

**Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Сибирский Государственный
Медицинский Университет»**

**Министерство здравоохранения и социального развития Российской
Кафедра микробиологии и вирусологии
Федерации**



Лекция №2.

**ПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ – ВОЗБУДИТЕЛИ
ВОЗДУШНО-КАПЕЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ – ДИФТЕРИИ И КОКЛЮША.
ВОЗБУДИТЕЛИ ТУБЕРКУЛЕЗА.**

Лектор: к.м.н., доцент кафедры микробиологии и вирусологии В. Г. Пехенько

Томск-2010 г.

Возбудитель дифтерии

- **Дифтерия** — острая бактериальная антропонозная инфекция верхнего дыхательного тракта, характеризующаяся интоксикацией, фибринозным воспалительным процессом в ротоглотке, носу, гортани, трахее, способная давать осложнения в виде крупа, паратонзиллярного абсцесса, миокардита, полирадикулоневрита.
- **Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae*** выделен в чистой культуре *Леффлером* в 1884 г.
- Возбудитель *Corynebacterium diphtheriae* (палочка Леффлера) относится к роду *Corynebacterium*. Существуют 3 типа (биоварианта): *gravis*, *mitis*, *intermedius*. При подъемах заболеваемости чаще выделяется возбудитель типа *gravis*.

Морфологические и тинкториальные свойства

Метахроматин в клетках возбудителя дифтерии



- Размеры дифтерийной палочки: длина 1—6 мкм, толщина 0,3— 0,8 мкм. Отличительной особенностью возбудителя дифтерии является *многообразие форм* — наряду с длинными изогнутыми, изящными "типичными" палочками микробов встречаются короткие толстые с колбовидными вздутиями на концах, иногда коккообразные клетки, что придает микробу сходство с булавой. В колбовидных вздутиях часто находят **волютиновые зерна** (*тельца Бабеша-Эрнста*).
- *Характерен* общий вид препарата, особенно если мазок взят с большим количеством микробов. Микробы лежат большими скоплениями и напоминают пакет булавок. В окрашенных мазках могут быть расположены попарно, под острым или прямым углом друг к другу, напоминая римскую цифру V.
- Дифтерийные микробы неподвижны, спор не образуют, жгутиков не имеют, грамположительные, хорошо окрашиваются основными анилиновыми красками, причем особенно интенсивно окрашиваются волютиновые зерна. При окрашивании *по Нейссеру* характерной особенностью является то, что зерна волютина окрашиваются в сине-черный цвет, контрастирующий со светло-коричневой окраской всей микробной клетки.

Культуральные свойства

- Дифтерийные микробы хорошо развиваются при свободном доступе кислорода; растут при температуре от 15 до 40 °С. Могут расти на обычных питательных средах, но лучше и с характерной морфологией развиваются на средах, содержащих кровь или сыворотку любого вида животного. На этих средах дифтерийные бактерии вырастают уже через 8—10—12 ч.
- Наиболее распространены:
 - свернутая лошадиная сыворотка (среда РУ);
 - среда Леффлера (3 части сыворотки + 1 часть мясного бульона с 1% виноградного сахара, 1% пептона);
 - теллуритовые среды.
- Очень характерен общий вид роста дифтерийных микробов в пробирках на скошенных свернутых сывороточных средах: колонии не сливаются вместе, вся культура представляется усеянной зернышками, напоминая шагреневую кожу. Колонии круглые, гладкие или слегка зернистые, непрозрачные с полупрозрачной периферией, края ровные, но впоследствии становятся извилистыми или даже зазубренными. На теллуритовых средах дифтерийные палочки образуют темно-серые или черные колонии вследствие **восстановления теллурита до металлического теллура**. Восстановление происходит внутри бактериальной клетки.

Типы дифтерийных микробов

На основании культуральных свойств различают 3 типа дифтерийных микробов:

- *gravis*(тяжелый);
- *mitis*(средний);
- *intermedius*(промежуточный).

Типы дифтерийных микробов

- Тип *гравис* дает зернистый осадок и пленку на бульоне, на плотных средах образует плоские матовые колонии неправильных очертаний, напоминающие маргаритку.
- Тип *митис* равномерно мутит бульон и образует выпуклые полупрозрачные колонии.
- Третий тип обладает некоторыми свойствами первого и второго типов. Часто встречаются также атипичные формы.
- У дифтерийных бактерий, как и у других микроорганизмов, наблюдаются:
 - гладкие (S) формы колоний;
 - шероховатые (R) формы;
 - промежуточные (RS).
- У высокотоксичных штаммов обычно преобладают R-формы.

Биохимические свойства

- Дифтерийная палочка вырабатывает кислоту без газообразования в средах с глюкозой, мальтозой и галактозой, но не с лактозой, сахарозой и маннитом.
- Сбраживание крахмала и гликогена считают характерной особенностью типа гравис.
- Многие штаммы дают гемолиз на кровяном агаре и лизируют эритроциты, добавленные к культуре.

Устойчивость

- **Дифтерийные бактерии чувствительны к дезинфицирующим средствам: 10%-ная перекись водорода убивает их в течение 3 мин; 1%-ная сулема, 5%-ная карболовая кислота, 50— 60%-ный алкоголь — в течение 1 мин.**
- **Низкие температуры (до -190 °С) не убивают дифтерийные бактерии длительное время.**
- **Высокая температура приводит к быстрой их гибели.**
- **Под действием прямого солнечного света палочки дифтерии гибнут в течение нескольких дней.**
- **В пыли они сохраняют жизнеспособность до 5 недель, в воде и молоке до 6—20 дней. В трупах сохраняются до 2 недель.**

Серотипы

- Дифтерийные бактерии гетерогенны по антигенной структуре, но все вырабатывают *одинаковый токсин*.
- **Серологическая гетерогенность** наблюдается в пределах одного типа. Между 3 типами — *гравис, митис и интермедиус* — серологическая связь отсутствует.
- Токсин, продуцируемый всеми 3 типами дифтерийных микробов, тождествен и хорошо нейтрализуется обычными противодифтерийными сыворотками.
- Среди дифтерийных микробов имеются токсичные и нетоксичные штаммы. Дифтерию вызывают только токсичные штаммы, обладающие способностью продуцировать *экзотоксины*.
- **Степень токсичности дифтерийных микробов** может быть различной. *Единицей измерения* силы токсина служит минимальная смертельная доза — наименьшее количество токсина, убивающее морскую свинку массой 250 г в течение 3—4 суток.
- Кроме экзотоксина дифтерийная палочка продуцирует *дермонекротоксин, гемолизин, нейраминидазу и гиалуронидазу*.

Патогенез

- Заболевания вызываются только токсигенными штаммами, способными продуцировать экзотоксин.
- **Инкубационный период** обычно продолжается 2-5 дней, диапазон колебаний — 1-10 дней.
- **Источник инфекции** — человек с разными клиническими проявлениями инфекционного процесса. Наибольшую роль в распространении дифтерии внутри и вне ЛПУ играют носители токсигенных штаммов. Период заразительности совпадает с началом клинических проявлений. Реконвалесцентное носительство может продолжаться 2-6 недель, известны случаи выделения коринебактерий до 3 месяцев. Здоровое носительство в большинстве случаев (60%) кратковременно (до 10 дней), изредка длится до 2 и более месяцев. Возбудитель определяется в отделяемом носоглотки.
- **Механизм передачи воздушно-капельный**. Не исключена контактно-бытовая передача возбудителя, особенно при редкой локализации патологического процесса: на раневой, ожоговой поверхности, слизистой оболочке половых органов (вульва, вагина), глаза, уха.

Патогенез

- **Дифтерийные микробы, проникнув в организм человека, остаются в месте входных ворот на слизистых оболочках ротоглотки, носа, верхних дыхательных путей, иногда глаз, половых органов, раневой и ожоговой поверхности кожи.**
- **Клинические проявления дифтерии обусловлены воздействием на организм экзотоксина, состоящего из четырех фракций: некротоксин, истинный токсин, гиалуронидаза и гемолизирующий фактор.**

Патогенез

- Под воздействием некротоксина в месте входных ворот инфекции возникают некроз поверхностного эпителия, повышенная проницаемость сосудов, замедляется кровоток, сосуды становятся ломкими.
- Происходит пропотевание жидкой части крови в окружающие ткани.
- Фибриноген, содержащийся в плазме, при контакте с тромбопластином некротизированного эпителия переходит в фибрин, который выпадает в виде фибринозной пленки.
- Так как слизистая оболочка ротоглотки покрыта многослойным плоским эпителием, развивается **дифтеритическое воспаление**, при котором фибринозный выпот, пронизывая всю слизистую оболочку, **плотно спаян с подлежащей тканью**.
- На слизистых оболочках с однослойным эпителием (гортань, трахея, бронхи) развивается **крупозное воспаление**, при котором пленка **легко отделяется**.
- Действием некротоксина обусловлено снижение болевой чувствительности, отек тканей в месте входных ворот, в области регионарных лимфатических желез и подкожножировой клетчатки шеи.

Патогенез

- Вторая фракция дифтерийного токсина - истинный токсин, по своей структуре сходный с цитохромом В- ферментом, участвующим в процессе клеточного дыхания. Проникая в клетки тканей, токсин замещает цитохром В, что ведет к блокированию клеточного дыхания, гибели клеток, нарушению функции различных органов: центральной и периферической нервной системы, сердечно-сосудистой системы, почек, надпочечников.
- Третья фракция токсина - гиалуронидаза, разрушает гиалуроновую кислоту, являющуюся остовом соединительной ткани. При этом повышается проницаемость сосудов и других тканей, что усугубляет развитие отека.
- Четвертая фракция токсина является гемолизирующим фактором. Таким образом, клинические проявления дифтерии обусловлены местным и общим действием токсина.
- Дифтерийные микробы остаются в месте входных ворот. В редких случаях регистрируется кратковременная бактериемия, но ее роль в патогенезе заболевания невелика. В ответ на воздействие дифтерийного токсина вырабатываются антитоксины. Эта иммунная реакция в комплексе с другими защитными механизмами обеспечивает уменьшение интоксикации и клинических проявлений заболевания, приводит к развитию антитоксического иммунитета.

Клиника

- В зависимости от локализации процесса различают дифтерию ротоглотки, дыхательных путей, редкой локализации (глаз, половых органов, кожи) и комбинированную.
- Наиболее часто встречается дифтерия ротоглотки (85-90%).

Классификация клинических форм

Локализация патологического процесса	Распространенность патологического процесса	Тяжесть инфекции и особенности ее течения	Осложнения
Дифтерия ротоглотки	Локализованная: островчатая, пленчатая. Распространенная.	Субтоксическая, токсическая (I, II, III степени), гипертоксическая, токсико- геморрагическая.	Инфекционно-токсический шок, геморрагический синдром, сердечно- сосудистая недостаточность, миокардит (ранний, поздний), полинейропатия (ранняя, поздняя), инфекционно-токсическое поражение почек.
Дифтерия дыхательных путей	Локализованная: носа, гортани. Распространенная: А (гортани, трахеи), Б (трахеи, бронхов, бронхиол).	Катаральный, стенотический, асфиксический периоды.	Дыхательная недостаточность, стеноз I, II, III степени, асфиксия.
Комбинированная дифтерия ротоглотки и дыхательных путей, и др.	Локализованная, распространенная.	Токсическая I, II, III степени, гипертоксическая, токсикогеморрагическая.	См. дифтерию ротоглотки и дыхательных путей.
Дифтерия глаза и другой редкой локализации (половых органов, кожи, раны).	Конъюнктивит век, глазного яблока, панофтальмит. Локализованная, распространенная	Крупозная, дифтеритическая.	-

Иммунитет

- После заболевания длительное время сохраняется антимикробный и антитоксический иммунитет.
- Грудные дети дифтерией не болеют, так как у них имеется пассивный иммунитет от матери.
- Наиболее восприимчивы дети в возрасте от 1 года до 5—6 лет.
- Для выявления антитоксического противодифтерийного иммунитета используется внутрикожная проба Шика. У детей, восприимчивых к дифтерии, на предплечье в месте введения малых доз дифтерийного токсина через 48 ч появляются покраснение и инфильтрат, что свидетельствует об отсутствии антитоксинов в крови.

Микробиологическая диагностика дифтерии

1. Лабораторная диагностика дифтерии производится с целью:

- постановки диагноза острого заболевания;
- установления бациллоносительства;
- определения вирулентности (токсичности) дифтерийных палочек.

Материал для исследования (чаще всего мазок из носа) берут стерильным ватным тампоном. Не следует брать материал после приема пищи или полоскания дезинфицирующими растворами. Посев необходимо произвести сразу после взятия материала (не позже 5—6 ч) в пробирку со свернутой кровяной сывороткой и сывороткой *Леффлера*, а *затем* поставить в термостат при 37 °С.

Микробиологическая диагностика дифтерии

2. Бактериоскопическое и бактериологическое исследования

Через 18—20 ч роста в положительных случаях на поверхности среды видны многочисленные бисерные, близко расположенные друг к другу колонии. Предварительный диагноз можно дать уже через 8 ч. Материал с тампона можно засеять на чашку с кровяным теллуровым агаром или на среду Клауберга II.

- Колонии, выросшие на чашках через 24—48 ч, изучают микроскопически и отсевают на *чашки Петри* со специальной средой для определения токсичности. На следующие сутки учитывают результаты посева культур на средах для определения токсичности и биохимических свойств и микроскопируют чистую культуру со свернутой сыворотки.
- Если выделена разлагающая углеводы нетоксичная культура, необходимо поставить дополнительные пробы на цистиназу и реакцию агглютинации с политиповой дифтерийной сывороткой. Реакцию агглютинации ставят на стекле с помощью монотипových дифтерийных сывороток.

Микробиологическая диагностика дифтерии

3. Для идентификации чистой культуры дифтерийной палочки и дифференцировки ее от псевдодифтерийной палочки Гормана исследуют биохимические свойства выделенной чистой культуры.
- Исследование проводится на средах Уиссаили на водно-сывороточной среде (20%-ной лошадиной сыворотке).
 - **Дифтерийная палочка** расщепляет только глюкозу — имеет только столбик, **дифтероиды** ферментируют глюкозу и сахарозу — синий цвет будет у всей среды, **ложнодифтерийная палочка** не расщепляет сахаров, но разлагает мочевины — вся среда приобретает оранжевый цвет.
 - На основании реакций ферментации углеводов можно также установить 2 основных биологических типа дифтерийной палочки: **гравис** и **митис**.

Лечение

- Дифтерийные бактерии чувствительны к пенициллину, эритромицину, тетрациклину и другим антибиотикам.

Профилактика

- **Противоэпидемические мероприятия.** Выявленные больные и лица с подозрением на дифтерию изолируются, медицинские работники, общавшиеся с ними, подлежат бактериологическому обследованию, за ними устанавливается 10-дневное медицинское наблюдение. Учитывая сниженный уровень антитоксического иммунитета у части медицинских работников, особенно если срок после последней ревакцинации превышает 5 лет или отсутствуют сведения о прививочном анамнезе сотрудника, оптимально действенным мероприятием является **иммунизация АДС-М (АД-М)** по эпидемиологическим показаниям тех, кто подвергся риску заражения при контакте с больным дифтерией. В отделении, где выявлен случай дифтерии, усиливаются противоэпидемический и дезинфекционный режимы.

Профилактика

- Изоляция больного в стационар проводится до полного клинического и бактериологического выздоровления.
- После этого в течение 7 дней за очагом ведется медицинское наблюдение. Контактные с больными дифтерией или носителями токсигенных штаммов коринебактерий разобщаются с детьми и декретированными лицами до получения окончательного ответа бактериологического исследования. В очаге дифтерии после госпитализации больного проводится заключительная дезинфекция.
- В целях создания надежного коллективного иммунитета, стабилизации существующей в настоящее время эпидемической ситуации, предотвращения новых эпидемий дифтерии необходимо широкое проведение вакцинопрофилактики с использованием дифтерийного анатоксина. Согласно действующему в нашей стране прививочному календарю специфическая профилактика дифтерии проводится: в 3 мес (трехкратно с интервалом в 30-40 дней) и однократно в 1,5-годовалом возрасте и в 6, 11 и 16 лет.

Профилактика

- Вакцинация признана основным профилактическим мероприятием и предусмотрена Расширенной программой иммунизации ВОЗ и Национальным календарем профилактических прививок Российской Федерации. Для медицинского персонала важно соблюдать режим проведения ревакцинации. Для выпускников медицинских училищ и колледжей необходима ревакцинация в 16-17 лет АДС-М, взрослые медицинские работники ревакцинируются однократно каждые 10 лет АДС-М (АД-М).

Возбудитель коклюша



- **Возбудитель коклюша — *Bordetella pertussis***— был выделен из мокроты ребенка, больного коклюшем, в 1906 г. Борде и Жангу.
- В 1937 г. был описан микроб от больного коклюшем, сходный, но не идентичный с бактерией *пертуссис* (коклюша), названный бактерией *парапертуссис* (паракоклюша).
- **Морфология:** короткая грамотрицательная овоидной формы палочка размером 0,2 на 0,4—1,2 мкм. При окраске толуидиновым синим обнаруживаются биполярно расположенные метакроматические гранулы. У палочки коклюша можно обнаружить также капсулу.



← *B. parapertussis*

Культуральные свойства



- *Колонии палочки коклюша* гладкие, блестящие, прозрачные, куполообразные с жемчужным или ртутным оттенком, размером около 1 мм в диаметре.
- Колонки бактерии паракоклюша по внешнему виду очень похожи на бактерии коклюша, но они более крупные по размерам и появляются раньше, чем коклюшные колонии.
- *Бактерии коклюша*, так же как атипичные и паракоклюшные, растут на обычных питательных средах. На полусинтетической среде — казеиново-угольном агаре (КУА) — колонии коклюшных микробов мелкие (0,5—1 мм), выпуклые, четко контурированные, блестящие, гладкие, серовато-кремового цвета и вязкой консистенции.
- *Колонии* коклюшных и паракоклюшных микробов на среде **Борде-Жангу** окружены характерной зоной гемолиза (зона не резко отграничена и распространяется диффузно в окружающую среду). Коклюшные микробы не редуцируют сахара, не образуют индола, не редуцируют нитратов и не используют цитратов. Коклюшный микроб - факультативный аэроб. Оптимальные условия культивирования 35-36 °С.
- Свежевыделенные культуры коклюшных микробов, S-форма, или 1 фаза по *Лесли и Гарднеру*, растут только на питательной среде, состоящей из картофельно-глицеринового агара с добавлением крови (*среда Борде-Жангу*).

физическим и химическим



факторам

- Коклюшный микроб — облигатный паразит, вне организма он сохраняется очень недолго.
- В сухой мокроте — несколько часов; при температуре 50—55 °С погибает в течение 30 мин.
- Очень чувствителен к УФ-свету и химическим антисептикам.

Антигенное строение



- Коклюшный микроб по антигенным свойствам однотипен, но отличается сложностью антигенного строения — у него удастся выявить до 12 антигенных компонентов.
- Коклюшный микроб имеет собственные видовые антигены и общие с паракоклюшными. Общие антигены имеются как у обоих видов (О-антиген), так и отдельно с каждым из них.
- Из коклюшных микробов были выделены фракции, обладающие иммунологическими свойствами: агглютиноген, гемагглютинин и протективный антиген.

Патогенность, вирулентность, образование токсина



- В естественных условиях к коклюшу восприимчив только человек.
- Наиболее близкая по симптоматике к коклюшу картина заболевания была экспериментально воспроизведена у обезьян.
- Куриные эмбрионы, крысы и морские свинки при введении культуры погибают от интоксикации.
- Внутрикожное введение культуры коклюшных микробов экспериментальным животным вызывают образование некроза в результате освобождения при разрушении микробных клеток ее токсичных компонентов.

Патогенез



- **Входными воротами инфекции** является слизистая оболочка респираторного тракта. Коклюшные микробы прикрепляются к клеткам мерцательного эпителия, где они размножаются на поверхности слизистой оболочки, не проникая в кровоток.
- На месте внедрения возбудителя развивается воспалительный процесс, угнетается деятельность ресничного аппарата клеток эпителия и увеличивается секреция слизи. В дальнейшем происходит изъязвление эпителия дыхательных путей и очаговый некроз.

Патогенез



- *Патологический процесс* наиболее выражен в бронхах и бронхиолах, менее выраженные изменения развиваются в трахее, гортани и носоглотке. Слизисто-гнойные пробочки закупоривают просвет мелких бронхов, развивается очаговый ателектаз, эмфизема. Наблюдается перибронхиальная инфильтрация. В генезе судорожных приступов имеет значение сенсibilизация организма к токсинам коклюшной палочки.
- Постоянное раздражение рецепторов дыхательных путей обуславливает кашель и приводит к формированию в дыхательном центре очага возбуждения типа доминанты. Вследствие этого **типичные приступы спазматического кашля** могут быть вызваны и неспецифическими раздражителями. Из доминантного очага возбуждение может иррадиировать и на другие отделы нервной системы, например на сосудодвигательный (повышение АД, спазм сосудов). Иррадиацией возбуждения объясняется также появление судорожных сокращений мышц лица и туловища, рвоты и других симптомов коклюша.

Симптомы и течение



- **Инкубационный период** продолжается от 2 до 14 дней (чаще 5—7 дней).
 - **Катаральный период** характеризуется общим недомоганием, небольшим кашлем, насморком, субфебрильной температурой. Постепенно кашель усиливается, дети становятся раздражительными, капризными. В конце 2-й недели болезни начинается период спазматического кашля. Приступы судорожного кашля проявляются серией кашлевых толчков, затем следует глубокий свистящий вдох (реприз), сменяющийся рядом коротких судорожных толчков. Число таких циклов во время приступа колеблется от 2 до 15. Приступ заканчивается выделением вязкой стекловидной мокроты, иногда в конце приступа отмечается рвота. У детей раннего возраста репризы не выражены. В зависимости от тяжести заболевания число приступов может варьировать от 5 до 50 в сутки.
 - **Период судорожного кашля** длится 3—4 нед, затем приступы становятся реже и наконец исчезают, хотя «обычный» кашель продолжается еще в течение 2—3 нед (период разрешения).
 - У взрослых заболевание протекает без приступов судорожного кашля, проявляется длительным бронхитом с упорным кашлем. Температура тела остается нормальной. Общее самочувствие удовлетворительное. Стертые формы коклюша могут наблюдаться у детей, которым проведены прививки.
- Осложнения:** Наиболее частым осложнением является пневмония, обусловленная коклюшной палочкой или вторичной бактериальной инфекцией. У детей до 3 лет около 90% летальных исходов обусловлено пневмонией. Может наступить обострение туберкулеза. Из других осложнений наблюдается острый ларингит со стенозом гортани (ложный круп), бронхиолиты, ателектазы, энцефалопатия, остановка дыхания, пупочная, паховая грыжа, разрыв диафрагмы, выпадение прямой кишки. У взрослых осложнения бывают редко.

Иммунитет



- При коклюше имеет место **гуморальный иммунный ответ**, сопровождающийся формированием стойкого гуморального иммунитета.

Микробиологическая диагностика коклюша



- 1. Забор и посев материала***
- 2. Бактериологическое
исследование***
- 3. Серологические исследования***

Микробиологическая диагностика коклюша



1.Лабораторная диагностика коклюша. Материалом для исследования служит слизь, выделяемая при кашле. В выделениях дыхательного тракта больного коклюшем бактерии могут быть обнаружены посевом во всех стадиях болезни, но особенно в ранний период заболевания. Материал для посева может быть получен 2 способами:

- методом "кашлевых пластинок";
- путем забора материала носоглоточным тампоном.

Кашлевые пластинки — в момент появления кашля открытую чашку с питательной средой подносят на расстоянии 8—10 см ко рту ребенка и держат ее так в течение нескольких секунд (6—8 кашлевых толчков). Желательно посев делать на 2 чашки. После забора материала чашку закрывают как можно быстрее, для того чтобы избежать загрязнения. Чашку помещают в термостат.

Посев носоглоточным тампоном. Стерильный тампон вводят в ноздрю ребенка до задней стенки глотки, где снимают слизь.

Взятие материала тампоном через рот со шпателем более сложная и неприятная для ребенка процедура и не имеет преимуществ перед носоглоточным тампоном. Извлеченным из ноздри тампоном немедленно делают посев на чашки с питательной средой. Посев должен быть сделан в течение 1-2 ч после забора материала.

Микробиологическая диагностика коклюша



2. Бактериологическое исследование. Наилучший рост палочка коклюша дает на питательных средах с добавлением большого количества крови.

Таковы среды:

- картофельно-глицериновый агар с 20—30% крови *по Борде-Жангу*;
- молочно-кровяной агар;
- среда на казеиновом гидролизате с 25% крови.

Можно пользоваться средой на казеиновом гидролизате и с меньшим количеством крови. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры к питательным средам прибавляют растворы пенициллина, к которому палочка коклюша нечувствительна. Чашки с посевом оставляют в термостате при 37 °С на 2—3 суток. Через 48—72 ч просматривают чашки. При наличии большого количества характерных колоний из них делают мазки, которые окрашивают *по Граму*, ставят на предметном стекле реакцию агглютинации с антительной сывороткой, разведенной 1 : 10. Если на чашке появляются единичные колонии, делают пересев в пробирку со скошенной средой. Используют те же питательные среды. Через 24—48 ч роста в термостате исследуют мазки, окрашенные *по Граму*, и ставят реакцию агглютинации на предметном стекле. Идентификацию микробов коклюша проводят на основании морфологических, биохимических, серологических, токсических и патогенных свойств выделенных культур.

Микробиологическая диагностика коклюша



3. Серологические исследования: серологическая реакция (агглютинация, связывание комплемента и опсанофагоцитарная реакция) в некоторой мере помогает подтвердить диагноз при атипичном течении коклюша (появляются антитела со 2—3-й недели заболевания в низких титрах), а также установить его ретроспективно.

В условиях массовой иммунизации против коклюша значение этих серологических показателей весьма ограничено.

Для получения агглютинирующей сыворотки применяют иммунизацию кроликов.

микробиологическая дифференциальная диагностика коклюша и паракоклюша:



- **Дифференциальными признаками** бактерии пертуссис и бактерии парапертуссис служат данные серологических исследований (реакция агглютинации и биохимическая характеристика). Основные отличительные признаки, позволяющие дифференцировать коклюшные и паракоклюшные культуры: паракоклюшные растут при первых посевах на простом агаре (без крови), на казеиновоугольном агаре и мясопептонном агаре (особенно с добавлением тирозина), а также на кусочке картофеля, образуя коричневый пигмент, расщепляют мочевину, утилизируют цитраты.
Коклюшный микроб на простом агаре не растет, пигмента не образует и мочевину не расщепляет.
- Также ставят *пробу на уреазу* — в пробирку с исследуемой культурой добавляют мочевину и фенолфталеин, пробирку встряхивают и ставят в термостат. Реакция (изменение цвета) может наступить через 15— 20 мин. Окончательный результат учитывается через 2 ч. Положительная реакция — окрашивание жидкости в малиновый цвет — свойственна культурам *паракоклюшных бактерий*.

Лечение



- Возбудитель коклюша чувствителен ко многим антибиотикам, однако предпочтительнее назначать эритромицин или азитромицин.
- Эффективны также левомицетин и тетрациклин, однако левомицетин более токсичен, а тетрациклин противопоказан детям до 8 лет.
- Рекомендуют препараты антигистаминного действия (димедрол, пипольфен), ингаляции аэрозолей с протеолитическими ферментами (химопсин, химотрипсин), которые облегчают отхождение вязкой мокроты.
- При тяжелых формах коклюша некоторые авторы отмечали эффективность кортикостероидных препаратов.

Профилактика



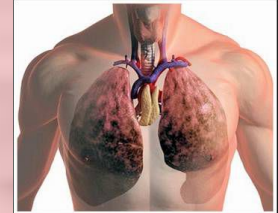
- Детям в возрасте до 1 года и непривитым против коклюша в возрасте до 2 лет, имевшим контакт с больным коклюшем, вводят донорский нормальный иммуноглобулин по 3 мл 2 дня подряд.
- Из дошкольных учреждений изолируют всех больных коклюшем. После перенесенного коклюша дети допускаются в коллективы не ранее 25-го дня с начала болезни. Детей в возрасте до 7 лет, контактировавших с больными коклюшем (детей до 1 года, контактировавших с больными паракоклюшем), удаляют из коллектива на 14 дней со дня контакта. На такой же срок устанавливают карантин для детей в дошкольном учреждении.

Профилактика



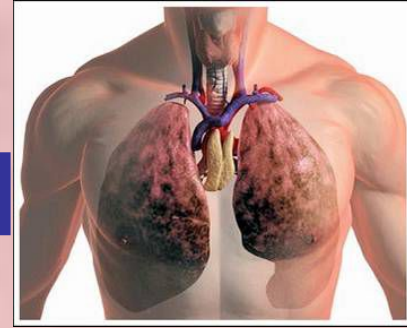
- С целью специфической профилактики коклюша проводят активную иммунизацию вакциной **АКДС**. Следует иметь в виду, что паракоклюшем могут заболеть и привитые АКДС, и перенесшие коклюш.
- Коклюшный компонент вакцины представлен **инактивированными коклюшными микробами**. Вакцинацию проводят с 3-месячного возраста.
- Госпитализируют детей первых месяцев жизни и с тяжёлыми формами заболевания, а также по социальным показаниям.

Микобактерии



- **Возбудитель туберкулеза — микобактерия, относится к семейству *Micobacteriaceae*. Основным признаком, по которому микобактерии были отнесены к тому или другому виду, является различная патогенность их для разных видов животных и для человека. Среди патогенных микобактерий различают четыре вида: *M. tuberculosis* - возбудитель туберкулёза человека, *M. Avium* - возбудитель туберкулёза птиц, *M. Bovis* - возбудитель туберкулёза рогатого скота, *M. microti* (OVS, или Oxford vole strain) - возбудитель туберкулёза полевых мышей. Последние вид некоторые исследователи (Нахимсон Л.И., 1946; Каграманов А.И, 1955, и др.) рассматривают как вариант бычьего, адаптировавшийся в организме полевой мыши.**
- **Между отдельными видами микобактерий наблюдается переходные формы.**
- **Микобактерии различных видов имеют ряд морфологических, культурных, биохимических и биологических особенностей, которые позволяют дифференцировать их друг от друга. Существует мнение, что микобактерии бычьего вида имеют морфологические отличия от человеческих - меньшую длину тела микроба, меньшую его фрагментацию.**
- **Предположен ряд питательных сред, на которых дифференциация микобактерий проводится в зависимости от изменения окраски среды, характера роста. Однако морфологические и культурные различия не позволяют с полной достоверностью дифференцировать эти виды. Более чёткая их дифференциация возможна с помощью биологических методов, основанных на неодинаковой чувствительности лабораторных животных к человеческим и бычьим микобактериям туберкулёза.**

Микобактерии



- Важным тестом для идентификации микобактерий человеческого и бычьего видов является ниациновый тест (проба Конно), основанный на свойстве человеческих микобактерий продуцировать значительно больше ниацина, чем микобактерия бычьего вида.
- Помимо патогенных для человека, в природе широко распространены сапрофитные микобактерии, или так называемые паратуберкулезные бациллы. Они содержатся в водопроводной и сточной воде, в молоке и масле, на овощах и ягодах. Их обнаруживают на коже, в промывных водах желудка и глотки, они выделяются со слюной, мокротой, калом и мочой. Морфологически они напоминают патогенные микобактерии, характеризуются кислотоустойчивостью. По этой причине возможны ошибки при распознавании природы микобактерии, а следовательно, и характера патологического процесса. Паратуберкулезные бациллы, в отличие от патогенных, не вызывают типичных изменений в организме людей и животных. Принадлежность их к тому или другому виду устанавливается главным образом на основании их культуральных свойств и результатов прививки морским свинкам.

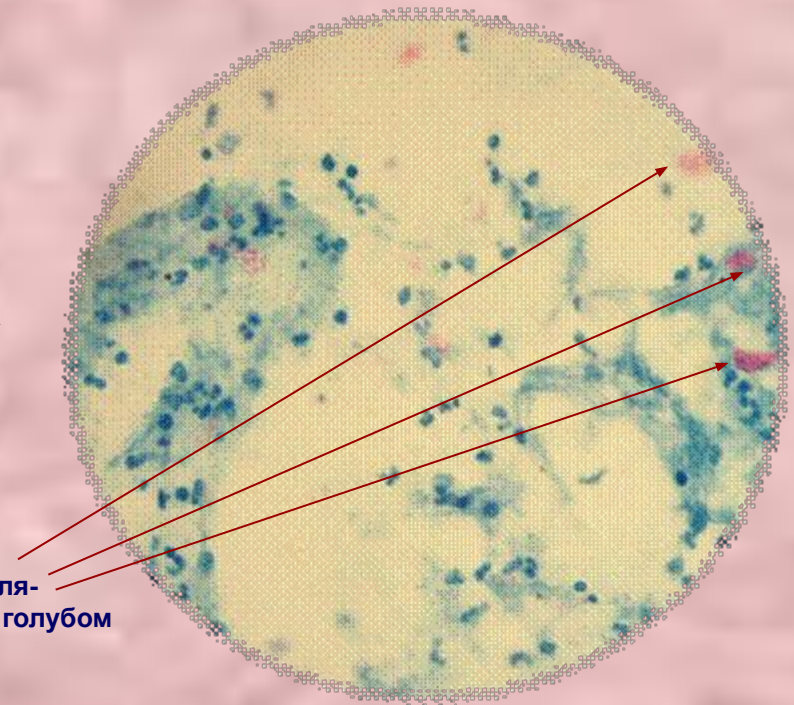
Возбудитель туберкулеза



- **Микобактерии туберкулеза (МБТ)** были открыты *Р. Кохом* в мокроте больного туберкулезом.
- **Человеческий тип** туберкулезного возбудителя: палочки прямые или изогнутые длиной 1,5—4 м толщиной 0,3—0,5 м. Величина палочек зависит от возраста микроба и условий его обитания. В тканях живого организма палочки могут удлиняться, что, по-видимому, зависит от замедленного их деления. В казеозных массах палочки располагаются неровными кучами по 2—3 и более. В различных условиях пребывания в организме палочки могут образовать нитевидные, ветвящиеся формы с булавовидными образованиями на концах нитей. *Полиморфизм* является характерным свойством микобактерии.

Гинкториальные свойства

- Кислотоупорные МБТ обладают свойством медленно воспринимать анилиновые красители. Поэтому их окраска производится с применением протравы (карболовая кислота). *При подогревании наиболее распространенные способы окраски следующие:*
 - **Циля-Нильсена;**
 - Идиля-Хузе;
 - Муха;
 - Муха-Вейса;
 - Шиенглера.
- При этих окрасках в палочках отмечаются более яркие красные или фиолетовые гранулы.



Окрашиваются по методике Циля-Нильсена (красные палочки на голубом фоне).

Возбудитель туберкулеза

- Исследование в электронном микроскопе позволило установить *сложное строение их стенки из 3 слоев*, а также наличие в цитоплазме *ядра и гранул*.
- В препаратах из культур, особенно на жидких средах, вирулентные МБТ располагаются в виде жгутов. В препаратах почти всегда имеются разной степени окраски округлые тельца (зерна). Это вегетативные формы, которые получаются в результате размножения микроба поперечным делением, и формы развития из зерен.
- Некоторыми учеными было доказано существование некислотоустойчивых культур МБТ, которые названы *L-формами*. Эти формы способны расти на обычных средах и превращаться в бактерии. L-формы представляются в *виде телец с венцолью*, внутри которого 1 или 2 тельца. Эта *пребациллярная некислотоустойчивая стадия является нормальной стадией* микроба. *Фильтрующиеся формы, зерна, кокки и палочки* представляют формы закономерно протекающих стадий развития возбудителя. В частности, полагают, что зернистые формы, среди которых могут быть мелкие фильтрующие элементы, представляют *неклеточную стадию*, а кокковые формы и палочки, вырастающие из кокков, — *клеточную стадию* развития микроба.

Культуральные свойства

- *Микобактерии туберкулеза* вне организма растут в чистых культурах на плотных и жидких средах, с хорошим доступом воздуха; однако они могут развиваться и в относительно анаэробных условиях, но очень медленно, скудно.
- На жидких специальных питательных средах МБТ растут на поверхности среды в виде морщинистой пленки. МБТ растут на питательных средах, содержащих минеральные соли, аминокислоты, углеводы, яичный белок и желток и особенно *глицерин!* Могут расти (более скудно) в средах из минеральных солей, особенно аммония. Оптимальная температура для роста 37—38 °С. На плотных питательных средах МБТ растут в виде светло-кремового морщинистого или чешуйчатого суховатого налета, запах культур ароматический, очень характерный, очень редко микобактерии человеческого типа могут давать гладкие колонии. Культуры МБТ не всегда бывают типичны (особенно при антибактериальной терапии больных); они могут быть несколько влажными, содержать отдельные гладкие или пигментированные колонии. Туберкулезную природу выделенных нетипичных культур устанавливают "*мышинной пробой*" (1 или 0,1 мг вводят в вену хвоста 2 белым мышам, смерть наступает при явлениях *генерализованного туберкулеза* через 2—4 мес) наряду с пробой патогенности на морских свинках.

Токсинообразование

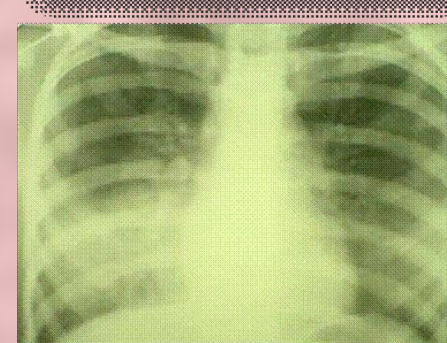
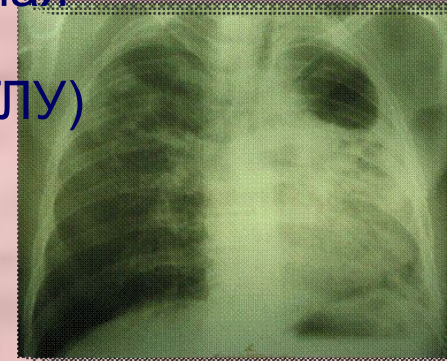
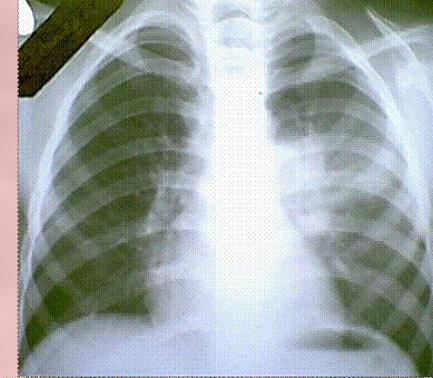
- МБТ экзотоксина не выделяют. Однако фильтраты их культур на жидких питательных средах токсичны для животных, больных туберкулезом, что связано с выделением в среду эндотоксина.
- МБТ выделяют также летучие токсины. Особенностью этих токсических веществ является их специфическое действие только на инфицированных и больных туберкулезом людей и животных.

Устойчивость

- *Благодаря особому химическому строению микобактерии туберкулеза обладают значительной устойчивостью к физическим и химическим агентам.* Во влажной мокроте микобактерии выдерживают нагревание в течение 30 мин при 75 °С, при кипячении погибают через 5 мин. В выделенной мокроте МБТ погибают при 100 °С через 45 мин. В мокроте, выделенной и сохраняемой в темноте при комнатной температуре, жизнеспособность палочек сохраняется не менее 4 мес, в рассеянном свете они погибают через 1—1,5 мес. В суховоздушной камере при увлажнении с температурой 80 °С МБТ выживают в течение 2 ч. В уличной пыли МБТ сохраняются до 10 дней, на страницах книг до 3 мес. В воде палочки выживают не менее 150 дней после заражения. МБТ выдерживают процессы гниения и могут несколько месяцев сохраняться в погребенных трупах. Препараты хлора и йода хорошо действуют на микобактерии.
- Лекарственно устойчивые или резистентные микобактерии появляются у больных при антибактериальной химиотерапии, а иногда возникают и спонтанно (первичная устойчивость).
При испытании на лекарственную устойчивость следует пользоваться плотными питательными средами *Гельберга, Петраньяни, Герольда* и жидкими — синтетической средой *Сотона* (с плазмой), *кровяной средой или плазмой*.



Патогенез



- Этапы развития туберкулезного процесса
- **I период** – первичный туберкулез
- 1. Доаллергическая стадия (латентный микробизм)
- 2. Аллергическая стадия (вираж, возможна туберкулезная интоксикация)
- 3. Морфологическая (анатомическая) стадия (ПТК, ТВГЛУ)
- **II период** – вторичный туберкулез (клинические формы вторичного туберкулеза).



Патогенез

- **Источник заражения** - больные туберкулезом люди и животные (крупный рогатый скот, собаки, кошки и др.), выделяющие микобактерии туберкулеза во внешнюю среду. Заражение может произойти при употреблении воды из недостаточно обеззараженных водоемов, в которые попадают сточные воды из противотуберкулезного диспансера или из неблагополучных по туберкулезу животноводческих ферм.
- **Пути и механизмы передачи инфекции:** аэрогенный (воздушно-капельный и пылевой) и алиментарный (через продукты и посуду больного человека или через молочные продукты от больной коровы).
- **Ворота инфекции:** носоглотка, миндалины, слизистая бронхов, реже поврежденная кожа, глаза, плацента. При формировании заболевания туберкулезом МБТ находятся в оптимальных для их жизнедеятельности условиях, они активно размножаются вегетативным путем, что приводит к быстрому накоплению популяции. Микобактерии тропны к легочной ткани, первичный аффект развивается в легких.

Патогенез

- Типичной для туберкулеза формой воспалительной реакции является туберкулезный бугорок, или гранулема. В настоящее время туберкулезная гранулема рассматривается во взаимосвязи с реакцией антиген-антитело и является выражением иммуноморфологической реакции организма.
- Типичный туберкулезный бугорок имеет округлую форму и небольшую величину (с зерно пшеницы). Продуктивный туберкулезный бугорок состоит из эпителиоидных клеток и гигантских клеток Пирогова–Лангханса с лимфоидными элементами по периферии. Иногда в центре бугорка формируется казеоз. При заживлении происходит фиброзирование бугорка, частичное рассасывание казеоза и трансформация клеточных элементов. На его месте остается небольшой рубчик паукообразной формы.
- В зависимости от реактивности организма бугорки могут быть экссудативными, состоящими преимущественно из мононуклеарных и лимфоидных клеток; экссудативно-продуктивными; продуктивными или некротическими, встречающимися при резко сниженных защитных реакциях организма. Кроме специфических, при туберкулезе отмечаются различные неспецифические реакции. При этом в сердечно-сосудистой системе, в паренхиматозных органах выявляются гистиоцитарные и лимфоцитарные инфильтраты диффузного или узелкового характера. Эти реакции называют параспецифическими, они характерны для первичного туберкулеза и клинически проявляются «масками» различных заболеваний в зависимости от их преобладания в том или ином органе.

Схема патогенеза туберкулеза



Патогенез

- **Туберкулез кишечника** обычно возникает лимфогематогенным путем, чаще процесс локализуется в илеоцекальной области, характеризуется бугорковыми высыпаниями на слизистой оболочке кишки. В дальнейшем формируется инфильтративно-язвенный процесс, который клинически проявляется снижением аппетита, похуданием, ноющими болями в животе вокруг пупка и в правой подвздошной области.
- **Туберкулез брюшины** чаще имеет гематогенный генез, реже является проявлением туберкулеза других органов брюшной полости и таза. В начальном периоде образуются бугорковые высыпания на брюшине. При появлении экссудата нарастают явления интоксикации, усиливаются тошнота, рвота, боли в животе, диспепсия, похудание.
- В период обострения процесса состояние больных тяжелое, резко выражена интоксикация, отмечаются стойкое повышение температуры, рвота, приступообразные боли в животе, поносы, чередующиеся с запорами.
- **Туберкулез брыжеечных лимфоузлов** (мезаденит) наблюдается чаще у детей и подростков, возникает лимфогематогенным путем из первичных очагов. При инфильтративной форме поражения отмечается воспалительная инфильтрация мезентериальных лимфоузлов без выраженных симптомов интоксикации. Казеозно-некротическая форма заболевания проявляется болевым синдромом различного характера. Боли могут быть тупыми или острыми, приступообразными, усиливающимися при физических нагрузках, нервных переживаниях. Характерны диспептические нарушения в виде снижения аппетита, периодических тошноты, рвоты и неустойчивого стула, что приводит к значительному исхуданию больных.

Иммунитет и аллергия

- Главным эффектором являются Т-лимфоциты, которые активируют макрофаги. Антитела лишены протективности. Активированные макрофаги выделяют кожно-реактивный фактор, который обуславливает воспалительную реакцию, повышает сосудистую проницаемость. С этим связано появление ПЧЗТ и туберкулиновой реакции.
- Иммунитет формируется через 4-8 недель после проникновения МБТ.
- **Свойства иммунитета:**
 - клеточно-гуморальный
 - Приобретенный
 - Нестерильный
 - относительный

Микробиологическая диагностика туберкулеза

- микробиологические посевы (мокрота, гной, отделяемое свищей, моча, плевральная и спинномозговая жидкость и др.)
- микроскопия окрашенных по Цилю-Нильсену мазков (например мокроты, под обычным или специальным люминесцентным микроскопом)
- аллергическая проба с туберкулином: внутрикожная проба Манту (результат оценивается через 72 ч) или скарификационная проба Пирке (учет через 48-72 ч)
- определение титра антител к туберкулезу. По результатам этого анализа можно определить наличие иммунитета к туберкулезу
- ПЦР (полимеразная цепная реакция). На исследование сдают мокроту или другое отделяемое.

Микробиологическая диагностика туберкулеза

1. Лабораторная диагностика туберкулеза используется для установления специфической этиологии заболевания, подозрительного на туберкулез. Производят микробиологическое исследование материала от больных:

- мокроты;
- спинномозговой жидкости;
- плевральной жидкости;
- гноя;
- мочи, кала;
- пунктатов лимфатических узлов.

Исследование на возбудителя туберкулеза производят непосредственно в доставленном материале **бактериоскопическими**, а кроме того, **бактериологическими и биологическими методами**. При необходимости исследовать свежую мокроту делают мазки препарата на предметных стеклах, высушивают на воздухе, фиксируют на пламени горелки. Затем препарат окрашивают карболовым фуксином, промывают водой и обесцвечивают 15—25%-ным раствором серной кислоты, промывают и докрашивают водным раствором метиленового спирта. После подсыхания препарат подвергают *иммерсионной микроскопии*, просматривают 100 полей зрения (практически весь препарат). *Туберкулезные микобактерии* визуализируются как яркокрасные, тонкие, изящные, в одиночку или группами, большей частью лежащие вне клеток палочки. В настоящее время имеет распространение *метод флотации с последующей микроскопией*. *Промывные воды желудка* бактериоскопически, дальнейшее исследование проводят так же, как и при исследовании мокроты. *Мазок из гортани или зева* окрашивают по *Цилю-Нильсену*. Мочу центрифугируют и готовят мазок из осадка мочи. *Спинномозговую жидкость*, взятую *асептично*, отстаивают сутки на холоде, после чего образуется тонкая *фибринозная пленка (паутинка)*, в которой содержатся туберкулезные микобактерии. Делают мазок на предметном стекле, высушивают на воздухе, фиксируют, окрашивают по *Цилю-Нильсену*. Если пленочка не образовалась, то исследованию подвергают отцентрифугированный осадок.

Микробиологическая диагностика туберкулеза

- Для обнаружения туберкулезных микобактерии применяется *люминесцентная микроскопия*, которая имеет ряд преимуществ перед прямой бактериоскопией в окрашенных препаратах. При люминесцентной микроскопии туберкулезные микобактерии светятся обычно золотисто-оранжевым светом на черном фоне (картина "звездного неба"); кислотоупорные сапрофиты — зеленоватым с апельсиновым оттенком. При исследовании спинномозговой жидкости методом люминесцентной микроскопии *положительные результаты можно получить в 12,5 раза чаще*, чем при просмотре препаратов, окрашенных по *Цилю-Нильсону*.

Микробиологическая диагностика туберкулеза

2. Бактериологическое исследование. Методика бактериологического обнаружения туберкулезных микобактерии основана на их способности противостоять воздействию кислот и щелочей.

Туберкулезная бактерия после такой обработки остается вполне жизнеспособной, что позволяет еще до посева материала избавиться от находящихся в нем посторонних микробов. Микобактерии туберкулеза характеризуются некоторыми основными свойствами, используемыми для их дифференцирования. Они неподвижны, растут только в животном организме или на питательных средах специального состава (обычно с глицерином и яичным желтком); на обычных питательных (МПА) средах не растут. Оптимальная температура, при которой растут туберкулезные бактерии, равна 37 °С, хотя возможен рост в пределах от 30 до 42 °С. Для размножения микробов требуется длительное время: на искусственных питательных средах рост появляется только через 10-30 дней. Колонии микобактерий туберкулеза имеют своеобразный вид, отличающийся шероховатостью (в виде плоских чешуек с возвышенным центром или розеток с углублением в центре), или же они могут быть гладкими блестящими, похожими на капли. На жидких питательных средах образуется толстая морщинистая пленка. Обычно для посева наследуемого материала пользуются средами Любенац или Петракины. Посев выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 3 мес, проверяя наличие роста каждую неделю. Наиболее часто рост наблюдается в сроки от 3 до 6 недель. Штаммы, выделенные от больных, леченных химиопрепаратами, вырастают в гораздо более поздние сроки (через 50—70—80 дней). В настоящее время предложены и испытаны ускоренные методы выращивания культур туберкулезных микробов на препаратах - мазках (по Прайсу) и на кровяной среде. Серологические исследования имеют относительное значение.

Микробиологическая диагностика туберкулеза

3. Биологическая проба является по праву *наиболее рациональным диагностическим приемом*. Материал может быть введен под кожу или в полость живота морским свинкам. При наличии в материале вирулентных туберкулезных микобактерий обычно на 10-12-й день в месте его введения под кожей образуется уплотнение, переходящее в дальнейшем в незаживающую язву. Свинки погибают от генерализованного туберкулеза через 2—4 мес. *Ускоренная биологическая проба*: через регионарный лимфатический узел морской свинки вводят несколько капель исследуемого материала. На 8—10-й день увеличенный лимфатический узел вырезают и исследуют бактериоскопически в препаратах-отпечатках на присутствие туберкулезных микобактерий.

Лечение

- **Основной метод лечения туберкулеза – химиотерапия**
Химиотерапия туберкулеза предусматривает использование группы препаратов, воздействующих на возбудителей туберкулеза (туберкулезные палочки нечувствительны по отношению к обычным антибиотикам). В настоящее время в лечении туберкулеза используются следующие препараты. Изониазид (H), Рифампицин (R), Пиразинамид (Z), Этамбутол (E), Стрептомицин (S). Рядом с названием препарата в скобках дано его сокращенное символическое обозначение, используемое во всем мире при составлении схем лечения туберкулеза.
Лечение туберкулеза должно быть комбинированным и тщательно спланированным. Неправильное лечение может привести к формированию лекарственно-устойчивой формы туберкулеза, прогноз которой гораздо менее благоприятнее прогноза туберкулеза, поддающегося лечению традиционными препаратами.
- Для лечения лекарственно-устойчивых форм туберкулеза используются альтернативные препараты: амикацин (A), канамицин (K), капреомицин (Cap), циклосерин (Cs), этионамид (Et), протионамид (Pt), фторхинолоны (Fq), парааминосалициловая кислота – ПАСК (PAS) и рифабутин (Rfb).

Профилактика

- В целях профилактики необходимо проведение следующих мероприятий:
- проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий адекватных сложившейся крайне неблагополучной эпидемиологической ситуации по туберкулезу.
- раннее выявление больных и выделение средств на лекарственное обеспечение. Это мероприятие сможет также уменьшить заболеваемость людей, вступающих в контакт в очагах с больными.
- проведение обязательных предварительных и периодических осмотров при поступлении на работу в животноводческие хозяйства, неблагополучных по заболеванию туберкулезом крупного рогатого скота.
- увеличение выделяемой изолированной жилой площади больным, страдающим активным туберкулезом и проживающим в многонаселенных квартирах и общежитиях.
- своевременное проведение (до 30 дней жизни) первичной вакцинации новорожденным детям.

Список литературы

1. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Санкт-Петербург. 2008.
2. Медицинская микробиология. / под редакцией Покровского В.И. Медицина. 2008.
3. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. / под ред. акад. РАМН А.А. Воробьева. МИА. Москва, 2004.

**Спасибо за
внимание!**