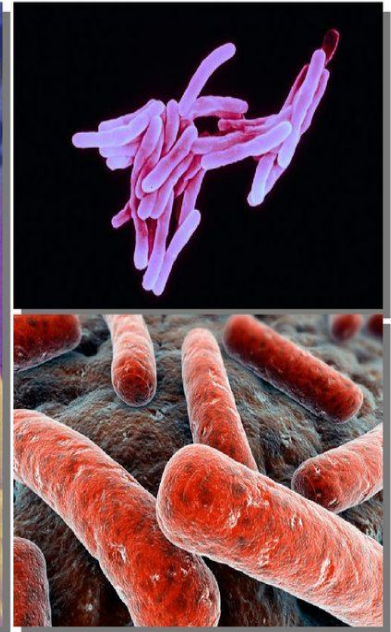
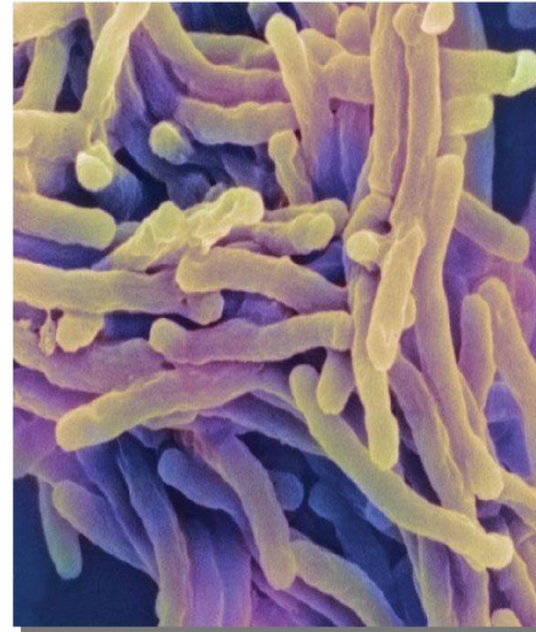
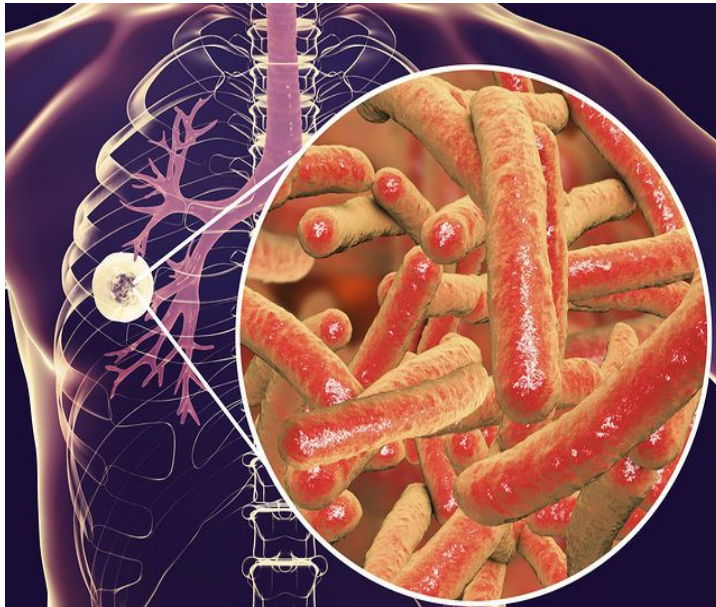
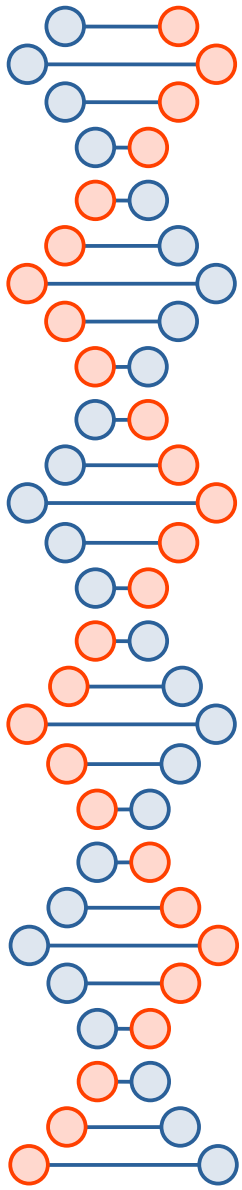


*Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии*

## *Занятие 2*

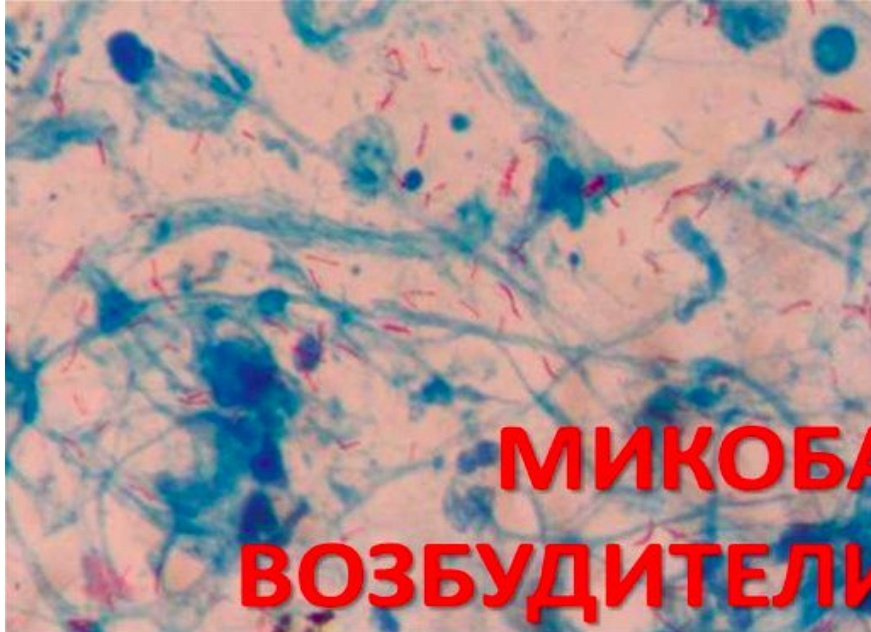
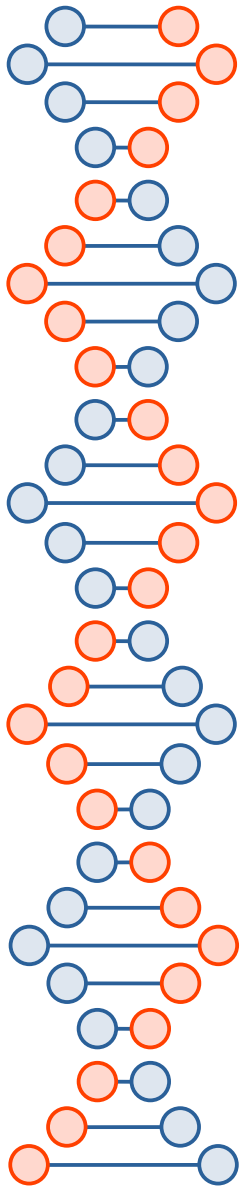
# *ВОЗБУДИТЕЛИ ТУБЕРКУЛЕЗА, МИКОБАКТЕРИОЗОВ, ЛЕПРЫ*



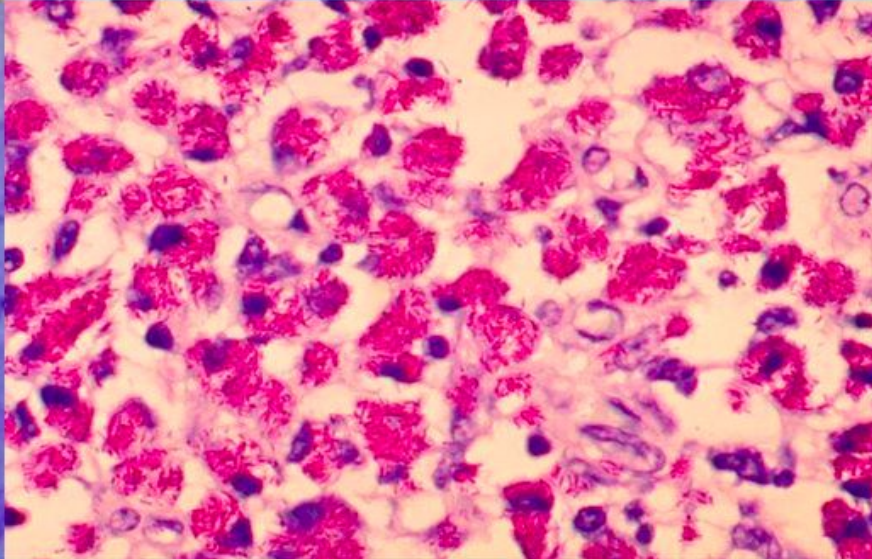
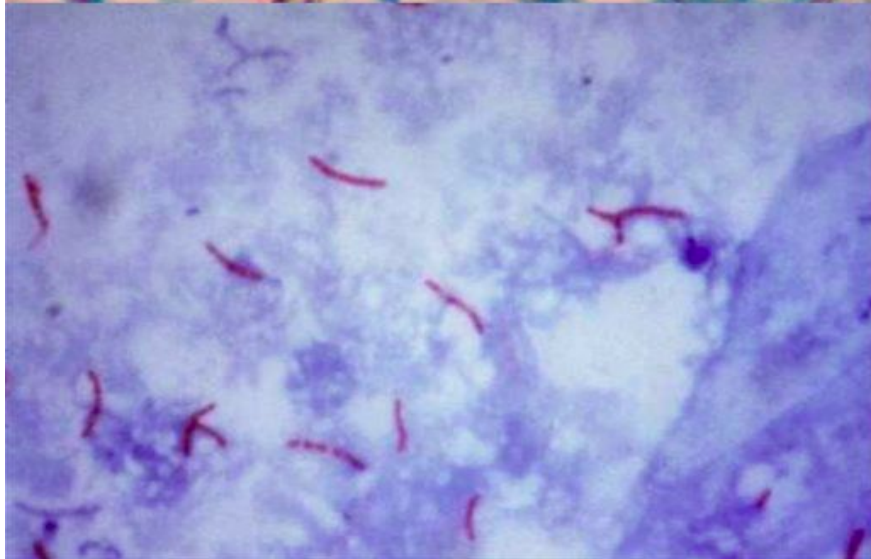


## ВОПРОСЫ ДЛЯ ОБСУЖДЕНИЯ

- 1. Общая характеристика микобактерий.*
- 2. Особенности химического состава микобактерий.*
- 3. Возбудители туберкулеза.*
- 4. Факторы вирулентности микобактерий.*
- 5. Основные формы туберкулезной инфекции у детей.*
- 6. Микробиологическая диагностика туберкулеза.*
- 7. Специфическая профилактика туберкулеза у детей.*
- 8. Потенциально-патогенные микобактерии (атипичные).  
Классификация по Rinyon.*
- 9. Лепра. Общая характеристика возбудителя и проявление инфекции.*
- 10. Формы лепры. Микробиологическая диагностика.*



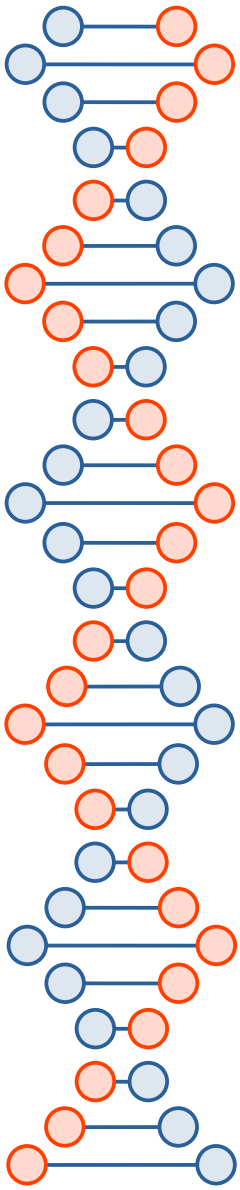
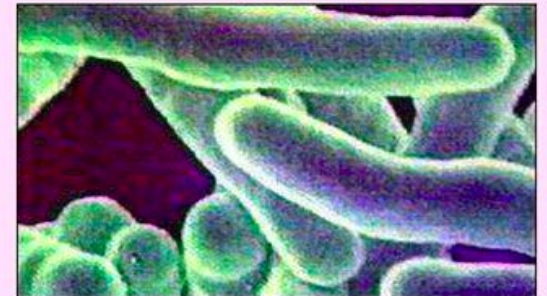
**МИКОБАКТЕРИИ.  
ВОЗБУДИТЕЛИ ТУБЕРКУЛЕЗА**



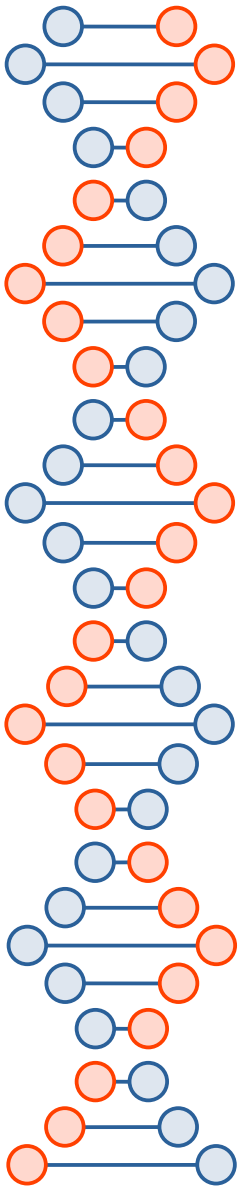
# Общая характеристика микобактерий

**Микобактерии** относятся к семейству *Mycobacteriaceae*, род *Mycobacterium* (более 40 видов).

1. Прямые или слегка изогнутые палочки размером  $0,2-0,6 \times 1-10$  мкм.
2. Склонны к ветвлению подобно грибам.
3. Кислото-спирто-щелочеустойчивы.
4. Плохо окрашиваются анилиновыми красителями.
5. Грамположительные.
6. Медленно растут на питательных средах.



# • Нетуберкулезные микобактерии (НТМ — классификация по Runyon)

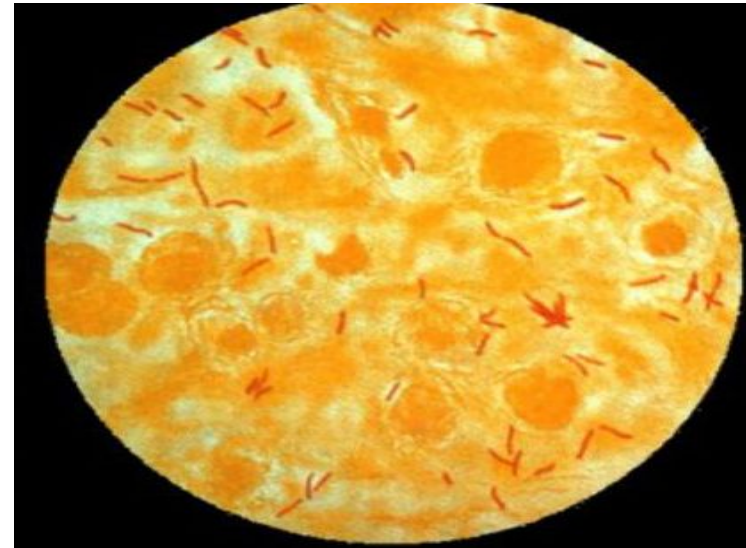
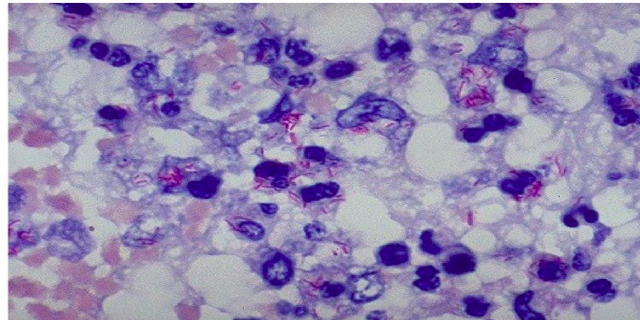


# Tuberculosis

- Это хроническая бактериальная инфекция с образованием гранулем в пораженных тканях и выраженной реакцией клеточного иммунитета с участием цитотоксических Т-лимфоцитов (гиперчувствительность замедленного типа, ГЗТ)

*Mycobacterium tuberculosis* внутри клеток легкого.

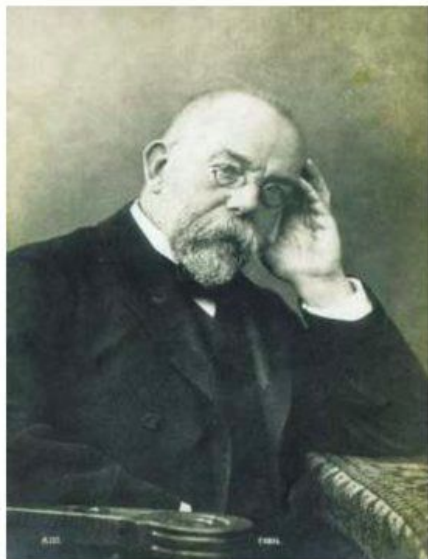
Окраска по Цилю-Нильсену



## Из истории:

С глубокой древности это заболевание было известно под названиями чахотка, бугорчатка, золотуха из-за характерных клинических признаков. Впервые отделил “чахотку” от других легочных заболеваний Рене Лаэннек в 1819 г., он ввел термин “туберкулез” (от лат. tuberculum – бугорок, отсюда синоним - бугорчатка).

В 1882 г. Р. Кох обнаружил возбудителя туберкулеза и получил чистую культуру на сывороточной среде (палочка или бацилла Коха). В 1890 г. Р. Кох получил туберкулин (“водно-глицериновую вытяжку туберкулезных культур”). В 1911 г. Р. Кох за открытие возбудителя туберкулеза был удостоен Нобелевской премии.



Р. Кох (1843—1910) –  
лауреат Нобелевской премии

Наука о туберкулезе – **фтизиатрия** (от греч. phthisis – истощение, чахотка, увядание). Англ. врач Мортон автор первой монографии «Фтизиология или трактат о чахотке» (1689 г).

“Современная клиническая бактериология начинается с открытия туберкулезной бациллы (1882 г) Р.Кохом” (Габричевский Г.Н.).

### **Возбудители туберкулеза:**

*M. tuberculosis* (бацилла Коха)

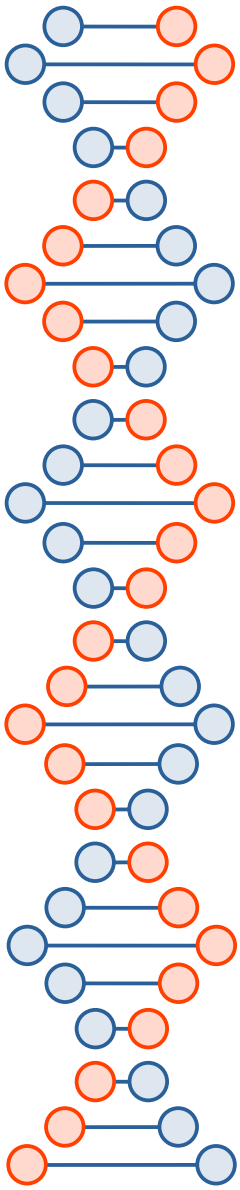
*M. africanum*

*M. bovis*

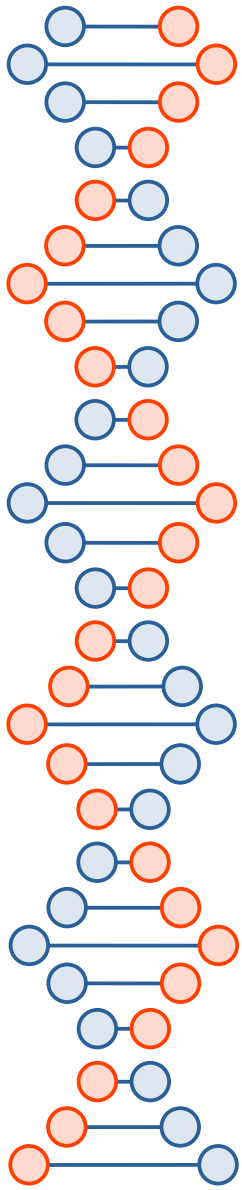
*M. avium*

# Таксономия микобактерий

- Отдел Firmicutes
- Порядок: Actinomycetales
- Семейство Mycobacteriaceae
- Род Mycobacterium
- Виды: **M. tuberculosis** (tuberculum – бугорок)
- **M. bovis**
- **M. leprae**
- M. kansasii
- M. xenopi
- M. ulcerans



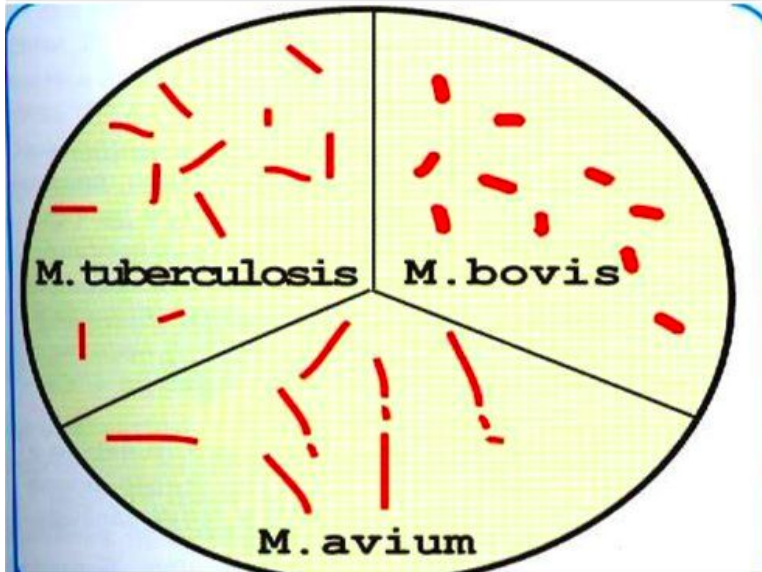




Отдел Firmicutes  
Порядок Actinomycetales  
Семейство Mycobacteriaceae  
Р о д Mycobacterium

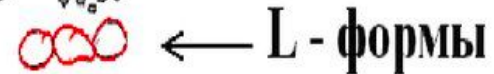
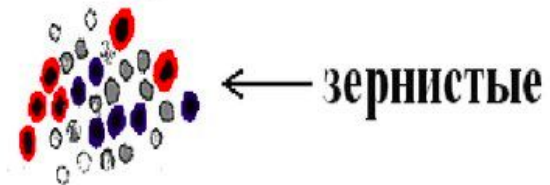
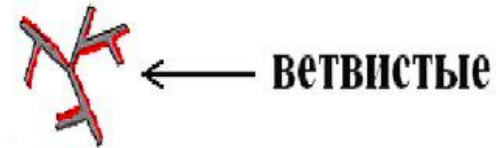
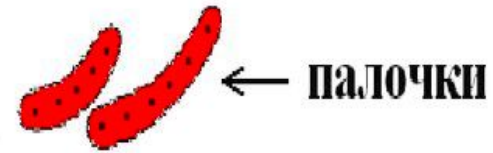
*Вид Mycobacterium tuberculosis*

- Mycobacterium tuberculosis
- Mycobacterium bovis
- Mycobacterium africanum



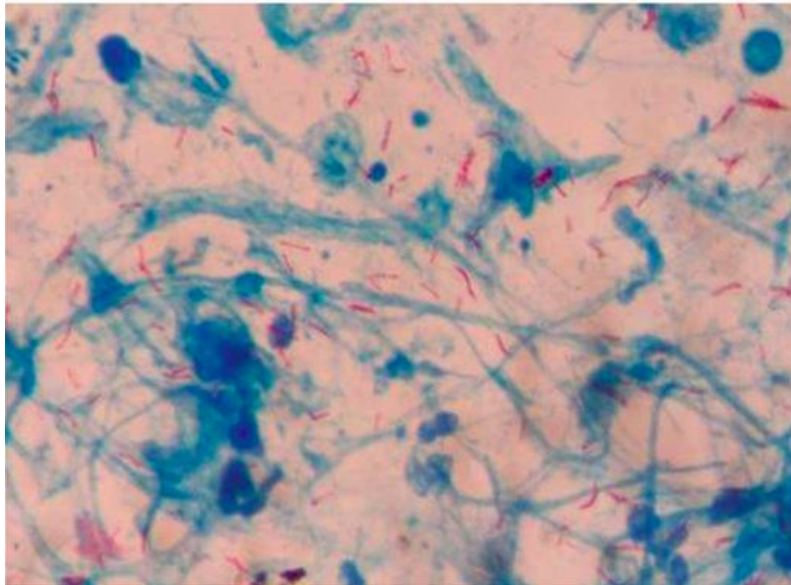
## Морфология

### Формы туберкулезной палочки



# Морфология и тинкториальные свойства

- Палочки, слегка изогнутые, размером  $0,3-0,6 * 1,0-4,0$  мкм. **Грамположительные.** Окрашиваются по методу Циля-Нильсена в красный цвет. Характерен выраженный полиморфизм. В основном они имеют форму длинных тонких (*M. tuberculosis*, *M. africanum*) или коротких и толстых (*M. bovis*) палочек с зернистой цитоплазмой, содержащей от 2 до 12 зерен различной величины (зерна метафосфатов – зерна Муха). Иногда они образуют нитевидные структуры, напоминающие мицелий грибов, что и послужило основанием для их названия (*mykes* - гриб и *bacterium* - бактерия). Неподвижные. Спор не образуют. Имеют микрокапсулу.



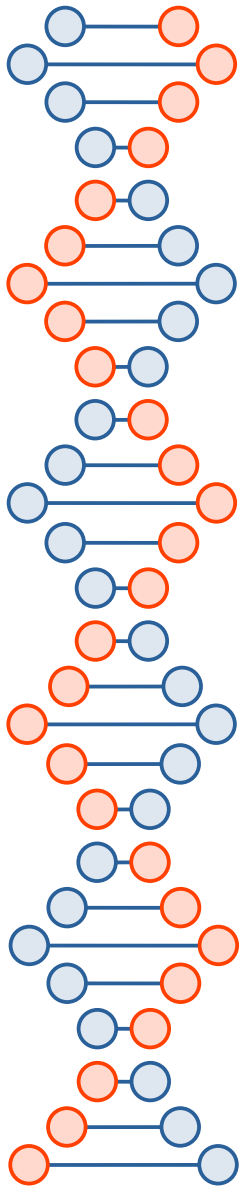
В клеточной стенке содержится большое количество липидов (миколовая кислота и липоиды – до 40% от сухого веса), что определяет следующие свойства: **кислотоустойчивость** (5-10% кислоты), устойчивость к щелочам и спирту, к высушиванию, УФ, дез. средствам. Вызывают сенсibilизацию организма.

## Отличительные свойства микобактерии туберкулеза

- Устойчивость к действию кислот и спирта
- Сохраняют жизнеспособность при воздействии различных физических и химических агентов
- В невысохшей мокроте (при определенных условиях) бактерии Коха могут оставаться жизнеспособными до полугода
- В высохшей мокроте на различных предметах (мебель, книги, посуда, постельное белье, полотенца, пол, стены и пр.) они могут сохранять свои свойства в течение нескольких месяцев.



- Палочка Коха на солнечном свете погибает в течение 1,5 часов.
- Ультрафиолетовые лучи убивают микобактерии за 2-3 минуты

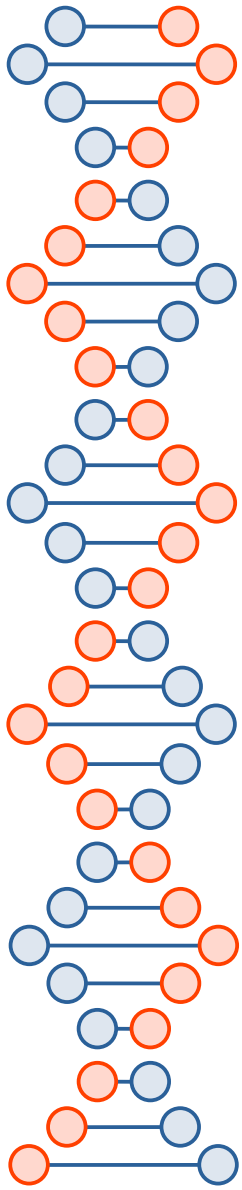


*Среда Левенштейна-Йенсена и  
рост микобактерий*



## Культуральные и биохимические свойства

- ❑ аэробы;
- ❑ селективной является яичная среда Левенштейна-Йенсена и синтетическая среда Сотона;
- ❑ растут медленно (через 2-3 недели и позднее);
- ❑ колонии сухие, морщинистые, сероватые;
- ❑ биохимически активны - ниациновая проба Конно (накопление в жидкой среде никотиновой кислоты);
- ❑ дифференциация *M. tuberculosis* от *M. bovis* по способности редуцировать нитраты (положительный нитратредуктазный тест).



Яичная среда  
Левенштейна-Йенсена

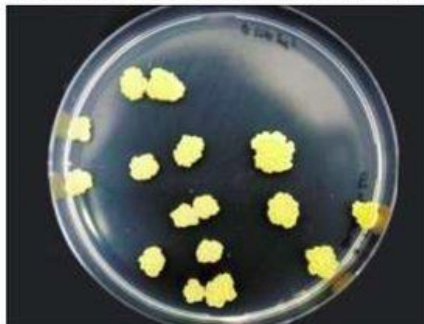


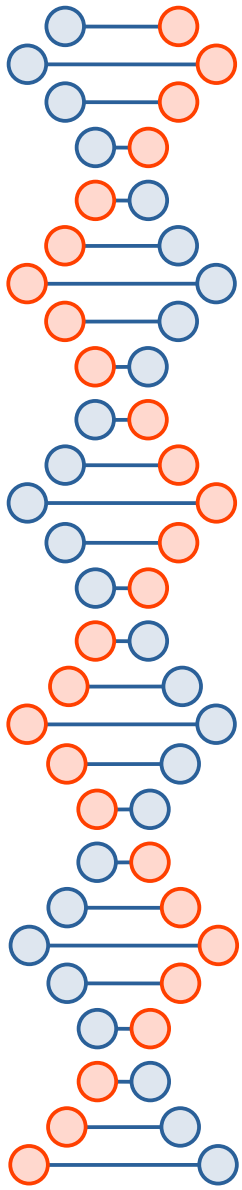
### **Элективные питательные среды для микобактерий:**

- яичные среды  
Левенштейна-Йенсена,
- глицериновые среды;
- картофельные среды с  
желчью;
- полусинтетическая среда  
Школьниковой;
- синтетические среды  
Сотона, Дюбо.

## **Культуральные свойства**

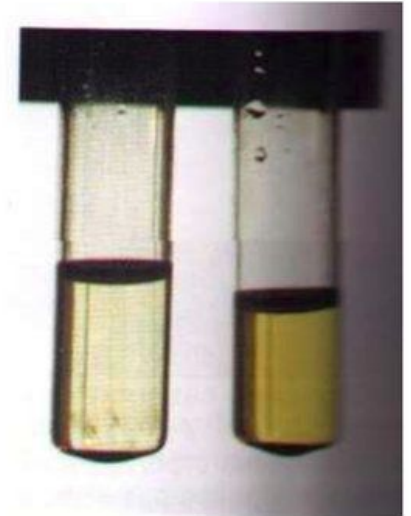
- Облигатные аэробы. Оптимальная температура роста 37-38°C. Оптимальное значение pH=6,8-7,2.
- Размножение их происходит очень медленно, время генерации – 14–16 ч. Это связано с выраженной гидрофобностью, которая обусловлена высоким содержанием липидов. Это затрудняет поставку питательных веществ в клетку, что снижает метаболическую активность клетки. Видимый рост на средах – 21–28 дней.
- Микобактерии требовательны к питательным средам. Факторы роста – глицерин, аминокислоты. Растут на картофельно-глицериновых, яично-глицериновых и синтетических средах. Во все эти среды добавляют вещества, которые ингибируют рост контаминирующей флоры - красители (малахитовый зеленый) и антибиотики, не действующие на микобактерии.
- На плотных питательных средах образуются характерные колонии: морщинистые, сухие, с неровными краями, не сливаются друг с другом (напоминают **цветную капусту**).
- В жидких средах растут в виде пленки. Пленка сначала нежная, сухая, со временем утолщается, становится бугристо-морщинистой с желтоватым оттенком. Среда при этом непрозрачная.

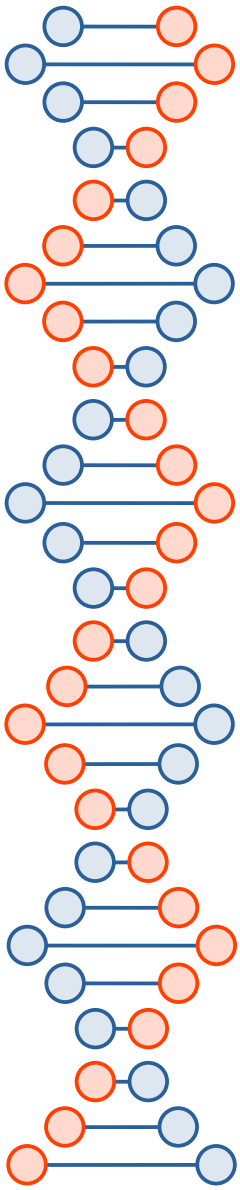




## Биохимическая активность

- *M. tuberculosis* **обладает** каталазной активностью, уреазой, никотинаминидазой, **восстанавливает** нитраты, **накапливает** в среде ниацин (ниациновый тест Конно – среда желтеет).
- *M. bovis* тоже **обладает** уреазой, но **не восстанавливает** нитраты, **не продуцирует** никотинаминидазу и **не накапливает** в среде ниацин.





## Факторы патогенности

**Токсины.** Токсическими свойствами обладают химические компоненты клетки: туберкулопротеин, липидные фракции, корд-фактор (высокотоксичен).

**Ферменты:** лецитиназа, каталаза, пероксидаза.

**Структурные и химические компоненты клетки:**

- ✓ Миколовая кислота – склеивает микобактерии, образует клетки Пирогова-Лангханса;
- ✓ Корд-фактор – токсическое действие на ткани, блокирует окислительное фосфорилирование на митохондриях, защищает от фагоцитоза, подавляет миграцию лейкоцитов;
- ✓ Липиды (фосфатидный фактор, фтионовая кислота, мурамиддипептид, воск Д) и полисахариды - образование эпителиоидных клеток, специфические гранулематозные изменения в тканях;
- ✓ Туберкулопротеин – развитие ГЗТ.

## Патогенность *M.tuberculosis*



Адгезины (гликолипиды, липоарабиноманнан)

Бактериоцины

АЛА (L-формы)

Продукция аммония

Каталаза, пероксидаза

Сульфатиды

Сидорофоры

Корд-фактор (гликолипиды, миколовые кислоты)

Туберкулопротеин (эндотоксин, аллерген)

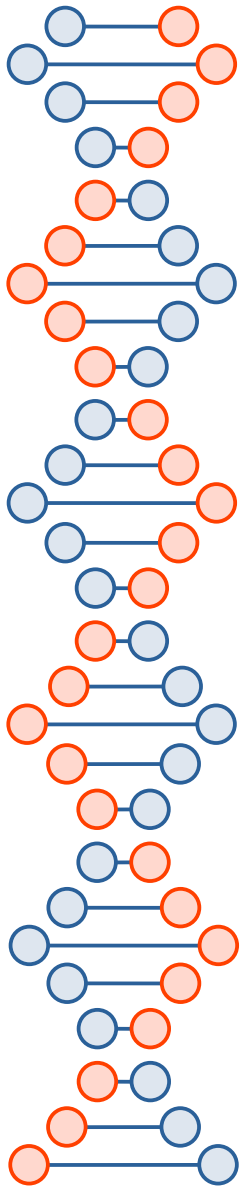


## Антигенная структура

- Липиды
- Полисахариды
- Корд-фактор
- Белки

## Иммунитет

- Клеточный (ГЧЗТ) и гуморальный (антитела – агглютинины, преципитины, лизины, опсонины, комплемент-связывающие )
- Нестерильный



# Корд-фактор

гликолипид, располагающийся на поверхности и в толще клеточной стенки

главный фактор патогенности, лишенные его туберкулезные палочки являются непатогенными или слабопатогенными для человека

- поражает мембраны митохондрий (в том числе макрофагов), блокируя в них процессы окислительного фосфорилирования
- тормозит миграцию фагоцитов

# Свойства *M.tuberculosis*, связанные с липидами

Гликолипиды (микозиды),  
миколовые кислоты (корд-фактор)

Устойчи-  
вость  
во внешней  
среде

Высокая  
гидро-  
фобность

Низкий  
метабо-  
лизм

Вирулент-  
ность

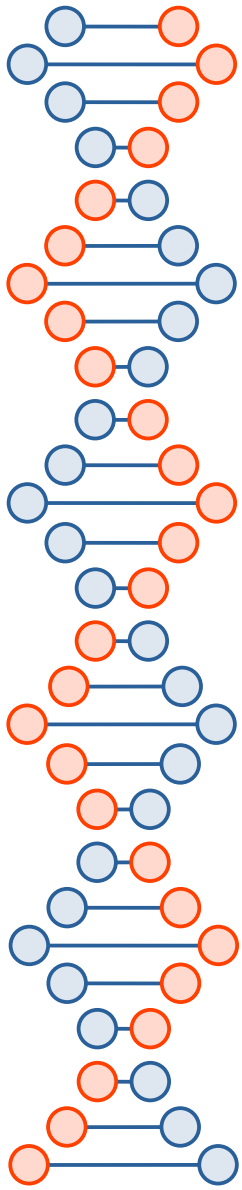
Иммуно-  
адью-  
вантная  
активность

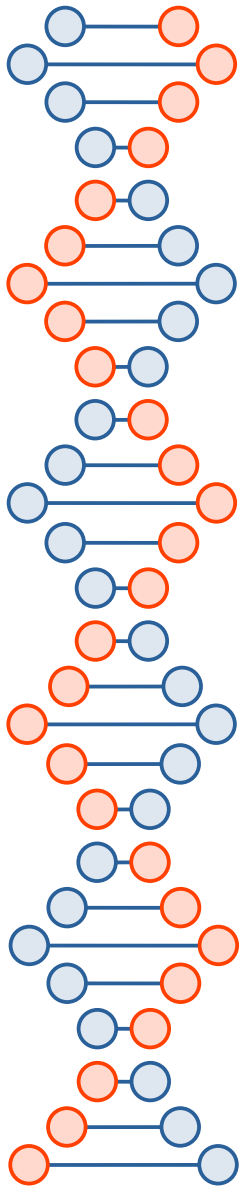
- Кислоты
- Щелочи
- Дезинфек-  
танты
- Высыхание

- R-форма
- Защита от  
макрофага

- Медленное  
размножение

- Блокада  
фаголизосом
- Нейтрализация  
антибактериальных  
факторов
- «Ускользание»  
в цитоплазму

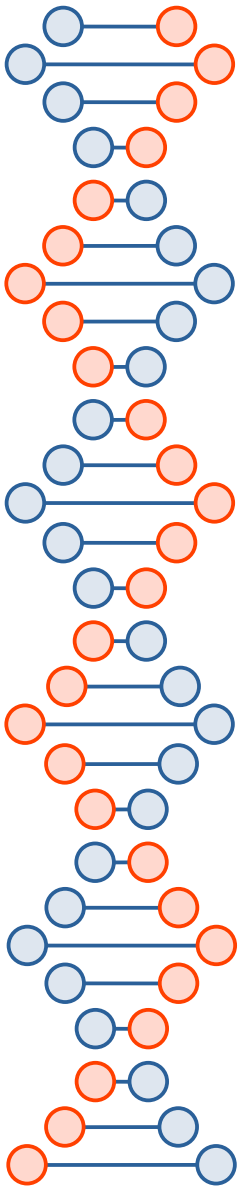
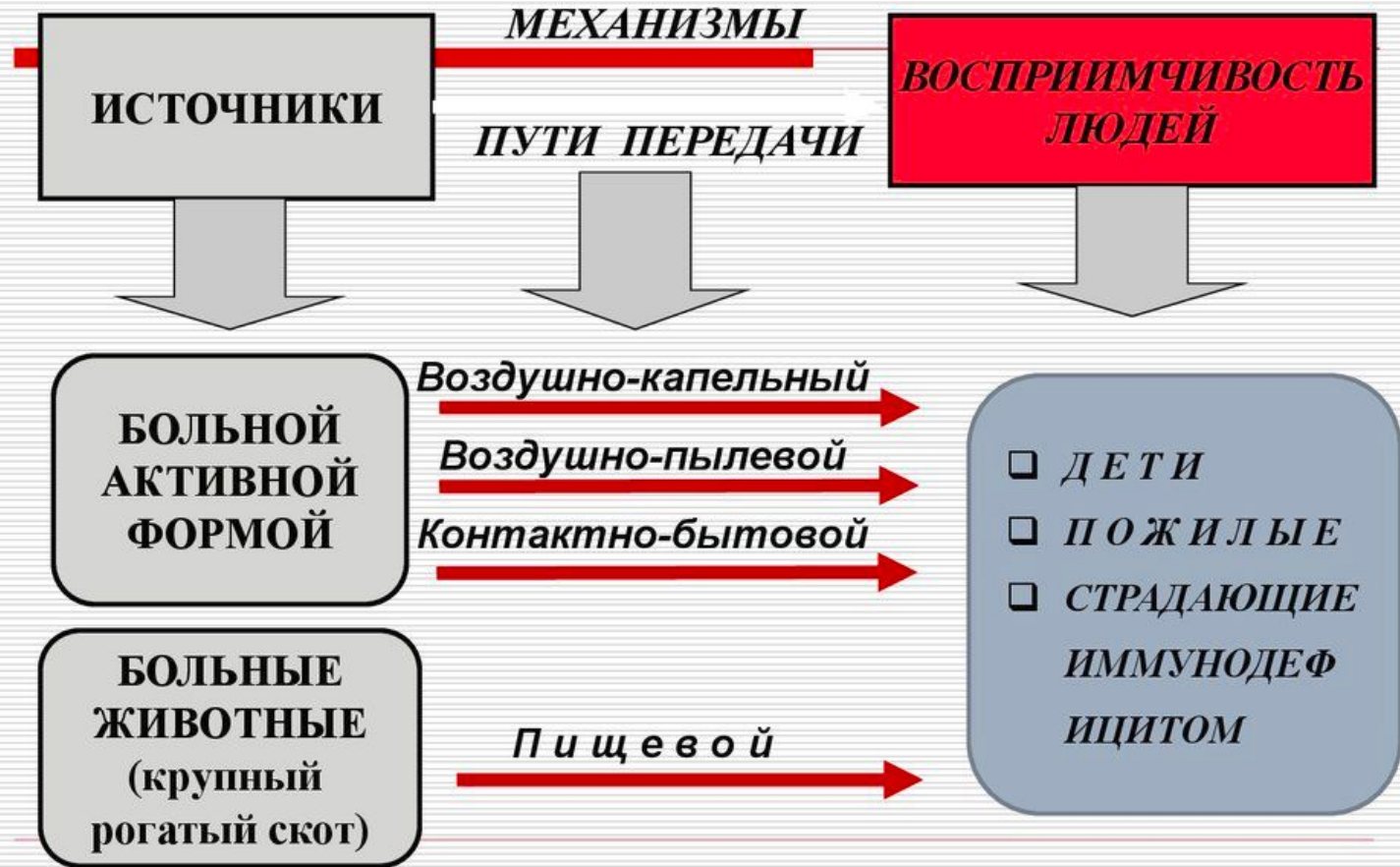




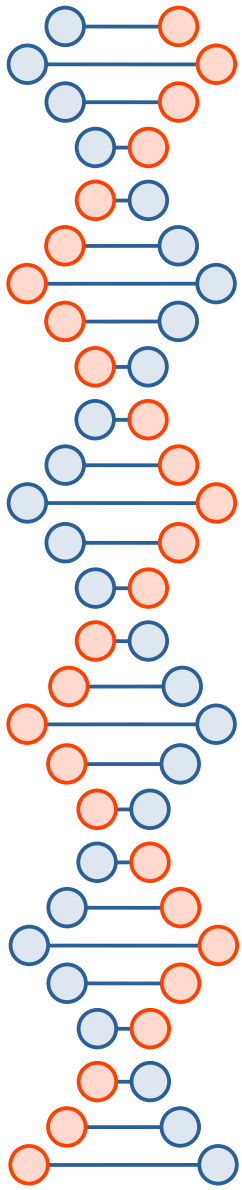
## Патогенез туберкулёза



# ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА



# ФОРМЫ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ



# Клинические проявления

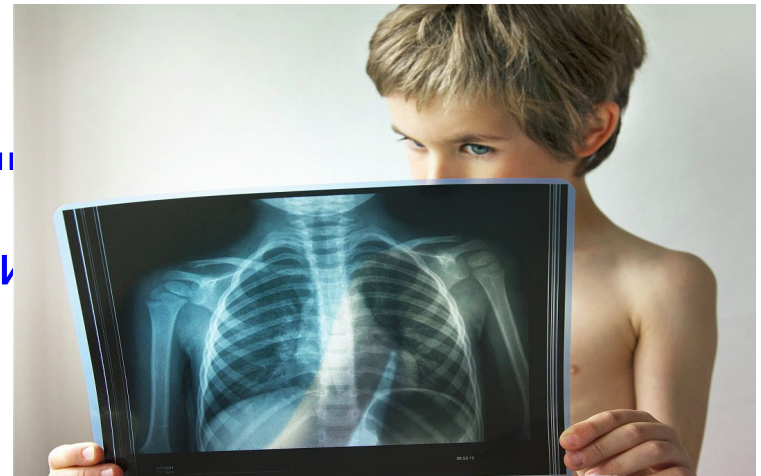
Туберкулез – инфекционное заболевание человека и животных

- склонность к хроническому течению
- образование специфических воспалительных изменений
  - часто имеющих вид маленьких бугорков
  - с преимущественной локализацией в легких и лимфатических узлах
  - хотя туберкулезная палочка может поражать любой орган и любую ткань с развитием соответствующей клинической симптоматики (пантропная бактерия)

Первичный туберкулез либо вовсе не сопровождается выраженной симптоматикой, либо напоминает собой гриппоподобный синдром.

При реактивации инфекции – вторичный туберкулез – наблюдаются (при туберкулезе легких):

- кашель (часто с кровохарканием) снижение массы тела обильное ночное потоотделение хронический субфебрилитет.





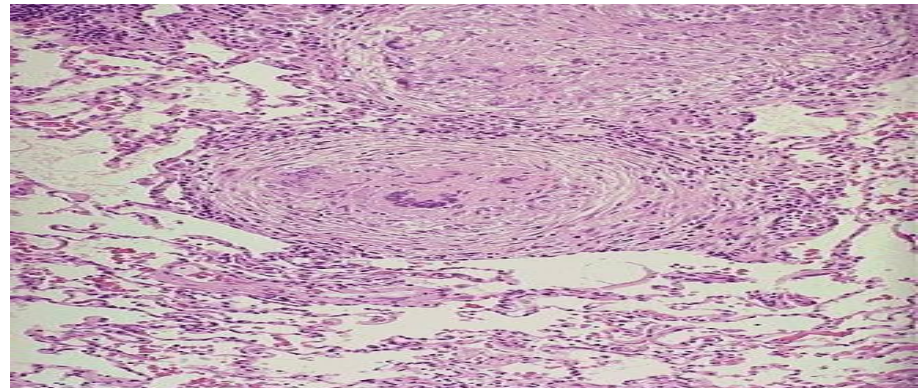
# Инфекционная гранулема (бугорок-образуется в месте внедрения возбудителя)

Состав:

- в центре - гигантские клетки Пирогова-Лангганса с множеством ядер, в них обнаруживаются туберкулезные палочки
- центр бугорка окружен эпителиоидными клетками, которые составляют главную массу бугорка
- по периферии — лимфоидные клетки

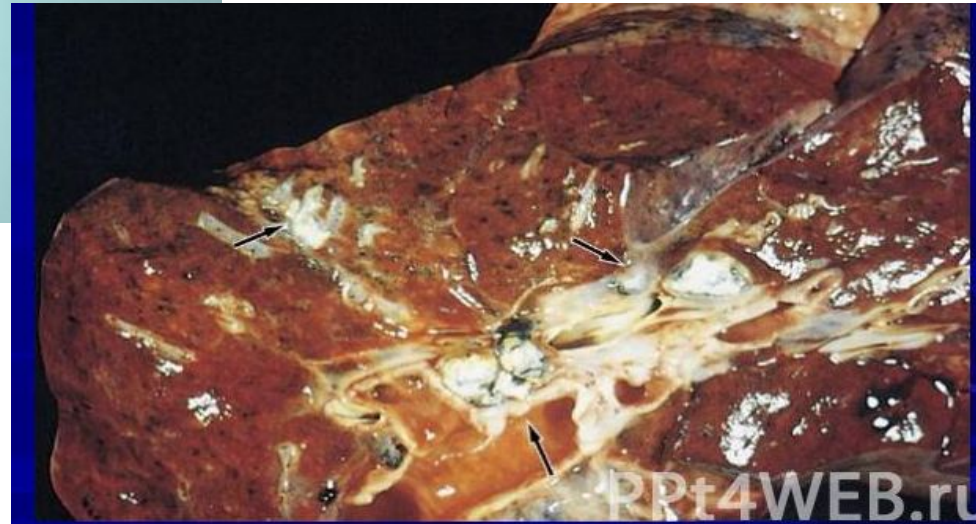
При неблагоприятном течении (при снижении общей резистентности) может увеличиваться и подвергаться творожистому (казеозному) распаду - как результат:

- действия токсических продуктов туберкулезной палочки
- отсутствия в бугорках кровеносных сосудов.



# Первичный туберкулез

- Обычно бессимптомная инфекция. Если инфекция ограничена, то формируется легочный инфильтрат с аденопатией, который рубцуется, но остается комплекс Гона (кальцифицированные - очаг и лимфоузел, на рентгенограмме виден «петрификат»)
- Характерен для детей раннего возраста



*Первичный туберкулезный комплекс*

# Вторичный туберкулез

- Симптомы вторичного туберкулеза могут развиваться как после первичного заболевания, так и при реинфекции экзогенными микобактериями
- В большинстве случаев процесс локализуется в верхушке легких (высокий уровень оксигенации способствует усилению роста аэробных палочек)

*Острый кавернозный туберкулез  
(легочная чахотка)*



# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Материал для исследования мокрота, промывные воды бронхов и промывные воды желудка, плевральная и цереброспинальная жидкости, моча, асцитическая жидкость и др.

## **I. Бактериоскопическое исследование мазков из материала:**

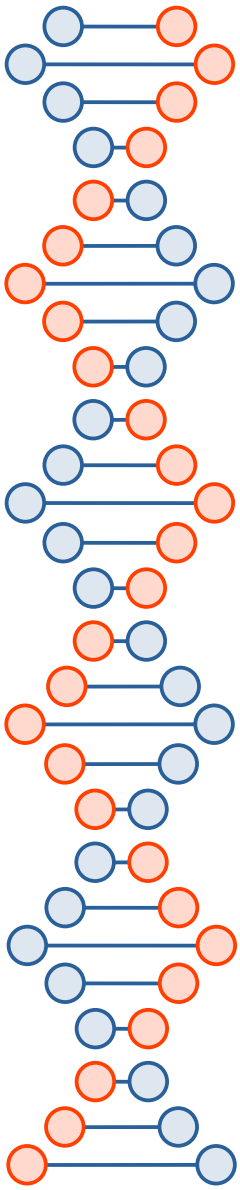
- Прямая микроскопия - по Цилю-Нильсену.
- Люминесцентная микроскопия.

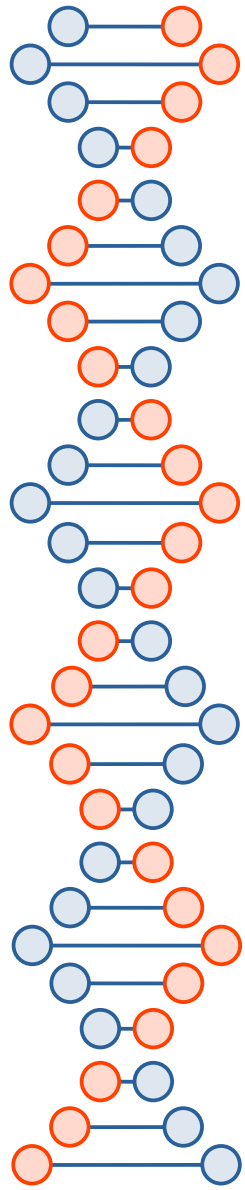
## **II. Бактериологическое исследование**

- Посев на плотные элективные среды.

## **III. Ускоренные методы культивирования**

- Метод микрокультур (метод Прайса - Школьниковой)
- Применение полностью автоматизированных коммерческих систем бульонного культивирования.





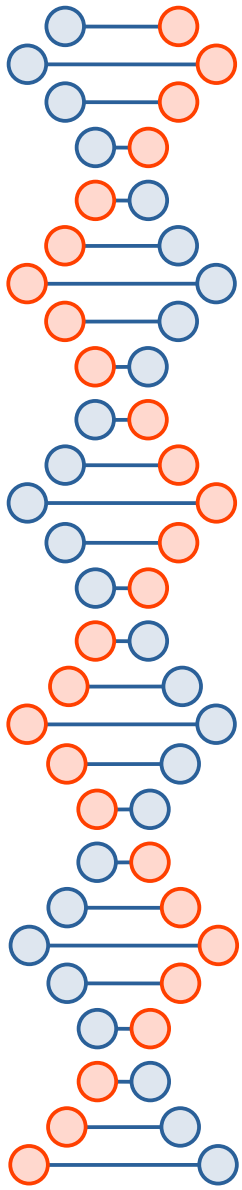
**IV. Биологическая проба** - морским свинкам подкожно или в/брюшинно вводят 1 мл исследуемого материала. Через 1-2 мес развивается генерализованная инфекция с летальным исходом

**V. Туберкулинодиагностика** – кожная аллергическая проба Манту.

**VI. Экспресс-диагностика** - РИФ, метод лазерной флуоресценции

**VII. ПЦР**

**VIII. ИФА** - обнаружение антител к возбудителям туберкулеза в сыворотках крови.



# Экспресс-метод



# Бактериоскопический метод диагностики

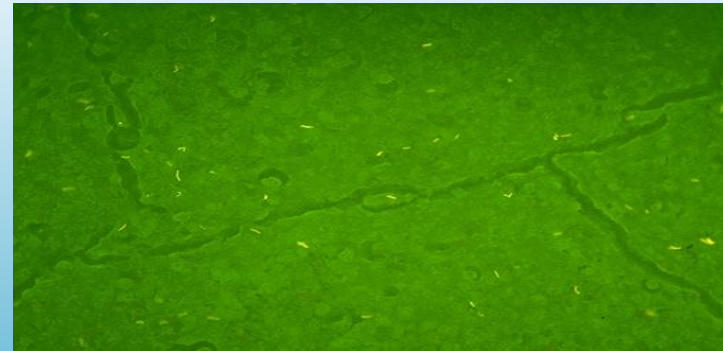
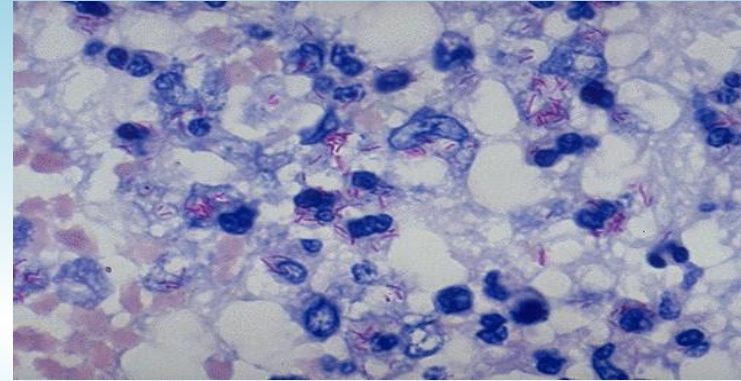
1. после окраски по Цилю-  
Нильсену

А. прямая

Б. после обогащения

- гомогенизация
- флотация

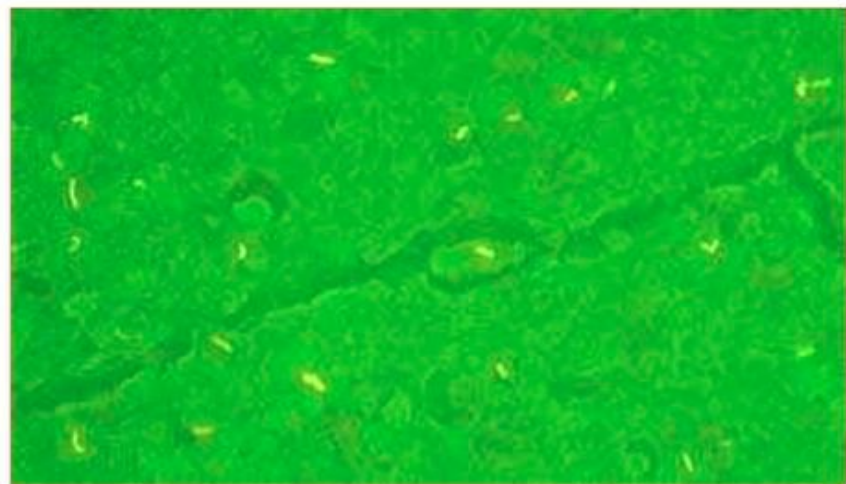
2. после окраски  
флюорохромом (чаще  
всего - аураминол)



▶ Люминесцентная  
микроскопия мазков  
мокроты, **окрашенных  
флюорохромами**  
(аурамин 00 или  
родамин С)  
(увеличивает  
разрешающую  
способность световой  
микроскопии на **14-30%**).

**Результат** –  
**через 24 часа.**

[**Метод предложен в 1910 г.**].





Подготовка материала для обнаружения  
микобактерий культуральным или биологическим  
методом

патологический материал



обработка кислотой



нейтрализация щелочью

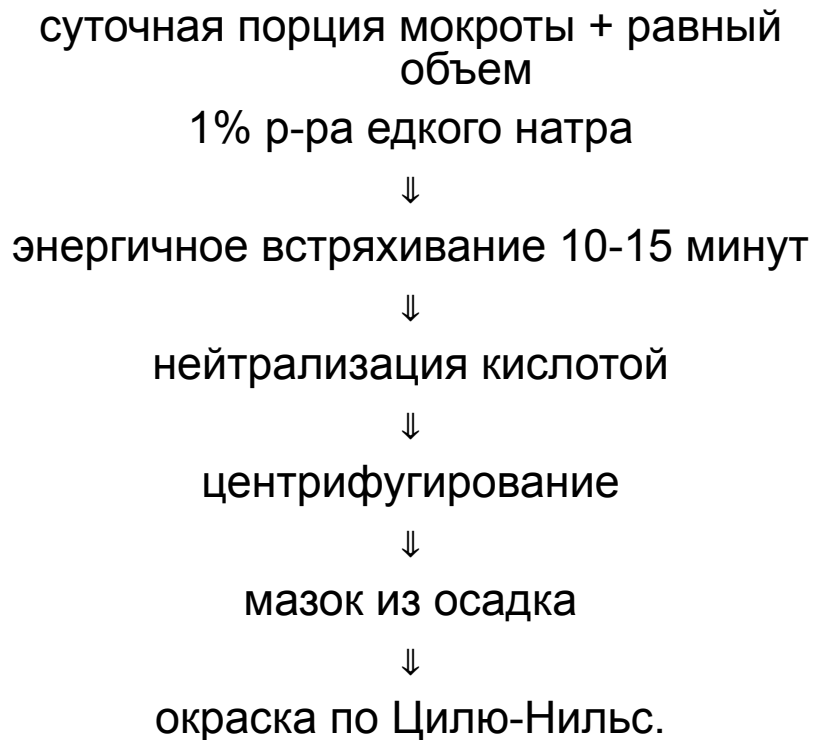


тщательное промывание водой

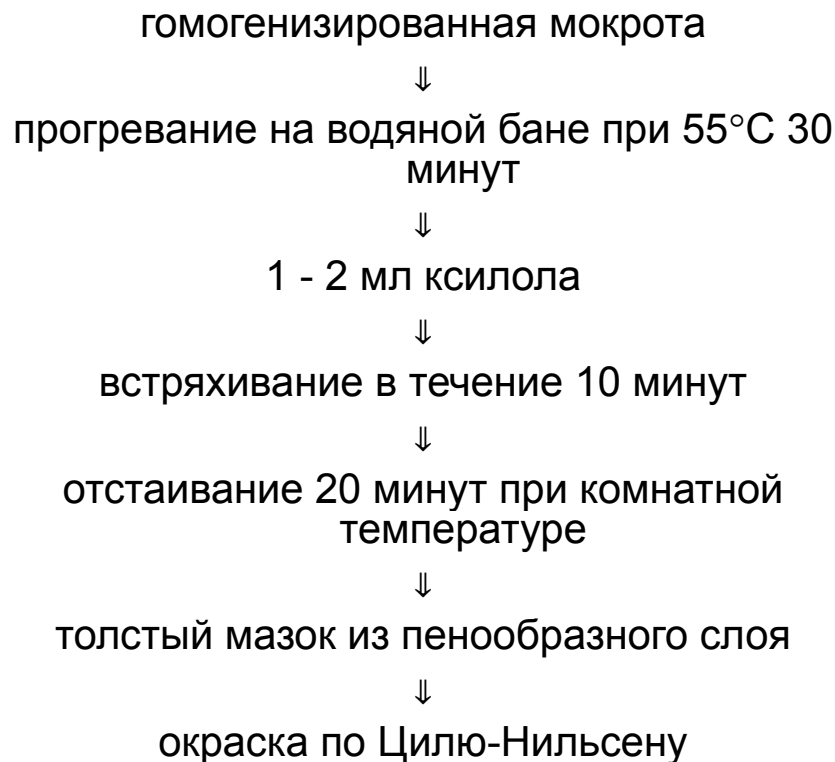
(патологический материал из закрытых полостей  
такой обработке не подвергают)

# Методы обогащения мазка

## Метод гомогенизации:



## Метод флотации:



# Культуральный метод

патологический материал



среда

Левенштейна-Йенсена



культивирование – от 2 до 12 недель



идентификация:

- ниациновая проба
- биопроба



определение чувствительности к туберкулостатическим препаратам

# Биологический метод

патологический материал



морская свинка

(0,1 мл подкожно в паховую область или в/брюшинно)



лимфаденит

(5-10 сутки)



положительная реакция на туберкулин

(3-4 неделя)



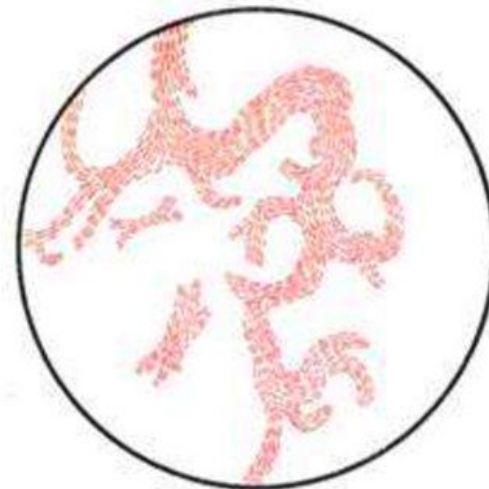
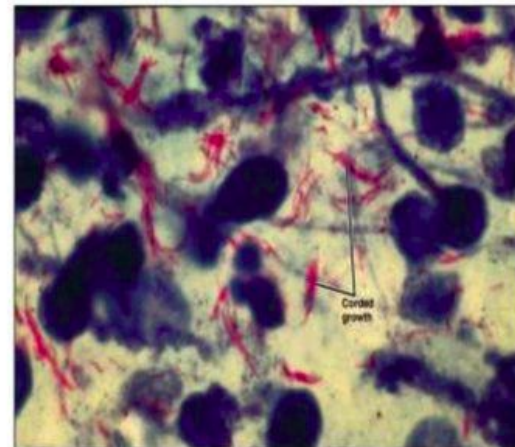
гибель

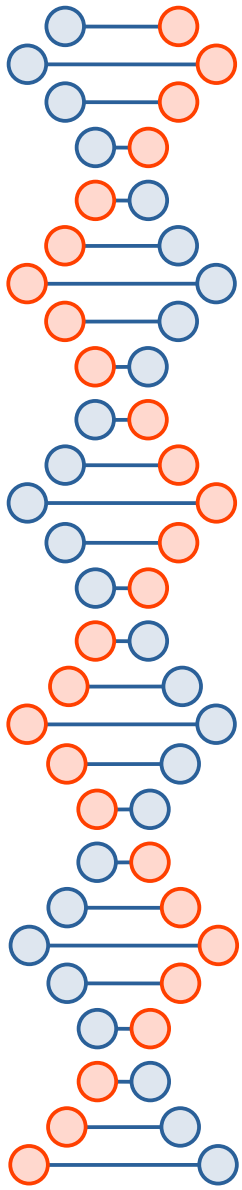
(1-2 месяца)

но: изониазидустойчивые штаммы снижают свою вирулентность для морской свинки

# Метод микрокультур Прайса

- Для экспресс-диагностики используют метод микрокультивирования на стеклах в жидкой среде (**метод микрокультур Прайса**), при котором через 48-72 часа отмечается рост микобактерий в виде переплетенных девичьих “кос” или “жгутов” благодаря корд-фактору (англ. cord - жгут, веревка).





## ВЫЯВЛЕНИЕ L-ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ПАЛОЧКИ:

1. РИФ с сыворотками против антигенов L-форм.
2. Засев в специальную полужидкую среду с последующей микроскопией образовавшегося через 1,5-2 мес. мутного облачка с включениями (похожего на манную крупу) с помощью фазово-контрастного микроскопа.
3. Многократные пассажи на морских свинках (при этом L-формы повысят свою вирулентность и вызовут инфекцию).



## Система ВАСТЕС MGIT 960 (2000)

### на жидкой питательной среде

**(объективный ускоренный метод выявления МБТ и ЛУ)**

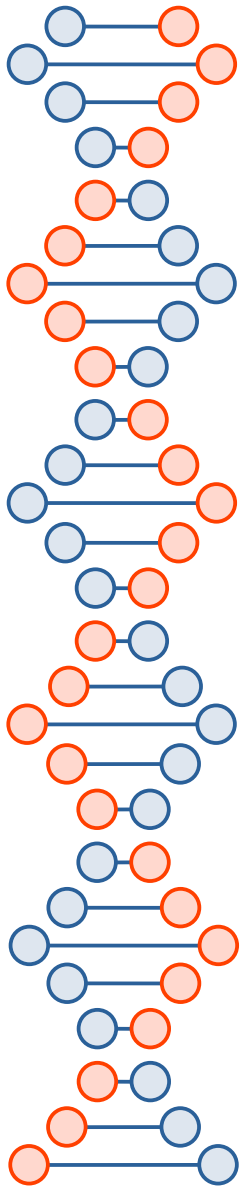


#### Индикаторный метод:

- пробирки с жидкой питательной Средой *Middlebrook* содержат флюоресцирующий индикатор «погашенный» высокой концентрацией O<sub>2</sub>;
- в процессе роста МБТ поглощают O<sub>2</sub>, что сопровождается усиление свечения индикатора;
- наличие роста МБТ регистрируется при помощи трансиллюминатора;
- полученные данные обрабатываются компьютером и выводятся на экран монитора.



1. ВАСТЕС позволяет выявлять **10-100 МБТ** в 1 мл мокроты.
2. Наличие роста МБТ регистрируется в течение **1-3 недель**.
3. Лекарственная устойчивость МБТ определяется в течение **3-6 недель**.



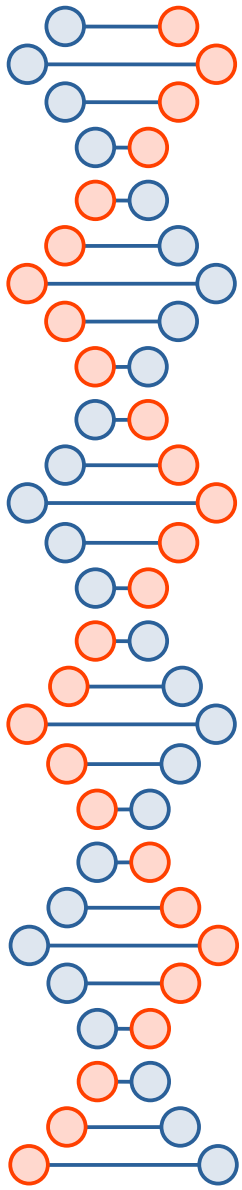
# • Технология MGIT

В основе методики лежит изобретение индикаторной пробирки MGIT- *Mycobacteria Growth Indicator Tube*, в дно которой встроен флуоресцентный кислородный датчик

1 раз в час флуоресцентный сенсор считывает результаты тестирования

**Положительные:** очень яркое оранжевое свечение на дне пробирки и оранжевое отражение в колене пробирки

**Отрицательные:** незначительное или полное отсутствие свечения  
(большое количество растворенного кислорода)





## Серологические методы

- ❑ Относительно широкие возможности для скрининга предоставляют методы серодиагностики, традиционно являются:
  - определение антигенов микобактерий;
  - обнаружение противотуберкулезных антител
  
- ❑ Результаты серологических тестов имеют наибольшую ценность для диагностики туберкулеза у детей, ВИЧ-инфицированных, для диагностики латентной, внелегочных форм туберкулеза.
- ❑ Основной метод – твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА)
  
- ❑ Серологические методы могут быть использованы для дифференциальной диагностики туберкулеза; детекции нетуберкулезных микобактериозов; оценки эффективности лечения, в первую очередь иммунокоррекции; прогнозирования течения заболевания; выявления аллергии к противотуберкулезным препаратам.

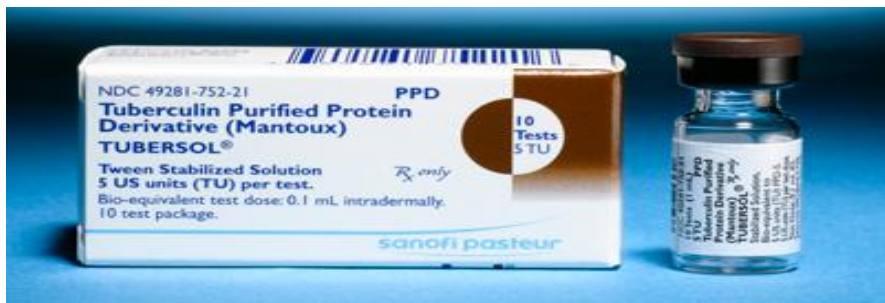


- ❑ Специфичность определения антител и антигенов *M.tuberculosis* зависит от используемых при иммунном анализе диагностикумов.
- ❑ ИФА позволяет определять в сыворотке или плазме крови человека, моче, мокроте специфические АТ всех трех основных классов иммуноглобулинов: G, M и A; а также антигены микобактерий.
- ❑ Серологическая диагностика туберкулеза не может
- ❑ заменить классические микробиологические методы.
- ❑ Данные серологических исследований всегда необходимо рассматривать **только** в комплексе с результатами, полученными с помощью других диагностических методов.



# Кожно-аллергическая проба Манту

- ❑ Внутрикожное введение высокоочищенного туберкулина (PPD= Purified Protein Derivative)
- ❑ вызывает у инфицированных микобактериями людей местную воспалительную реакцию в виде инфильтрата и покраснения (реакция ГЗТ).
- ❑ Неинфицированные люди никакой реакции на введение туберкулина не дают. Эту пробу применяют для выявления инфицированных, сенсibilизированных людей.



# Туберкулин

- ❑ Очищенный туберкулин (ППД) - purified protein derivative (PPD) Изготавливают из смеси убитых нагреванием фильтратов культуры МБТ человеческого и бычьего видов, очищенных ультрафильтрацией, осажденных трихлоруксусной кислотой, обработанных этиловым спиртом и эфиром.
- ❑ **Препарат предназначен** для массовой туберкулинодиагностики, с целью:
  - а) с целью отбора контингента для ревакцинации БЦЖ, а также перед первичной вакцинацией детей в возрасте 2 месяца и более.
  - б) для диагностики туберкулеза, в том числе для раннего выявления начальных и локальных форм туберкулеза у детей и подростков.
  - в) для определения инфицирования микобактериями туберкулеза.



# ДИАСКИНТЕСТ (*DIASKINTEST*)

- ❑ Диаскинтест – инновационный внутрикожный диагностический тест
- ❑ Действие препарата основано на выявлении клеточного иммунного ответа на специфические для *Mycobacterium tuberculosis* антигены.



# ДИАСКИНТЕСТ (*DIASKINTEST*)

- ❑ Аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении.
- ❑ Представляет собой продуцируемые генетически модифицированной культурой *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT белки.
- ❑ Синтез данных белков кодируется уникальной (отличной от других микобактерий) последовательностью генома *M.tuberculosis*.
- ❑ *Два рекомбинантных белка (ESAT6/CFP10) отсутствуют у вакцинного штамма M.bovis BCG и большинства нетуберкулезных микобактерий, за счет чего тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью.*

## Преимущества Диаскинтеста над пробой Манту:

- позволяет четко дифференцировать лиц , больных туберкулезом и инфицированных *M.tuberculosis* с высоким риском развития заболевания, вакцинированных вакциной BCG и сенсibiliзированных нетуберкулезными микобактериями.
- высокая чувствительность;
- помогает понять эффективность лечения, результат отрицательный у людей которые выздоровели от туберкулеза;
- вызывает гораздо меньше осложнений, чем проба Манту

## Противопоказания к проведению Диаскинтеста:

1. хронические и острые инфекционные заболевания с высокой температурой;
2. острая фаза заболеваний внутренних органов;
3. сильная аллергия;
4. эпилепсия;
5. карантин по детским инфекциям;
6. после любых профилактических прививок прошло менее месяца.

### ■ ЭВОЛЮЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА



1882 г.

Открытие МБТ  
Р. Кохом



1890 г.

Открытие Р. Кохом  
туберкулина



1907 г.

Внедрение метода  
тубердиагностики  
К. Пирке



1932 г.

Синтез  
очищенного  
туберкулина



2008 г.

Создание  
Диаскинтеста®  
в НИИ Молекулярной  
медицины ММА  
им. И. М. Сеченова



1965 г.

Внедрение  
пробы Манту  
в СССР

## Техника проведения



## Оценка реакции



# Результаты

## Виды реакции на пробу



**Отрицательная реакция**  
при полном отсутствии  
папулы



**Сомнительная реакция**  
при наличии гиперемии  
без папулы



**Положительная реакция**  
при наличии папулы  
любого размера

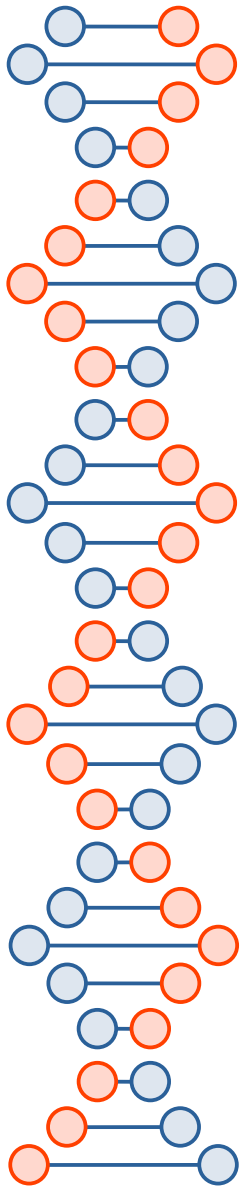


**Гиперергическая  
реакция**  
при наличии папулы  
≥ 15 мм или везикуло-  
некротических  
изменениях



- Отрицательный (туберкулеза нет) – в месте введения препарата нет ни покраснения, ни уплотнения, ни отека.
- Сомнительный – есть гиперемия (покраснение) любого размера, но уплотнения нет либо оно не больше 2–4 мм.
- Положительный (нужны дополнительные обследования на туберкулез) – покраснение и уплотнение размером 5 мм и более.





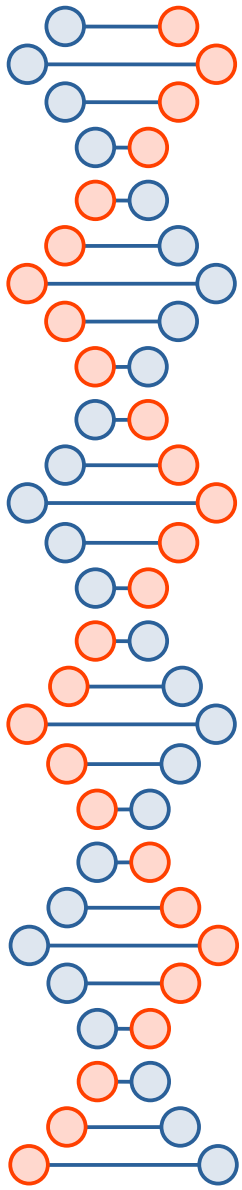
**Полимеразно-цепная реакция (ПЦР) –**  
**является одним из наиболее быстрых и**  
**информативных методов выявления МБТ**

**ПЦР открыл в 1985 г. Кэрри Мюллисом –**  
**лауреат Нобелевской премии за 1989 год.**

Принцип метода состоит в увеличении в  $10^6$ — $10^8$  раз числа копий (**амплификации**) специфического фрагмента ДНК МБТ (***IS6110***), катализируемого *in vitro* специфической ДНК-полимеразой (**браймером**) в автоматическом режиме.

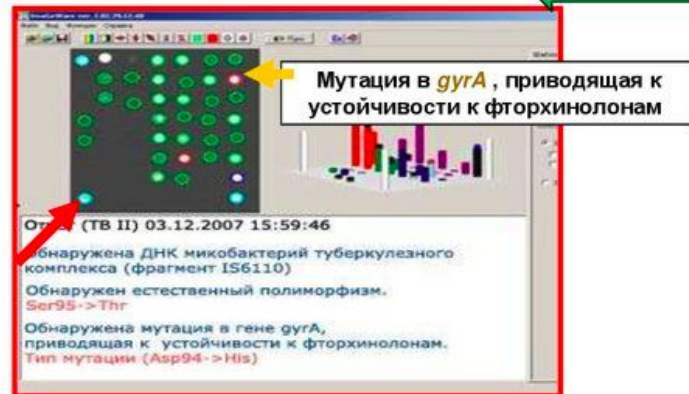
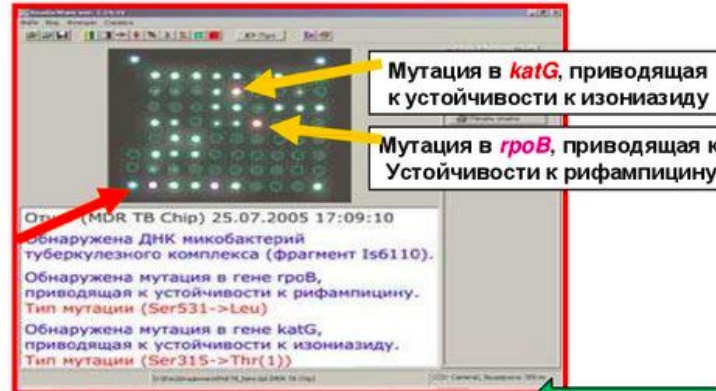
**К достоинствам метода ПЦР относятся:**

- высокая чувствительность, позволяющая определять 10—100 клеток в биологической пробе;
- высокая специфичность ДНК МБТ в исследуемом материале (например: *в мокроте*);
- универсальность процедуры обнаружения МБТ из одной биологических проб
- высокая скорость анализа (4—4,5 ч).



## **ПЦР для быстрого выявления МБТ и определения лекарственной устойчивости**

(микрочипы созданы в РФ в 1988 г. акад. А. Д. Мирзабековым в институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгарта)



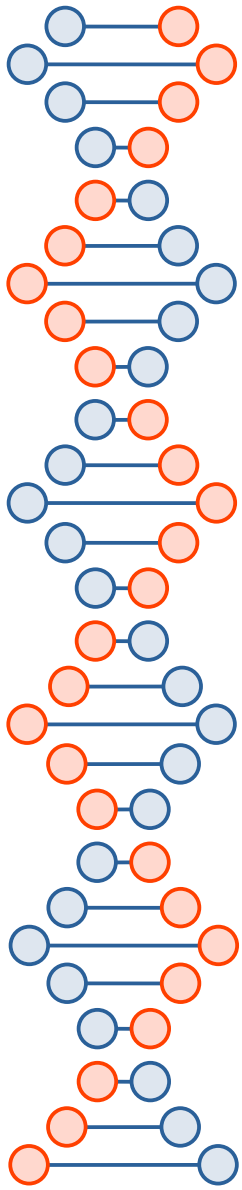
Метод основан на многократной **амплификации фрагмента (IS6110)** ДНК МБТ, который катализируется **браймером** (специфической ДНК-полимеразой):

• ПЦР выявляет присутствие **5-10 МБТ в мокроте через 24 часа.**

**МИКРОЧИПЫ** (в 2003 г. методика разработана Российскими Учеными)

1. Выявление мутации в гене: *katG*, ответственном за устойчивость к **изониазиду**.
2. Выявление мутаций в гене: *groV*, ответственном за устойчивость к **рифампицину**.
3. Выявление мутации в гене *gyrA*, ответственном за устойчивость к **фторхинолонам**.

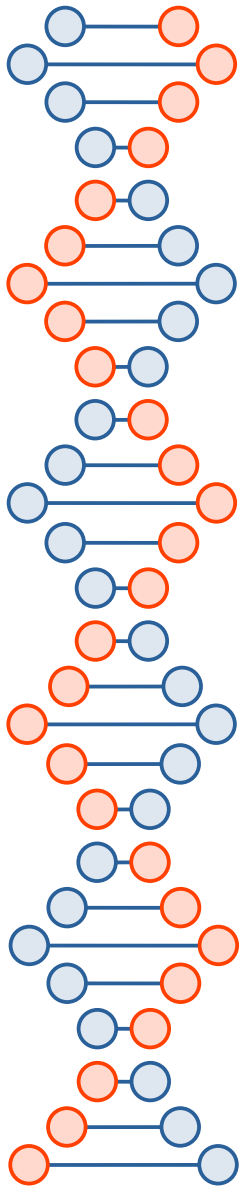
► **лекарственная устойчивость МБТ устанавливается на 2-3 день.**



## ПЦР-диагностика туберкулеза

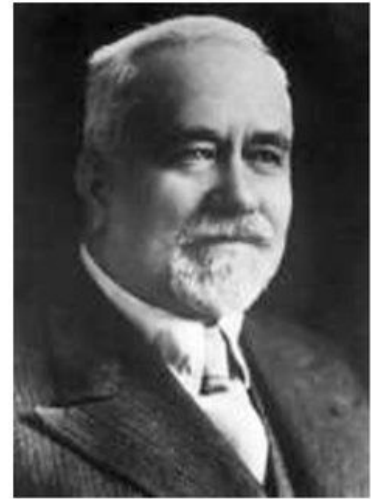
Как правило, строится на использовании последовательностей ДНК, специфичных для всех 4 видов группы туберкулеза. Часто для этих целей используют праймеры для выявления последовательностей IS-элементов, например, IS-986 или IS-6110, т.к. данные мигрирующие элементы характерны только для видов микобактерий туберкулеза и присутствуют в геноме микобактерий в числе нескольких копий.





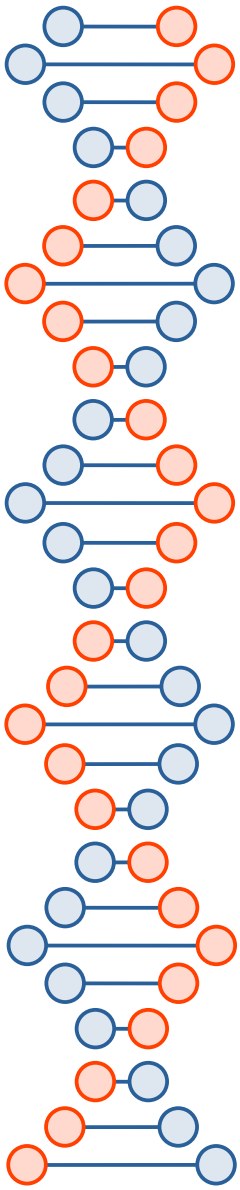
## Специфическая профилактика

- Вакцина БЦЖ (BCG – бацилла Кальметта и Герена, Bacille Calmette-Guerin) – содержит живые ослабленные микобактерии, полученные из *M.bovis* путем многолетних пассажей на средах, содержащих желчь. Вакцинируются дети в возрасте 5 - 7 дней (при ранней выписке из роддома - на 3 день) жизни. Ревакцинацию проводят лицам с отрицательной туберкулиновой пробой.  
**NB:** у новорожденных со сниженной резистентностью применяют менее реактогенную вакцину BCG-M (с меньшим содержанием антигена).
- Поствакцинальный иммунитет связан с формированием ГЗТ (гиперчувствительности замедленного типа).

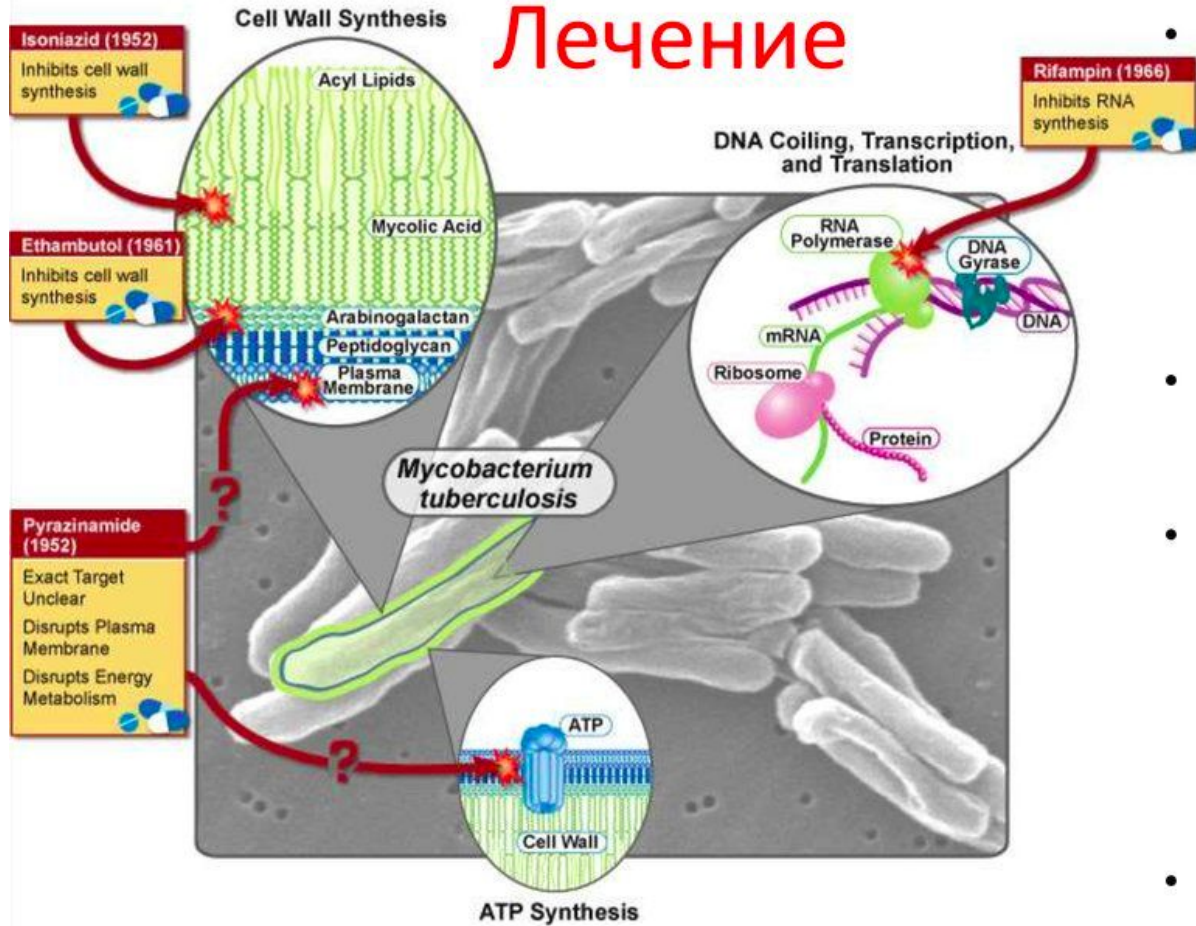


ALBER CALMETT

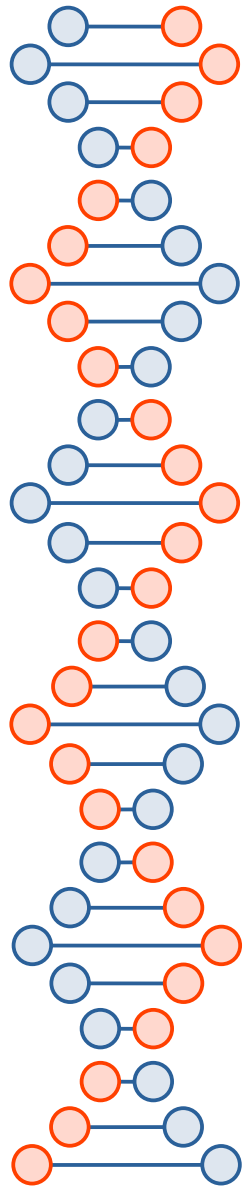
(1862 – 1933)



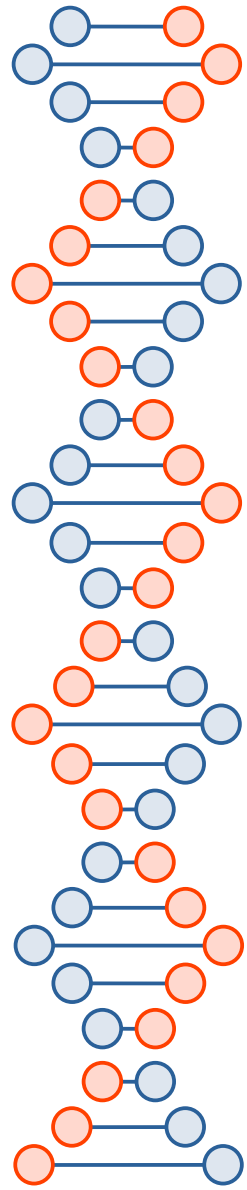
# Лечение



- В настоящее время по степени эффективности противотуберкулезные препараты делятся на 3 группы:
- Группа **A** – изониазид, рифампицин
- Группа **B** – стрептомицин, канамицин, этионамид, циклосерин, фторхинолоны и др.
- Группа **C** – ПАСК и тиацетозон
- курс лечения не менее года



# ВОЗБУДИТЕЛЬ ЛЕПРЫ (*Mycobacterium leprae*)



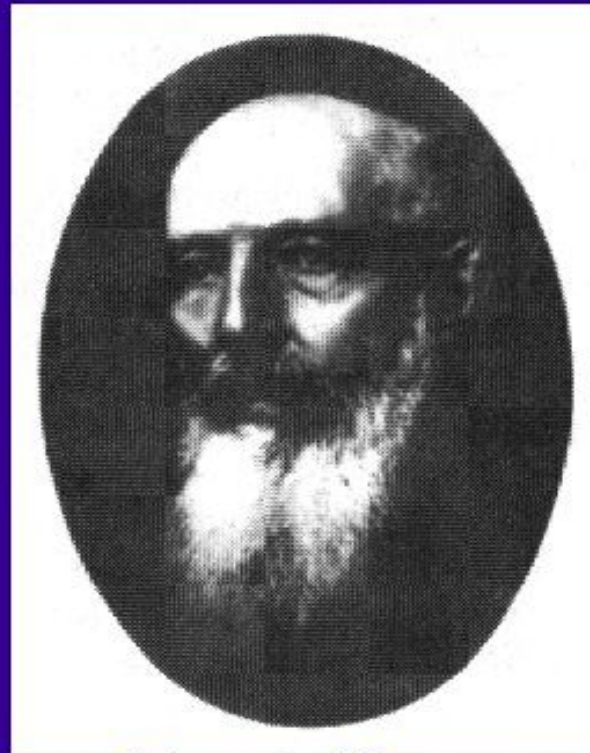
**Лепра** (от *lepro* – лущить) – проказа, болезнь Хансена – антропонозный генерализованный микобактериоз с длительным инкубационным периодом, протекает в виде хронической болезни с поражением кожи, слизистых оболочек, периферической нервной системы и внутренних органов. **Синонимы:** лисья короста, гниючка,

ленивая смерть, скорбная болезнь и др.

### **Морфология возбудителя**

Г+ палочка размером 0,2-0,5X 1,0-7,0 мкм. Имеет микрокапсулу. Описаны нитевидные, ветвистые, гантелевидные клетки. Окрашиваются по методу Циль-Нильсена в красный цвет.

**M. leprae** – строгий внутриклеточный паразит, не культивируется на искусственных питательных средах. Скопления бактерий в клетках – в виде шаров или палочек сигар

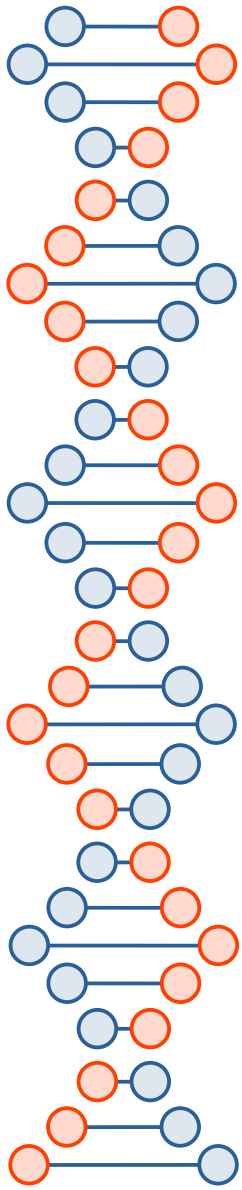
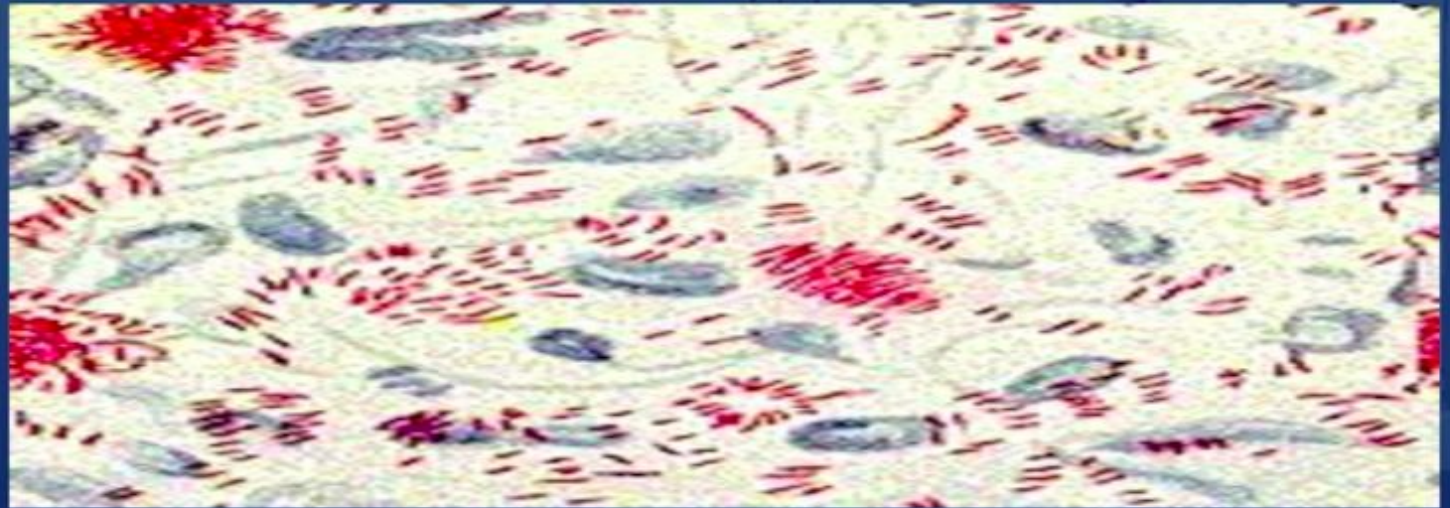


Герхард Хансен

## 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).

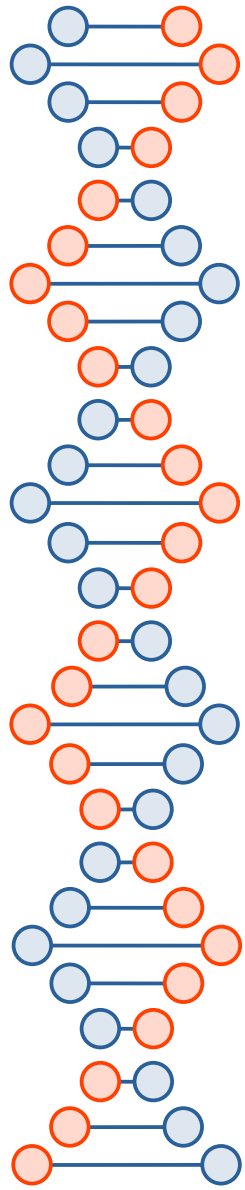




# Возбудитель лепры (палочка Гансена)

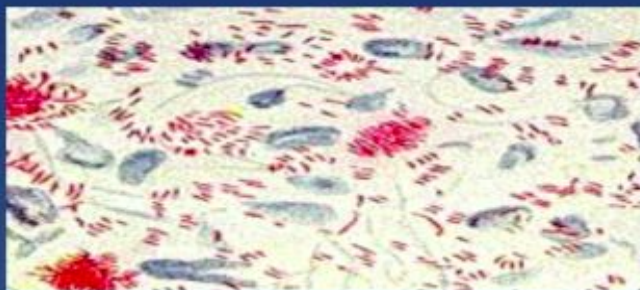


Микобактерия  
лепры  
(*M. Leprae*).  
Окраска по  
Цилю-  
Нильсену

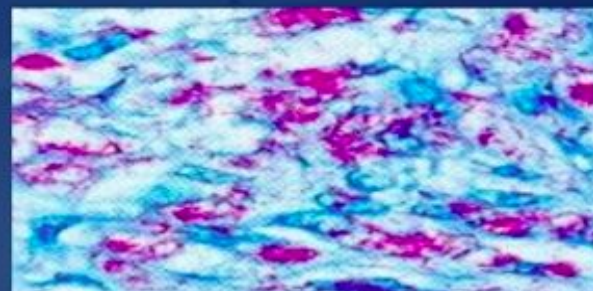


## Мycobacterium leprae в лепрозном бугорке (окраска по Цилю-Нельсену)

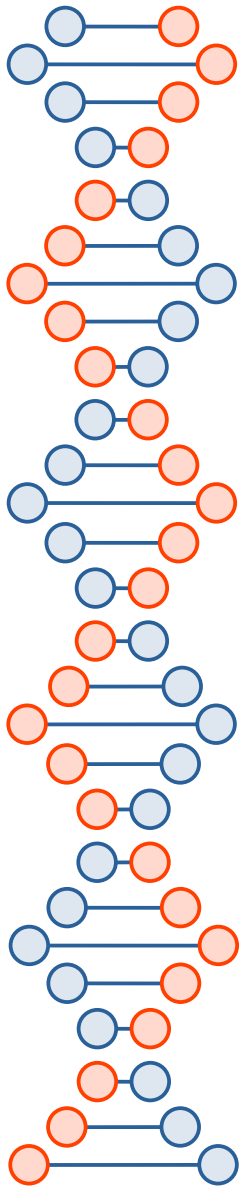
Рисунок



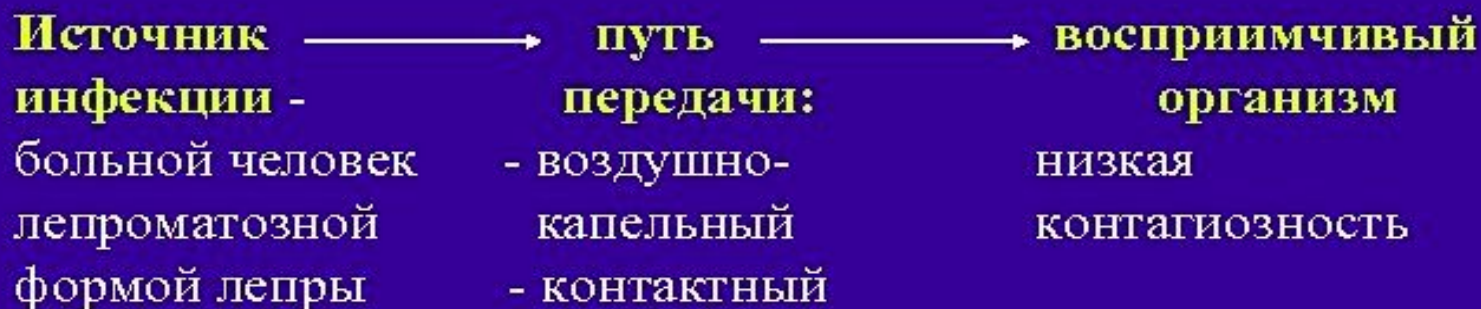
Препарат



**М. 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



## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ЛЕПРЫ

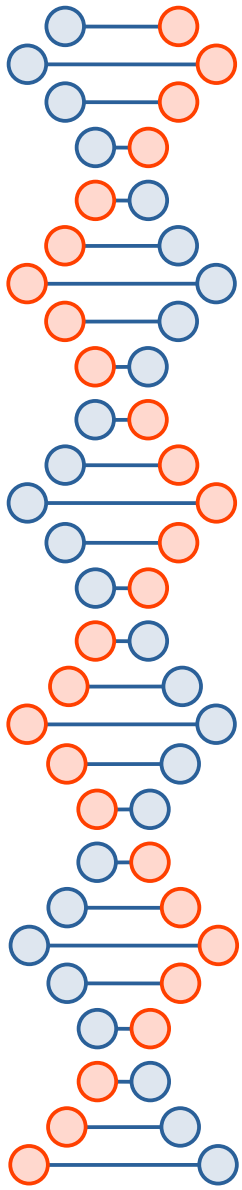


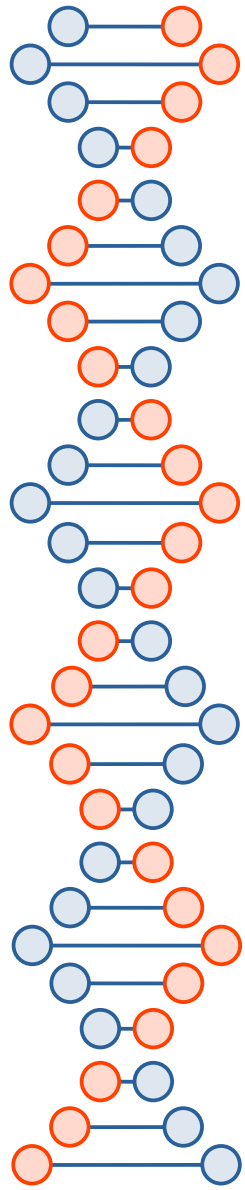
Заражение наступает в результате длительного бытового контакта, когда больной и здоровый едят и пьют из общей посуды, пользуются общим бельем, спят в одной постели (заболевает 10-12% контактировавших), если при этом социально-гигиенические условия низкие – заболевают до 36% и более.

**В мире 5млн больных лепрой.**  
**В РФ – 750 больных лепрой.**

## Микробиологическая диагностика

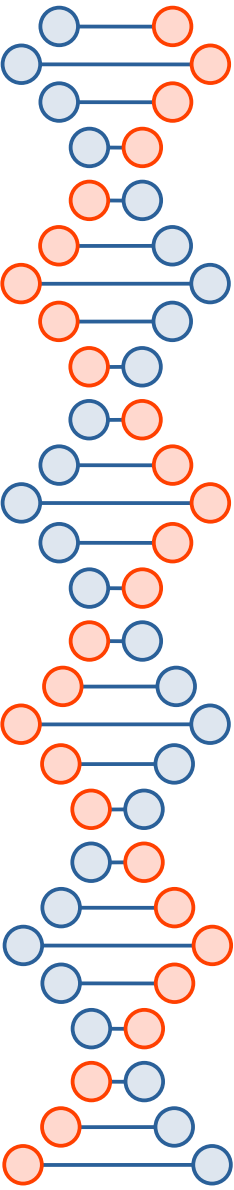
- . Бактериоскопический метод: в мазках из соскоба кожи, препаратах из лепром, окрашенных по Цилю-Нельсену, обнаруживают внутриклеточно параллельно расположенные кислотоустойчивые палочки. Возбудитель выявляется, обычно, только при лепроматозной форме болезни.
- Кожно-аллергическая проба путем внутрикожного 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.





*M. leprae* не культивируются на искусственных питательных средах и непатогенны для морских свинок и кроликов.

Серологическая диагностика основана на обнаружении антител к фенольному гликолипиду в ИФА. При LL-форме заболевания антитела определяются в 95 % случаев, а при ТГ-форме — в 50 % случаев. В настоящее время получены моноклональные антитела, которые позволяют определять лепрозные антигены в тканях, разрабатывается ПЦР.

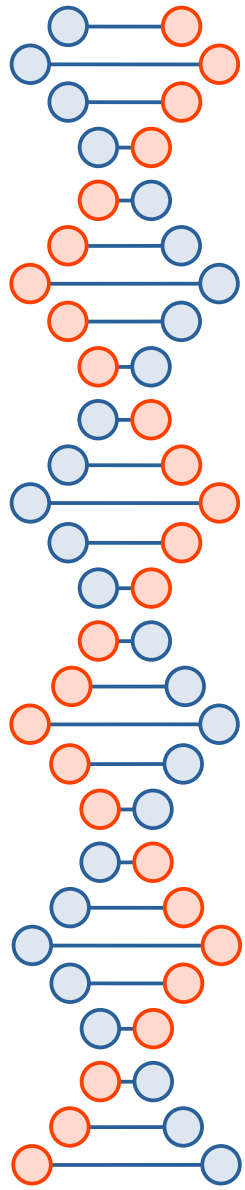


## Клинические формы лепры

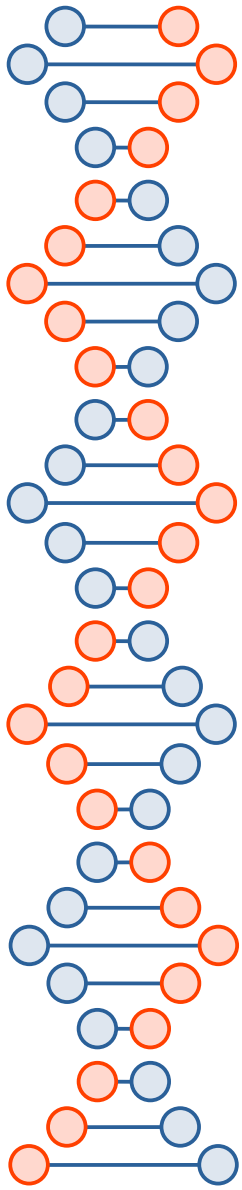
- Лепроматозная форма
- Туберкулоидная форма
- Пограничная форма

## Особенности иммунитета при лепре

- имеет значение степень напряженности естественного иммунитета. Она выявляется постановкой лепроминовой пробы (реакция Фернадеса –ранняя, через 48 час, реакция Мицуды – поздняя, через 2-4 недели),
- иммунитет носит клеточный характер, его активность определяется лепроминовой пробой.



- Лепрозная гранулема – чаще в коже
- Характерны **клетки Вирхова** (лепрозные шары): гигантские вакуолизированные клетки с палочками Ганзена, упакованными в виде **сигарет в пачке**
- При туберкулоидной форме – поражение кожи и периферических нервов, эпителиоидно-клеточные гранулемы, напоминающие туберкулезные, микобактерии обнаруживаются редко.
- Осложнения – язвенные поражения кожи, мутиляция



*Mycobacterium leprae* проявляет  
выраженный тропизм:

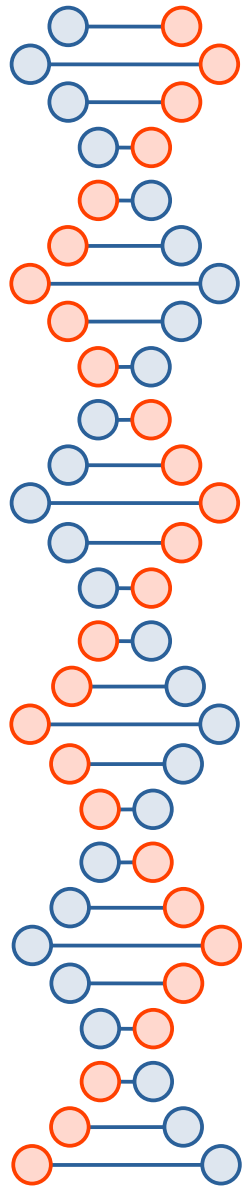
- к клеткам кожи;
- периферических нервов.

*Характерной особенностью пораженных  
клеток (лепрозных клеток или клеток  
Вирхова):*

- наличие бледного ядра;
- «пенистой» цитоплазмы за счет  
содержания липидов;
- явление незавершенного фагоцитоза.

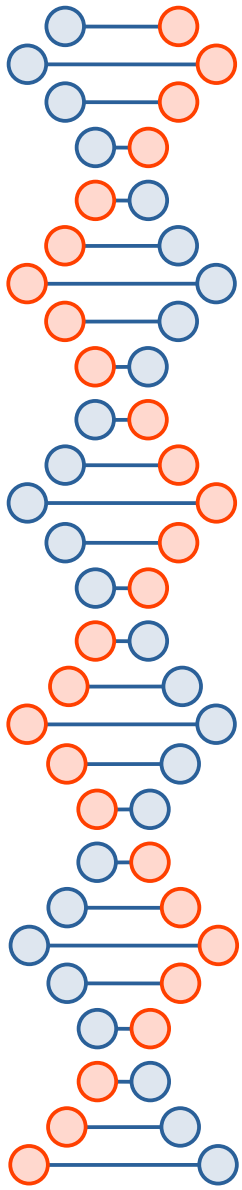






## Недифференцированная форма

- Проявляется кожными высыпаниями и поражениями периферических нервных стволов. Может трансформироваться в лепроматозную или туберкулоидную форму. Высыпания представляют четко ограниченные пятна (леприды) различной окраски и размеров; короткий период гиперестезии высыпаний сменяется анестезией. Моно- и полиневриты часто сопровождаются неравномерными утолщениями нервных стволов.



## Львиное лицо.



188



189

Львиное лицо — характерный признак лепроматозной проказы. Кожа утолщена, образует грубые складки. В соскобах кожи легко выявить возбудителя.

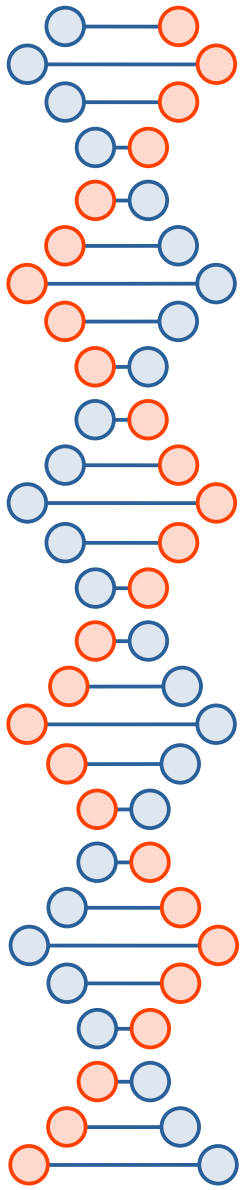


ЛЕПРА.



Лицо рассерженного льва.





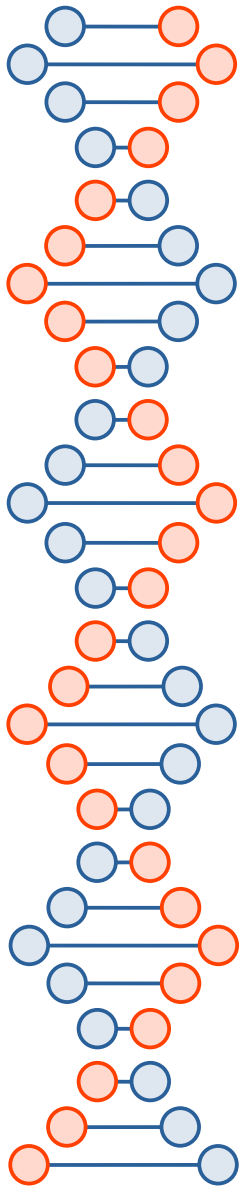
## Туберкулоидная проказа.

На снимке - больной погранично-туберкулоидной проказой. Кожные поражения сравнительно немногочисленны, располагаются асимметрично и приподняты над поверхностью кожи. Потоотделение и чувствительность в области высыпаний нарушены. Гистологически очаги поражения представлены гранулемами, в которых очень редко можно обнаружить *Mycobacterium leprae*. Лепроминовая проба резко положительна.



### Поражение периферических нервов.

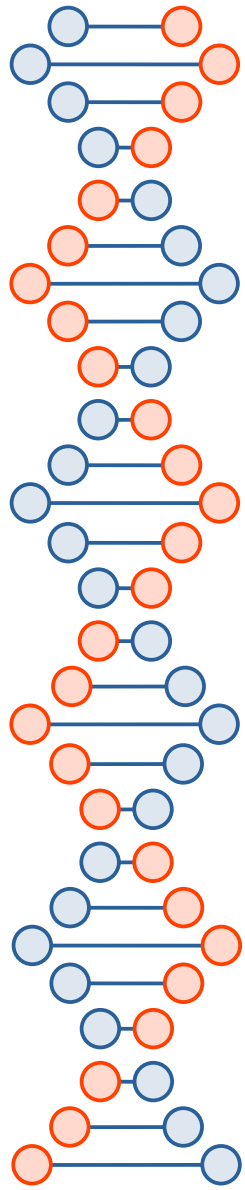
В ряде случаев инфекция затрагивает только нервы, и высыпания на коже отсутствуют. У этого больного в результате поражения лучевого нерва произошло выпадение чувствительности в области большого пальца, сформировалась «висячая кисть».



## Когтистая лапа

частое проявление проказы (особенно пограничной). При поражении локтевого нерва нарушается сгибание в пястнофаланговых суставах и развивается атрофия мышц возвышений большого пальца и мизинца. В дальнейшем деформация кисти может усилиться за счет мышечных контрактур. При этом наблюдается выпадение чувствительности в зоне иннервации локтевого нерва.





## Профилактика лепры

1. Социально-экономические мероприятия, направленные на повышение жизненного уровня населения;
2. Индивидуальные меры – строгое соблюдение правил личной гигиены, изоляция больных в лепрозориях и на дому, диспансеризация.
3. Специфическая профилактика:

- вакцина БЦЖ
- вакцина из инактивированных *M. leprae*

## Лечение лепры

- Сульфоновые препараты (серосодержащие): далсон, солгосульфон, диуцифон и др.
- Антибиотики – рифампицин
- препараты тиомочевины



**Спасибо за внимание!**