

# Возбудители туберкулеза

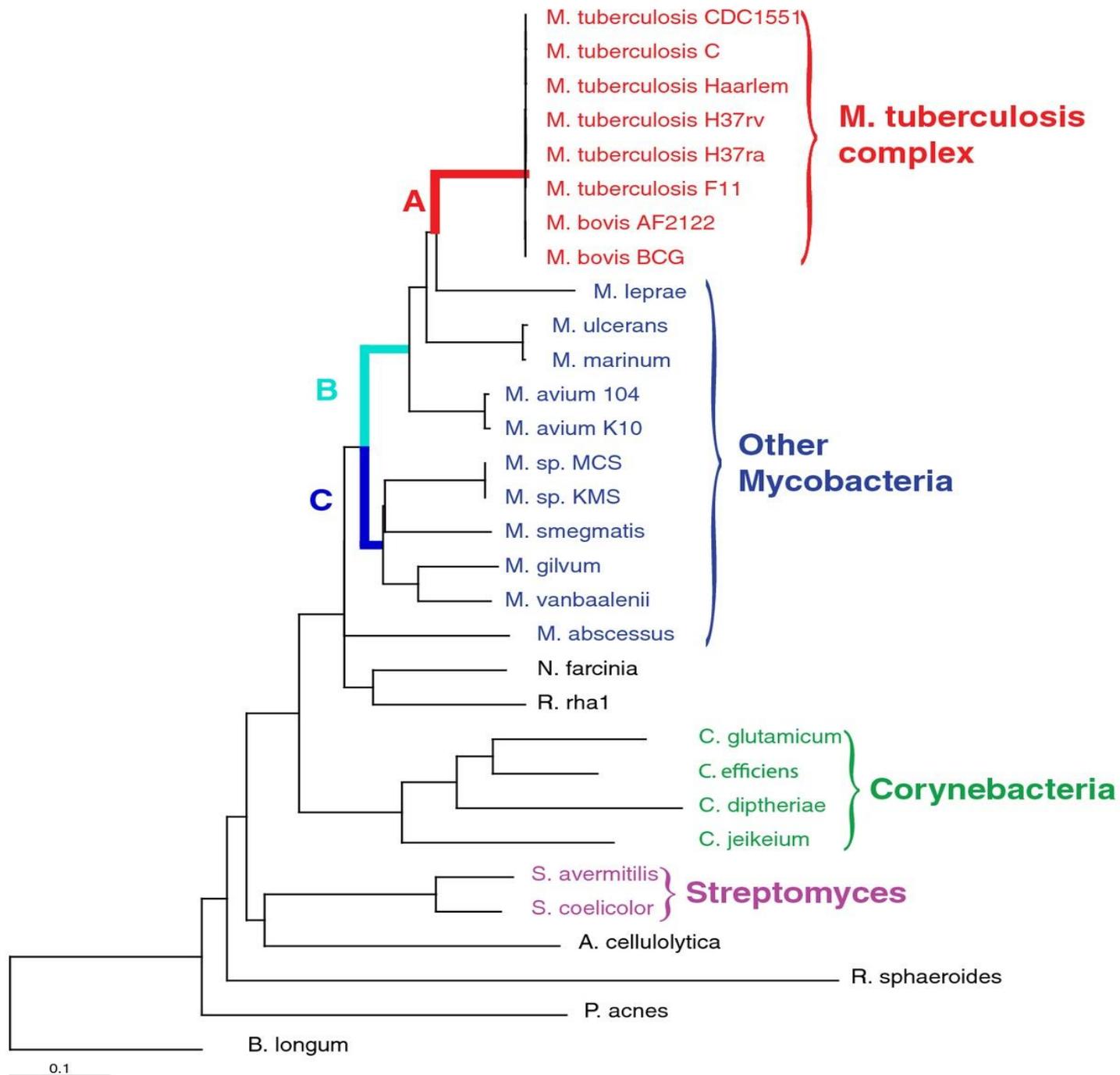
Семейство *Mycobacteriaceae*

Род *Mycobacterium*

Вызывающие туберкулёз виды микобактерий объединены в комплекс *M.tuberculosis*,

включающий *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*

- ❑ Бактерии, входящие в *MTBC* (*Mycobacterium tuberculosis complex*), имеют высокую степень родства (порядка 99,9 %) и идентичны по последовательностям 16S рРНК.
- ❑ У человека чаще всего возбудителем является *Mycobacterium tuberculosis*. Второй по частоте является *Mycobacterium bovis*(1-4%).

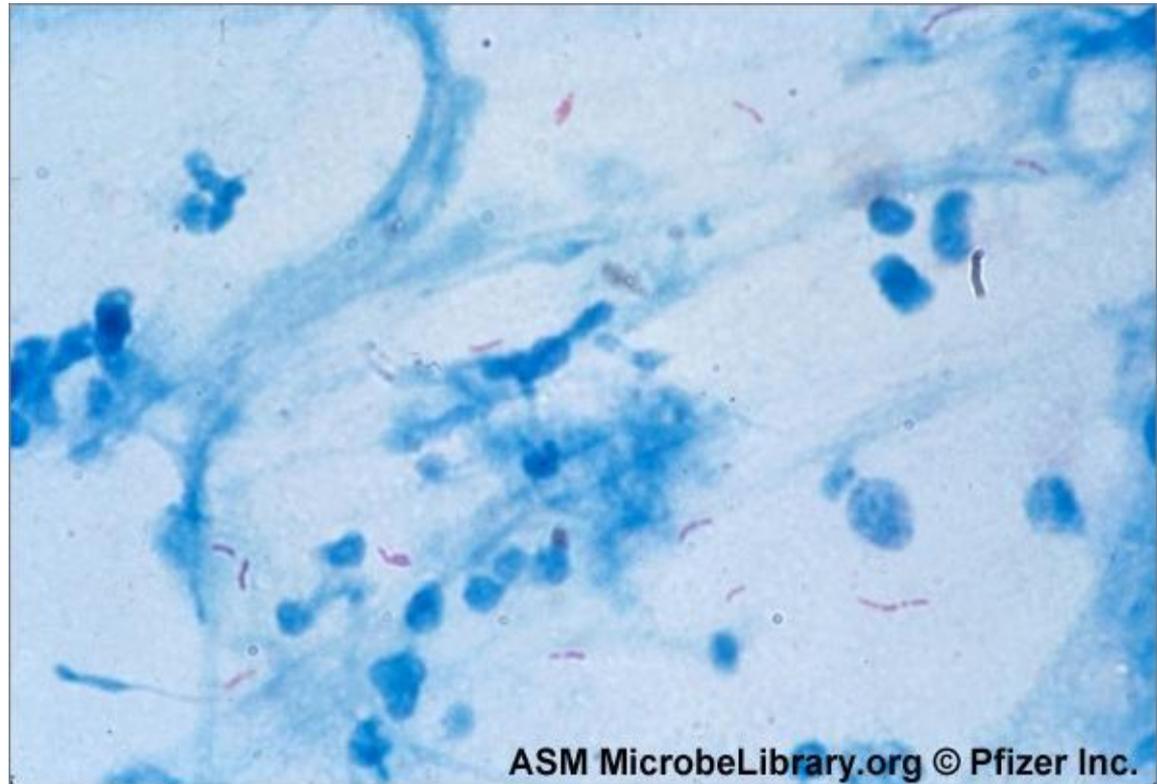


Domain	Домен	<i>Bacteria</i>
Phylum	Тип	<i>Actinobacteria</i>
Order	Порядок	<i>Actinomycetales</i>
Family	Семейство	<i>Mycobacteriaceae</i>
Genus	Род	<i>Mycobacterium</i>
Species	Вид	<i>M.tuberculosis</i>

Патогенными для человека микобактериями являются также виды и подвиды, входящие в так называемый комплекс *M. avium*

# Морфология

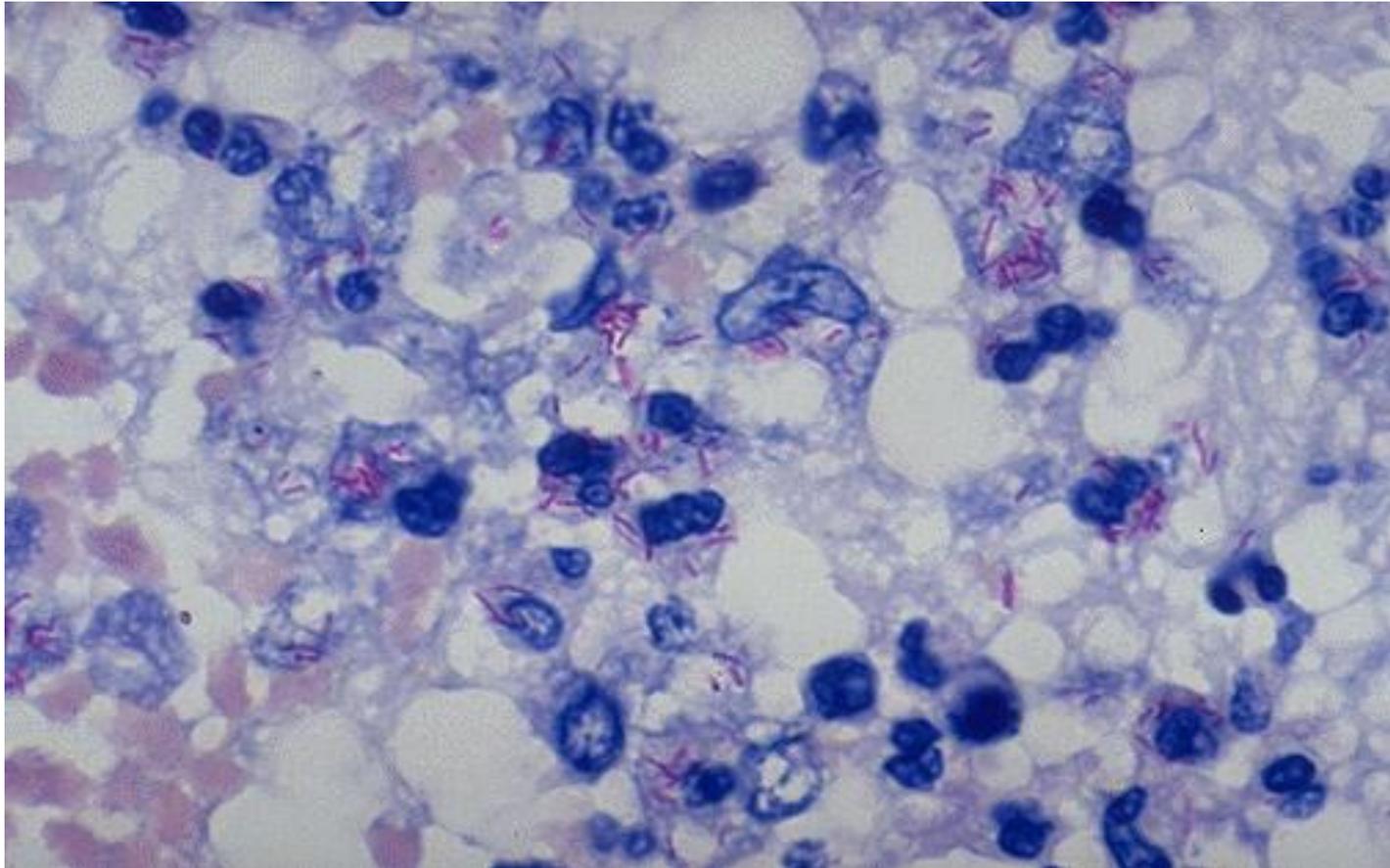
- Грамположительные тонкие прямые или слегка изогнутые палочки;
- Клеточная стенка содержит большое количество восков и липидов (миколовую кислоту), что обуславливает гидрофобность, устойчивость к кислотам, щелочам, спиртам;
- Окрашивается по Цилю-Нильсену;
- Неподвижны, спор и капсул не образует;
- Возможен переход в фильтрующиеся и L-формы



*Mycobacterium tuberculosis* (красные палочки) в мокроте. Окраска по Цилю-Нильсену.

- Под действием неблагоприятных факторов (антибиотики, лизоцим и др.) возбудитель туберкулеза может терять способность синтезировать пептидогликановый остов клеточной стенки, в результате чего образуются L-формы (трансформированные микобактерии) с низкой патогенностью и позволяющие выживать в неблагоприятных условиях.
- **Трансформированные** микобактерии в ряде случаев способны **реверсировать** в классические формы возбудителя, вызывая рецидив болезни.

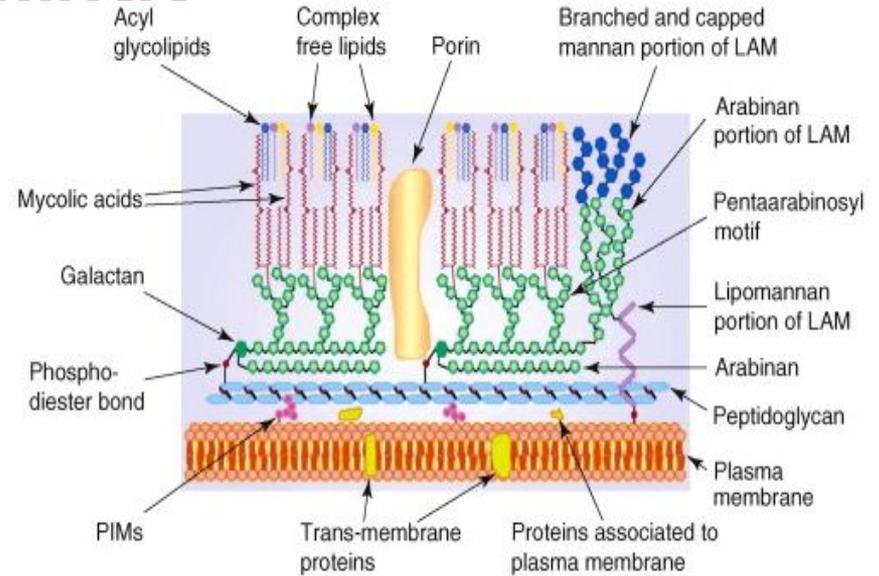
***Mycobacterium tuberculosis* внутри клеток  
легкого. Окраска по Цилю-Нильсену**



# Клеточная стенка *Mycobacterium*

## *tuberculosis*

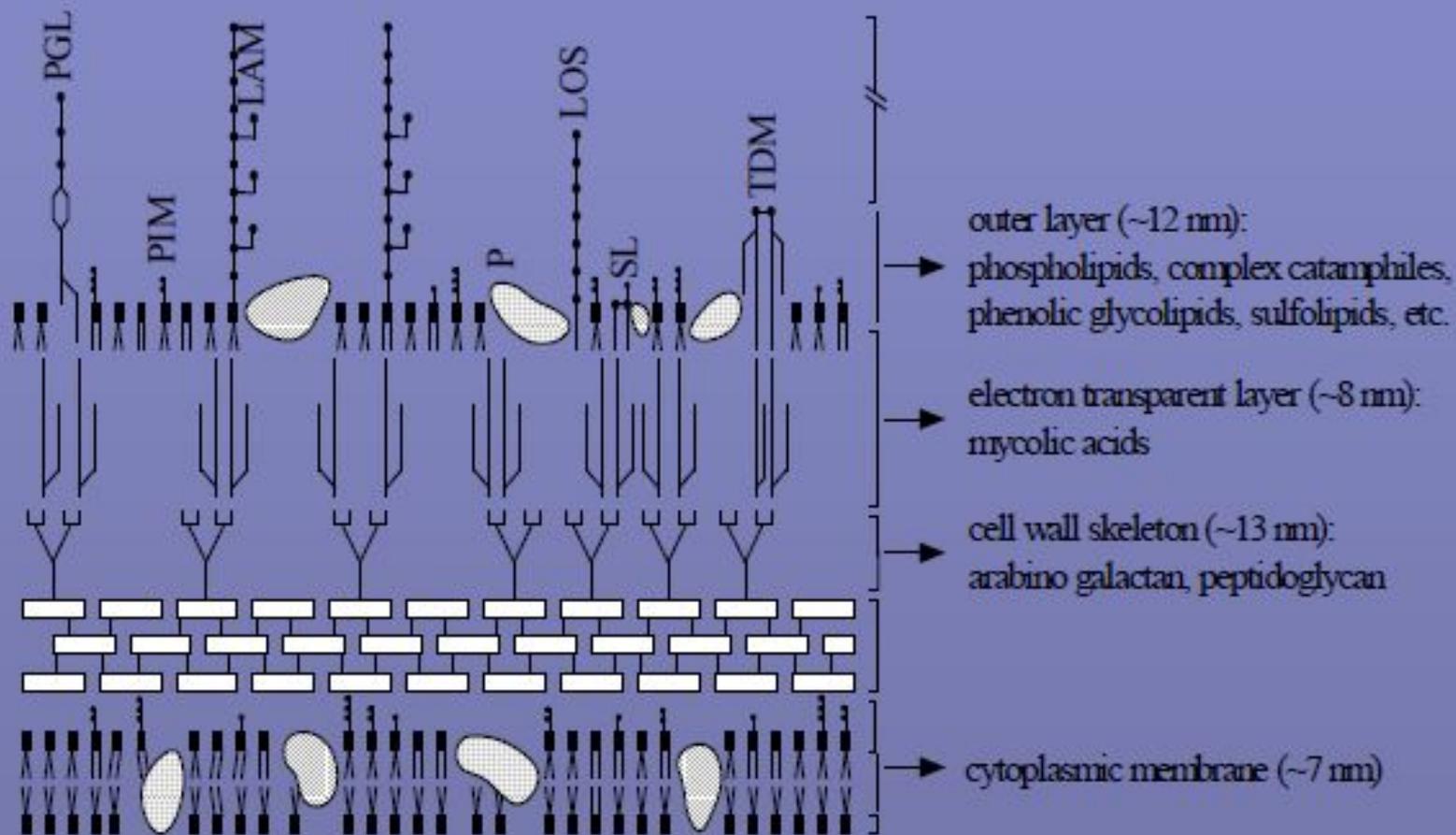
- ❑ В клеточной стенке преобладают липиды
- ❑ Большинство липидов представлено липидами и их производными (димиколат трегаллозы – корд-фактор-TDM см.след.слайд)
- ❑ Миколовые кислоты присутствуют также в виде свободных сульфатидов
- ❑ Снаружи клеточная стенка окутана слоем гликолипидов – микозиды, который структурно и функционально напоминают ЛПС



TRENDS in Microbiology

- ❑ Липоарабиноманнан (ЛАМ) – закорен на ЦПМ, пронизывает клеточную стенку и выходит на ее поверхность – это гетерогенная смесь липополисахаридов
- ❑ Особенности терминального компонента ЛАМ (прежде всего его маннозные радикалы) влияют на взаимоотношения с макрофагами
- ❑ Белки: особую известность получил комплекс «антиген 85» – состоит из трех родственных белков, сильных индукторов иммунного ответа

## Схема клеточной стенки микобактерий



PGL- фенольные гликолипиды, PIM-фосфатидинозитманнозид, LAM-липоарабиноманнан, P-белки-порины, LOS-липоолигосахарид, SL-сульфолипиды, TDM-димиколат трегалозы.

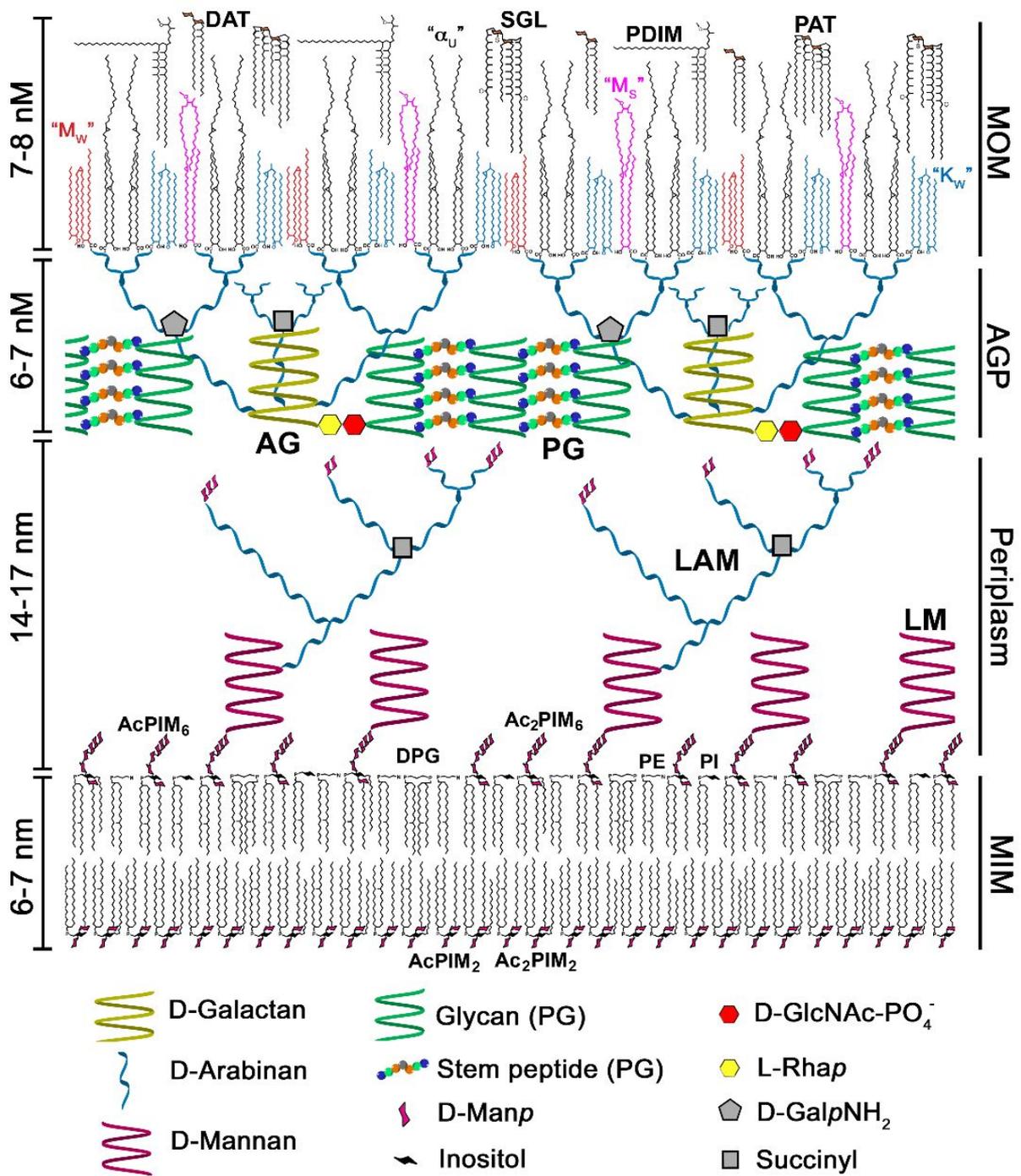
## Характеристика липидов микобактерий

Общее содержание липидов в клетках микобактерии – 40% (от сухой биомассы)

В клеточных стенках микобактерий содержится - 25-32% липидов

- Нейтральные липиды – моно-, ди-, триглицериды, воска, эфиры вторичных спиртов с высшими жирными кислотами, менахиноны
- Фосфолипиды - 4,5-6% -КЛ, ФЭ, ФК, ФИ, ФИ -маннозиты
- Миколовые кислоты – кислоты, содержащие от 60 до 90 атомов углерода
- Гликолипиды –гликозилдиглицериды и ацилированные сахара (микозиды, кордфактор – димиколат трегалозы), сульфолипиды
- Пептидолипиды и пептидогликолипиды - «воск» D, микозиды

- MOM (mycobacterial outer membrane) – наружная мембрана
- MIM (mycobacterial inner membrane) – внутренняя мембрана
- AGP- арабиногалактан-пептидогликан
- “ $\alpha_u$ ”, “ $K_w$ ”, “ $M_w$ ”, “ $W$ ” – миколовые кислоты и их производные
- LM – липоманнан
- LAM – липоарабиноманн
- PIMs – фосфатидилинозитол маннозид
- Белки семейства PE (пролин-глутамат) и PPI (пролин-пролин-глутамат)



# Культуральные свойства

- ❑ Аэробы;
- ❑ Факультативные внутриклеточные паразиты
- ❑ Растут на средах, содержащих яйца, глицерин, картофель, аспарагин, витамины, соли;
- ❑ Чаще всего применяют яичную среду Левенштейна-Йенсена и синтетическую среду Сотона;
- ❑ растут медленно (рост обнаруживается через 2-3 недели и позднее);
- ❑ Колонии сухие, морщинистые, сероватые;
- ❑ Обладают биохимической активностью, позволяющей дифференцировать виды
- ❑ Основной тест – ниациновая проба (накопление в жидкой среде никотиновой кислоты)

**Среда Левенштейна-Йенсена и рост микобактерий.**

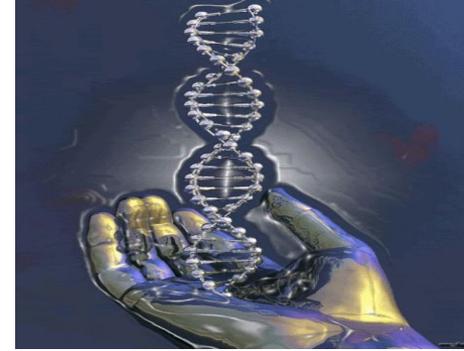




# Резистентность

- ❑ МБТ обладают устойчивостью к физическим и химическим агентам; с липидной фракцией внешней оболочки МБТ связывают устойчивость возбудителей туберкулеза к кислотам, щелочам и спиртам.
- ❑ сохраняют жизнеспособность при очень низких температурах, а повышение до 80°C могут выдерживать в течение 5 мин.
- ❑ Во внешней среде микобактерия туберкулеза достаточно устойчива.
- ❑ Вне живого организма они остаются жизнеспособными в течение многих месяцев, в особенности в темных, сырых помещениях. В воде она может сохраняться до 150 дней, в масле на холоду до 10 мес., в сырах до 260 дней.
- ❑ Без солнечного света они остаются жизнеспособными во внешней среде несколько месяцев, очень долго сохраняющиеся в воде - до 5 месяцев, на страницах книг - на протяжении 3-х месяцев, в уличной пыли - до 10 дней.
- ❑ Высохшие микобактерии вызывают туберкулез у морских свинок через 1 – 1,5 года, лиофилизированные и замороженные жизнеспособны до 30 лет.
- ❑ *Mycobacterium tuberculosis* **чувствительна** к УФО (погибает через 5-10 минут) и прямым солнечным лучам. под действием солнечных лучей МБТ погибают при 1,5 часу, а при ультрафиолетовом облучении - через 2-3 минуты. Кипячение жидкой мокроты убивает МБТ за 5 минут. МБТ стойкие к ионизирующей радиации, но быстро разрушаются под действием ультразвуковых волн.
- ❑ Обычные дезинфицирующие вещества слабо действуют на МБТ. Для дезинфекции используют активированные растворы хлорамина и хлорной извести, вызывающие гибель возбудителей туберкулеза в течение 3-5 ч.

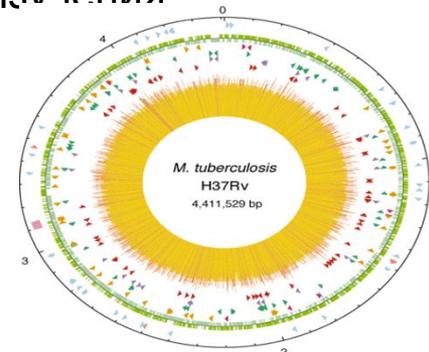
# Геном микобактерий



- ❑ Представители рода микобактерий имеют по сравнению с другими прокариотами большие геномы -  $3,1-4,5 \times 10^9$  Да. Однако геномы патогенных видов меньше, чем у других микобактерий (у *M. tuberculosis* -  $2,5 \times 10^9$  Да). У классического возбудителя туберкулёза человека, *M. tuberculosis*, больше генов, чем у *M. africanum* и *M. bovis*, которые утратили часть генетического материала в ходе эволюции.
- ❑ Геном МТБС имеет гомологию свыше 90%
- ❑ Геном МБТ содержит более 4 млн нуклеотидов и 4 000 генов, кодирующих белки, а также 60, кодирующих функциональные компоненты РНК: уникальный рибосомальный РНК-оперон, 16S РНК, участвующий в деградации белков с нетипичной матричной РНК; 45 транспортных РНК (тРНК); более 90 липопротеинов.
- ❑ Более 20% генома занимают гены метаболизма жирных кислот клеточной стенки, в том числе миколовых кислот. Вариабельность этих участков генома обеспечивает различия антигенов и способность ингибировать иммунный ответ.
- ❑ В геноме микобактерии туберкулёза широко представлены гены, контролирующие факторы вирулентности.
- ❑ Сравнительные исследования геномов выявили интересный полиморфизм среди видов комплекса *M.tuberculosis*, включая БЦЖ.

# Геном микобактерий

- ❑ Особенность генома *M.tuberculosis* complex - большое число повторяющихся последовательностей ДНК.
- ❑ У *M.tuberculosis* в отличие от большинства бактериальных патогенов в геноме имеется только по одной копии генов рибосомальной 16S РНК и 23S РНК.
- ❑ В геноме H37Rv найдены два профага - phiRv1 и phiRv2. Они, вероятно, ассоциированы с факторами патогенности, поскольку именно эти участки генома отличаются от аналогичных участков авирулентных штаммов *M. tuberculosis* H37Ra и *M. bovis* BCG,
- ❑ С помощью баз данных установлены функции примерно 70% генов . Естественно, что внимание исследователей сейчас сосредоточено на оставшихся 30% генов микобактерий, не имеющих аналогов в других бактериях.
- ❑ Мобильные элементы генома могут служить полезными генетическими инструментами для изучения микобактерий и, в частности, для изучения механизмов вирулентности патогенных штаммов.



# Антигены микобактерий

У *M.tuberculosis* свыше 70 антигенов:

- ✓ Компоненты клеточной стенки ( арабиногалактаны, липоарабиноманнан, липиды, гликолипиды)
- ✓ Растворимые цитоплазматические белковые антигены
  - Белковые антигены обозначались согласно молекулярной массе: 38 кД, 30 кД и т.д., затем по номерам: Rv0491, Rv1223 и т.д.
  - Белок ESAT-6 (early secretory antigen target 6 kDa)
  - Белок CFP-10 (culture filtrate protein 10 kDa). Ген, соответствующий этому белку, расположен непосредственно перед геном белка ESAT-6 и составляет с ним единую оперонную структуру
- ✓ Мультигенное семейство белков PE/PPE (пролин-глутамин, пролин-пролин-глутамин) может быть представлено как на поверхности клеточной стенки, так и в цитоплазме; вариабельность этих белков обеспечивает антигенные различия возбудителя и угнетение иммунного ответа

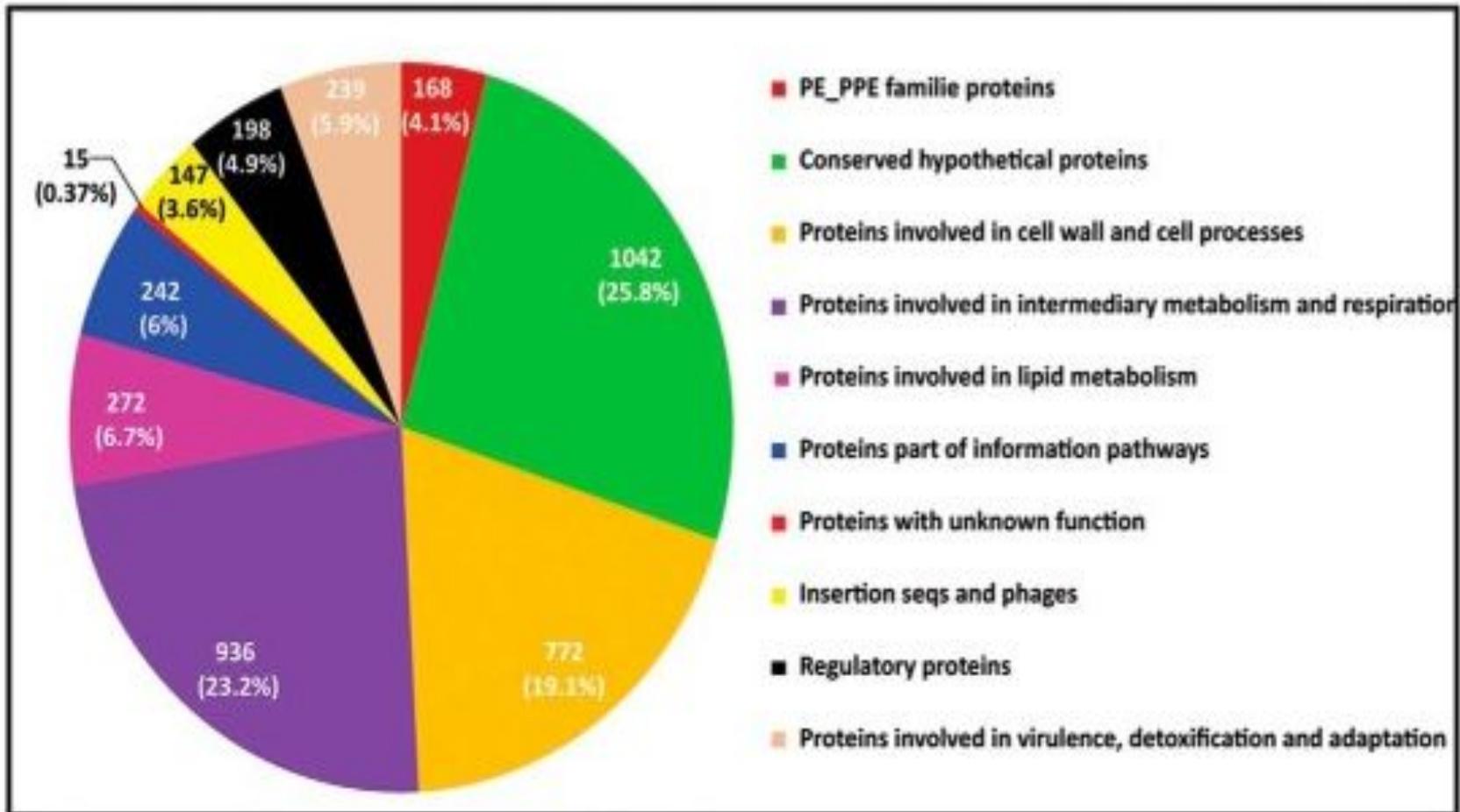
# Антигены микобактерий

- ❑ **Антиген 85** – комплекс из 3 белков – один из важнейших иммуногенов *M. tuberculosis*. Именно эти белки индуцируют пролиферацию Th1, продукцию  $\gamma$ -ИФН и активируют цитотоксические Т-лимфоциты ; это наиболее мощный протективный антиген
- ❑ **Антиген Rv2031c** - цитозольный регуляторный антиген , один из факторов вирулентности микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, поскольку обеспечивает выживание в организме хозяина, особенно в латентный период инфекции
- ❑ **Rv3597c (Lsr2)** – глобальный регулятор транскрипции, обеспечивает репрессию большого количества генов вирулентности

В течение туберкулезного процесса происходит изменение спектра антигенов, синтезируемых микобактериями в зависимости от стадии и степени распространенности заболевания. Следовательно, и антитела к разным антигенам микобактерий имеют разную динамику.

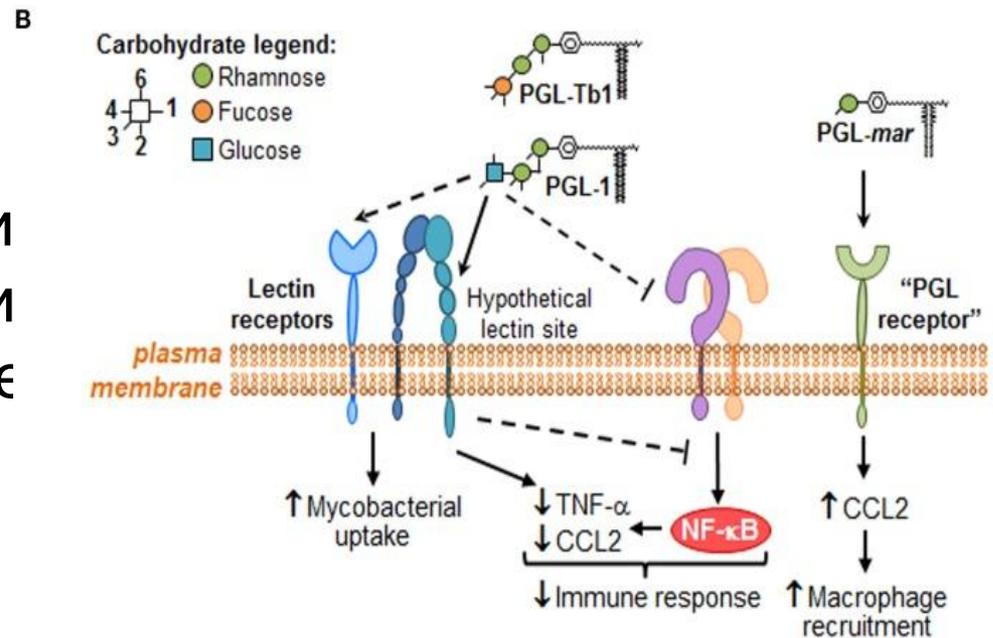
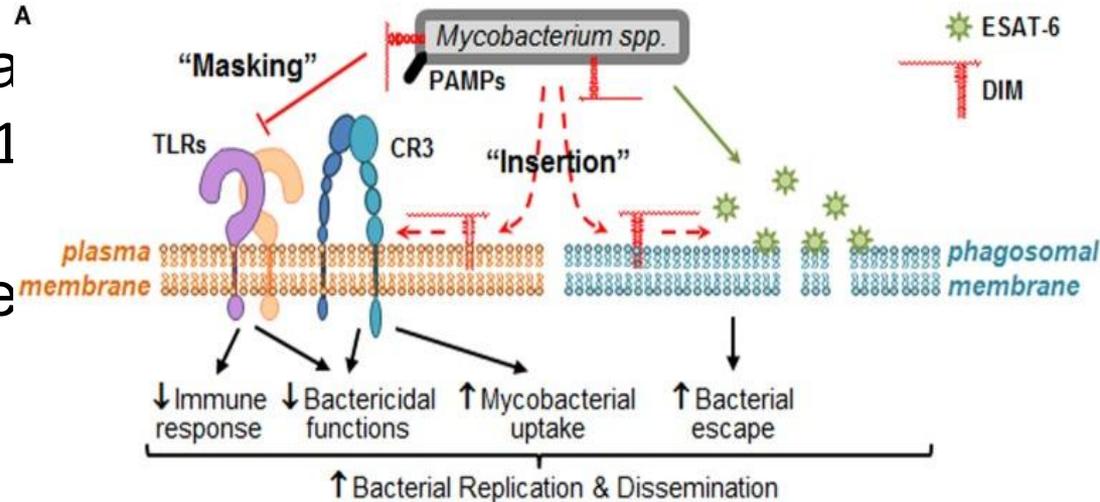
Например, антитела к 16кДа белку определяются еще в латентную фазу заболевания, а антитела к 38кДа белку характерны для активного прогрессирующего туберкулезного процесса с деструктивным поражением тканей легких.

# Классификация и функциональные категории протеома *M. tuberculosis*



# Факторы патогенности

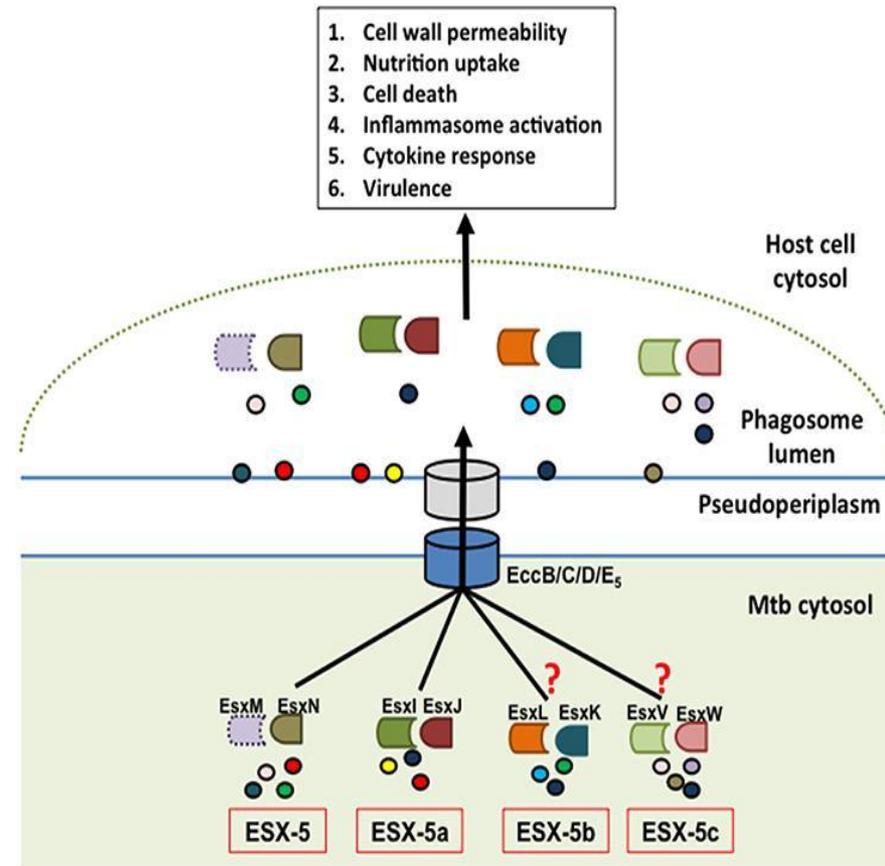
- Фтиоцеролдимикоцероза (PDIM) или сульфолипид1 (SL1) и структурно родственные фенольные гликолипиды (PGL) клеточной стенки особенно важны на начальной стадии инфицирования: маскируют распознавание PAMPs TLR-рецепторами и предотвращают развитие бактерицидного и иммунного ответа



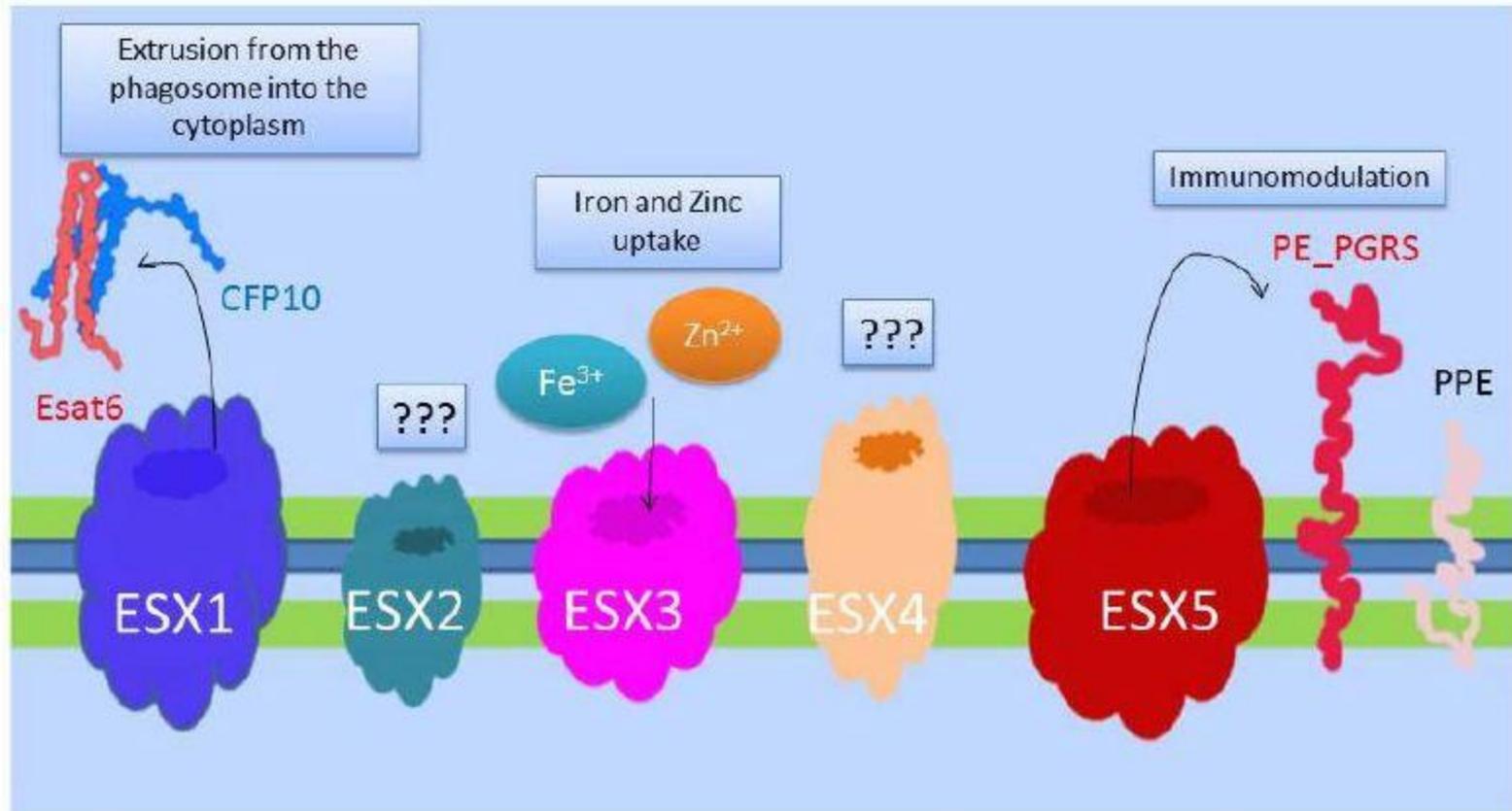
- **Putative molecular mechanisms through which DIM and PGL remodel macrophage activity during the early steps of infection.** When mycobacteria encounter macrophages, they use cell surface exposed PAMPs to recognize numerous plasma membrane PRRs, such as TLR (e.g., TLR-2) and carbohydrate-recognition receptors (e.g., CR3 or other lectin receptors). **(A)** During bacterial recognition, DIM exert a masking effect on PAMPs, thereby preventing TLR-2 detection and triggering of subsequent bactericidal and immune responses. DIM could also insert into plasma membrane, changing its biophysical properties in a manner that increases CR3-mediated bacteria uptake, and decreases bactericidal functions. Likewise, DIM could insert within intracellular membranes (e.g., phagosomal membranes) where they collaborate with ESAT-6 to increase its membrane lytic activity, thereby inducing membrane damage and consequently allowing mycobacteria to escape into the cytosol. Altogether, DIM-mediated effects may lead to mycobacteria replication and innate immune evasion. **(B)** Some PGL species, such *M. leprae* PGL-1 and potentially *Mtb* PGL-Tb1, are able to decrease host immune response either by direct inhibition of TLRs or by taking advantage of lectin receptor (e.g., CR3) capacity to interfere with TLR-triggered pro-inflammatory cytokine secretion (e.g., TNF- $\alpha$ ). They may also exploit these lectin receptors to promote mycobacterial uptake by macrophages. In the case of PGL-mar, a putative “PGL receptor” at the surface of epithelial cells has been proposed to be responsible for the induction of CCL2, and the subsequent macrophage recruitment.

# Факторы патогенности

- Только у микобактерий описан дополнительный тип секреции - **тип VII (T7SS)**, известный также под названием ESX-системы
- У секретируемых белков отсутствуют сигнальные последовательности, характерные для белков, транспортируемых через системы секреции типов I – VI.
- Такие белки отличаются наличием повторяющихся сочетаний либо остатков пролина и глутаминовой кислоты, из-за чего в английской аббревиатуре их называют **PE-белки** (E – обозначение глутаминовой кислоты в однобуквенной системе), либо пролина, пролина, и глутаминовой кислоты (соответственно эти белки



# Системы секреции



**Figure 1 - Protein Secretion systems.** Five different secretion systems have been described in *Mtb* (titled Type VII Secretion System -T7SS), encoded by gene clusters and called ESX1 to ESX5. ESX1 and ESX5 secrete different proteins involved in the virulence of *Mtb*: ESX1 secretes antigens that interfere with the integrity of the phagosomal membrane, leading to phagosomal rupture and bacterial emission into the cytosol. ESX5 is present only in slow growing mycobacteria (such as *Mtb* and *M. marinum*) and it is thought to be involved in the secretion of proteins (PPE and PE-PGRS) with immunomodulatory properties. ESX3 is involved in Zinc and Iron uptake and homeostasis and as such is essential for growth. The role of ESX2 and ESX4 remain still unknown.

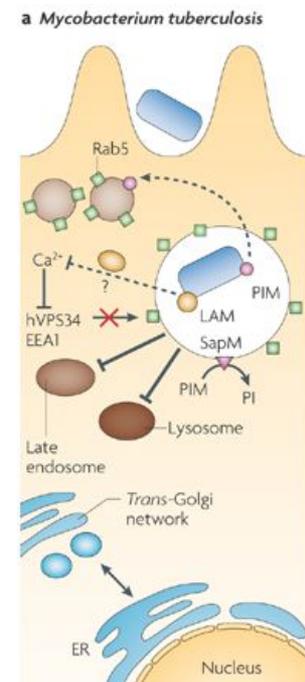
Таких систем известно 5: первое открытое сочетание генов секреции и генов секретируемых белков стали называть ESX-1, а остальные соответственно получали названия от ESX-2 до ESX-5

# Факторы патогенности

- К белкам семейства PPE относятся **ESAT-6** (early secreted antigenic target of 6 kDa) – рано активируемая антигенная мишень с массой 6 кД.) – белок, вызывающий образование пор в мембране эритроцитов, что приводит их к гибели, а также обеспечивает выход микобактерий из фагосомы в цитоплазму фагоцитов на стадии внутриклеточного существования.
- Вспомогательным белком для ESAT-6 является белок **CFP-10** (от англ. culture filtrate protein of 10 kDa – белок культуральной жидкости с массой 10 кД).
- Ген, который кодирует CFP-10, находится в одном опероне с геном, кодирующим ESAT-6, и они экспрессируются совместно.
- Один из основных генетических локусов вирулентности RD1 (Region of Difference 1) – гены системы секреции и секретлируемых белков - делеция его приводит к аттенуации

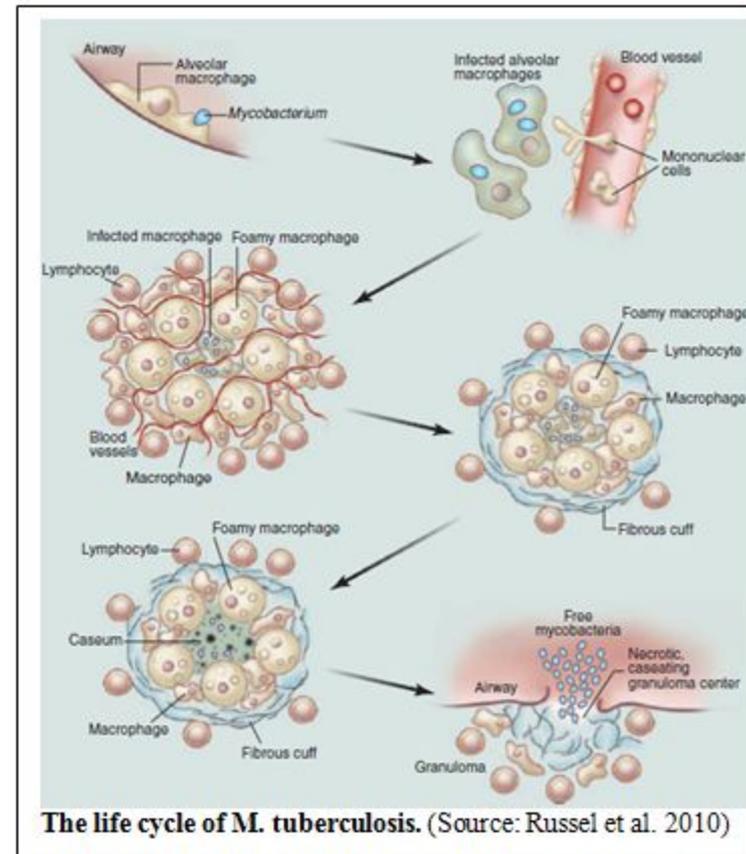
# Факторы патогенности

- ❑ Фактор адгезии - **корд – фактор** = сложный эфир трегаллозы и двух остатков миколовой кислоты -оказывает токсическое действие на ткани, поражая мембраны митохондрий и блокируя в них процессы окислительного фосфорилирования; подавляет миграцию лимфоцитов и обладает антифагоцитарной активностью
- ❑ Метаболизм липидов является ключевым для *M. tuberculosis*, что прямо или косвенно подтверждается рядом факторов: присутствием значительного числа генов ферментов метаболизма липидов в структуре генома; незаменимостью ряда генов на основании данных транспозонного му-тагенеза; ослаблением или утратой вирулентности



# Факторы патогенности

- Выживание и персистенция *M. tuberculosis* зависит от образования липидных тел и «вспененных» макрофагов – ключевое событие для высвобождения вирулентных палочек
- Инфицированные *M. Tuberculosis* фагосомы захватывают капельки клеточных липидов, и в итоге бактерия полностью ими окружена
- В дормантном состоянии *M. tuberculosis* использует эти липиды как источник углерода.

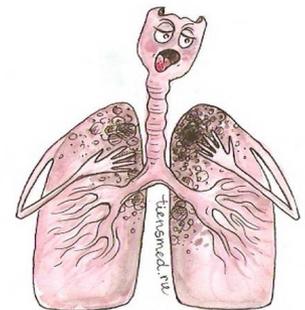
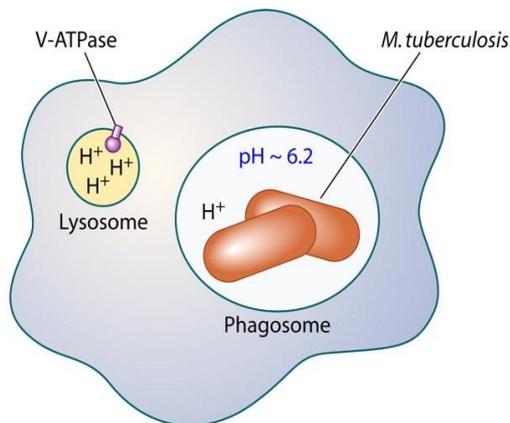


# Факторы патогенности

- ❑ **LAM** (lipoarabinomannan) - **липоарабиноманнан** представляет собой гетерогенную смесь высокомолекулярных липополисахаридов, ингибирует активацию макрофагов гамма-интерфероном.
- ❑ Под влиянием LAM макрофаги секретируют TNF-альфа (лихорадка, снижение веса и повреждение тканей) и IL-10 (тормозит индуцированную микобактериями пролиферацию Т-клеток)
- ❑ Слой гликолипидов называют «**микозидами**» и иногда сравнивают с микрокапсулой.
- ❑ **Комплекс «антиген 85»**. Связывает фибронектин, может участвовать в противостоянии иммунной системе
- ❑ Существенную роль в выживании туберкулезной палочки играют **сидерофоры**
- ❑ Не исключено, что некоторые факторы патогенности образуются только внутри заражённых клеток, как это происходит у других бактерий, предпочитающих внутриклеточный образ жизни.

# ОСОБЕННОСТИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ

- Способность возбудителя к внутриклеточному существованию (персистенции) и размножению
- Превращение предназначенных для выполнения защитных функций фагоцитов в «фармакологические убежища» для микобактерий
- Трансформация фагоцитов и превращение их в источник дисбаланса иммунной системы

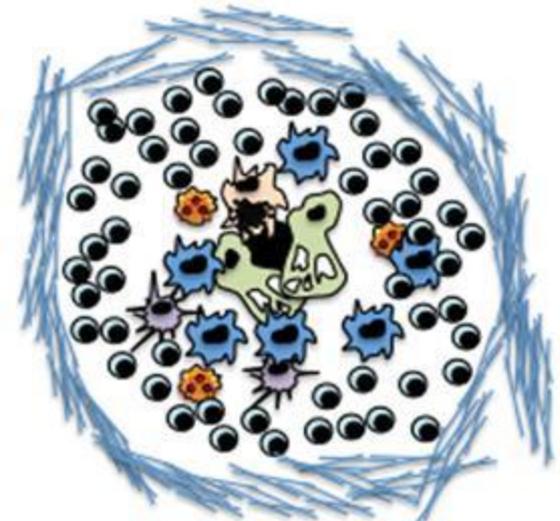
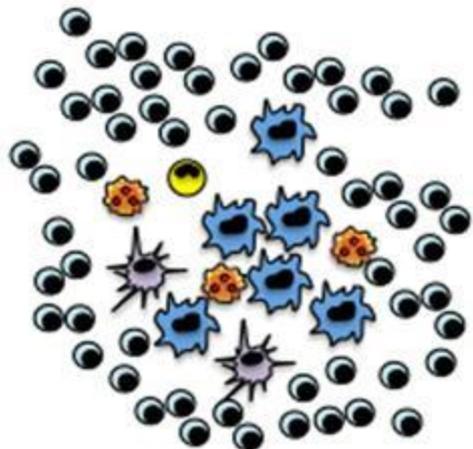
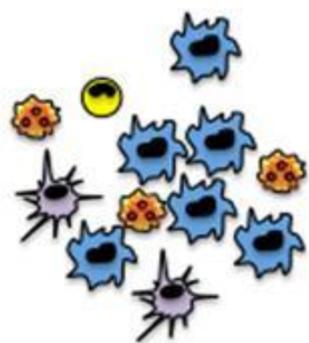
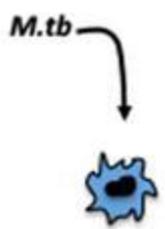


# Патогенез туберкулеза

- ❑ Взаимодействие [Mycobacterium tuberculosis](#) с организмом человека начинается при попадании возбудителя в альвеолы
- ❑ После адгезии с помощью корд-фактора микобактерии захватываются альвеолярными макрофагами;
- ❑ Туберкулез относится к классическим внутримакрофагальным инфекциям
- ❑ Взаимодействие между туб.палочкой и макрофагами инициирует базисный для туберкулеза процесс – воспаление гранулематозного типа
- ❑ Сходные реакции возникают и при других хронических инфекциях (бруцеллез, сифилис и др.)
- ❑ Неспецифическая (доиммунная) гранулема получает мощный импульс с появлением сенсibilизированных Т-лимфоцитов
- ❑ Неспецифическая гранулема трансформируется в специфическую (постиммунную), обретая признаки, характерные для туберкулеза

-  Macrophage
-  Neutrophil
-  Monocyte
-  Dendritic Cell

-  T cell
-  Fibrotic encapsulation
-  Foamy Macrophage
-  Epithelioid Macrophage



**infection**

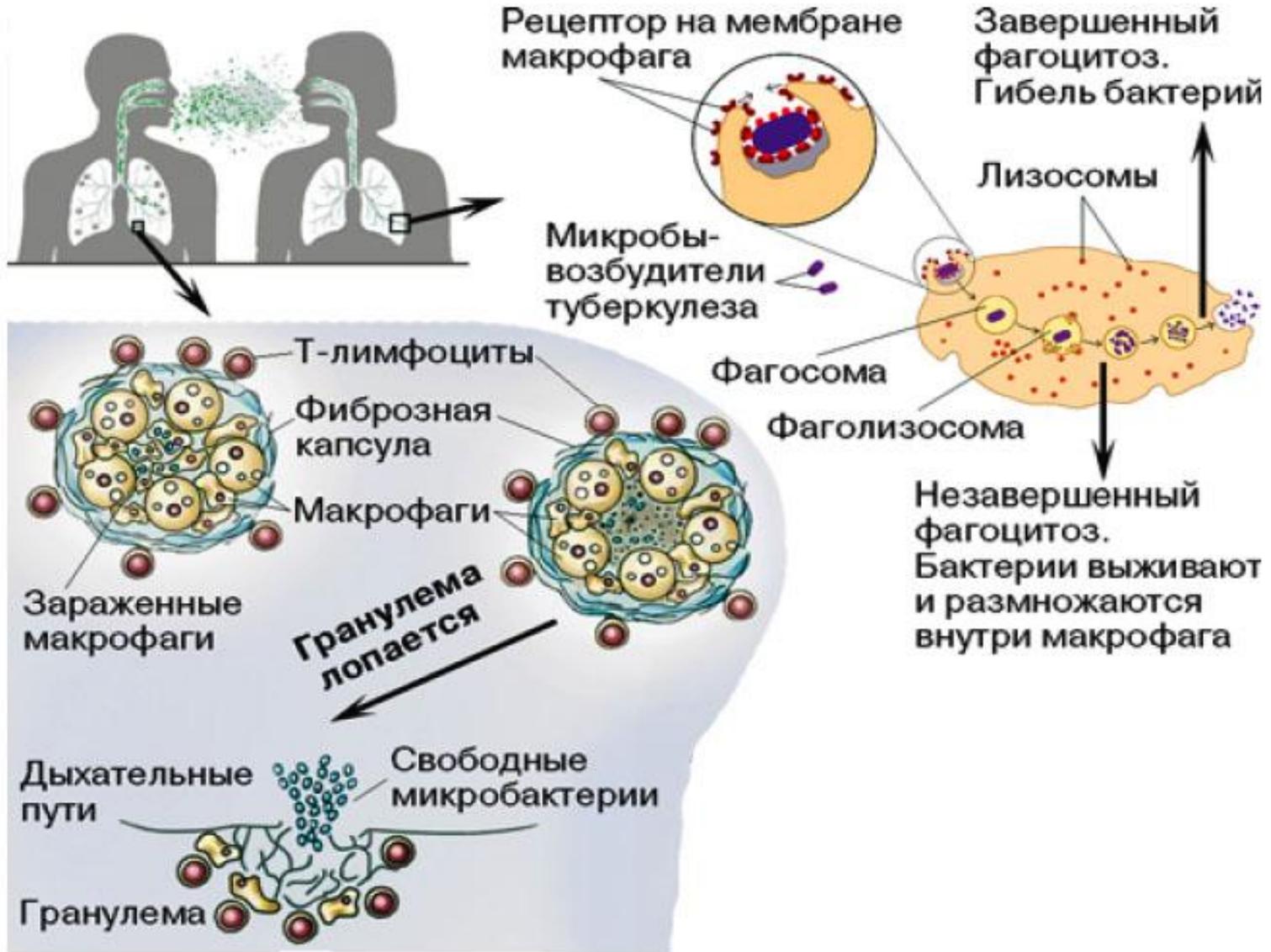
**'innate granuloma'**

**'immune granuloma'**

**'chronic granuloma'**

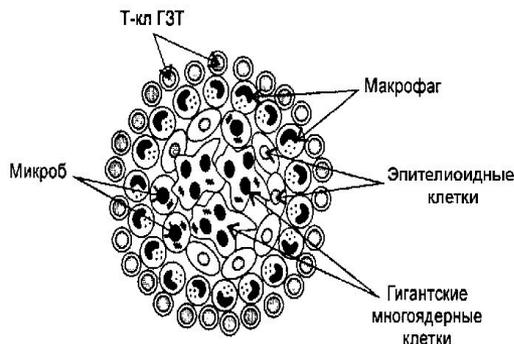
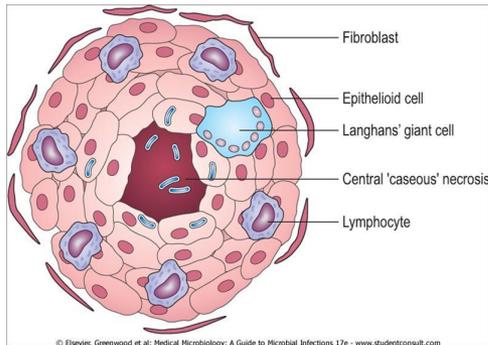
# Неспецифическая (доиммунная) гранулема

- ❑ Внутриклеточное размножение вызывает незначительное повреждение макрофагов, достаточное для привлечения моноцитов крови, которые попав в зону инфекции, трансформируются в макрофаги
- ❑ Нейтрофилы бездействуют, если и проявляют активность, то способствуют протеолизу некротических масс, который выгоден возбудителю
- ❑ Стимулом к воспалению служит секреция макрофагами цитокинов под действием компонентов клеточной стенки микобактерий
- ❑ Липоарабиноманнан:
  - ❑ блокирует секреторную функцию макрофагов – задержка воспалительного процесса способствует размножению бактерий
  - ❑ Снижает чувствительность макрофагов к гамма-интерферону
  - ❑ Ослабляет HLA-зависимое представление антигенов и пролиферацию Т-лимфоцитов
- ❑ Из легких туб.палочка проникает в регионарные лимфоузлы и кровотоки
- ❑ Сама по себе бактеремия на этом этапе не опасна, но создает условия для его персистенции и отсроченной реактивации в других органах
- ❑ Доиммунная фаза соответствует инкубационному периоду
- ❑ Таким образом, *первоначальное попадание возбудителя в легкие или другие органы вызывает развитие малого или неспецифического воспаления с макрофагальной инфильтрацией*

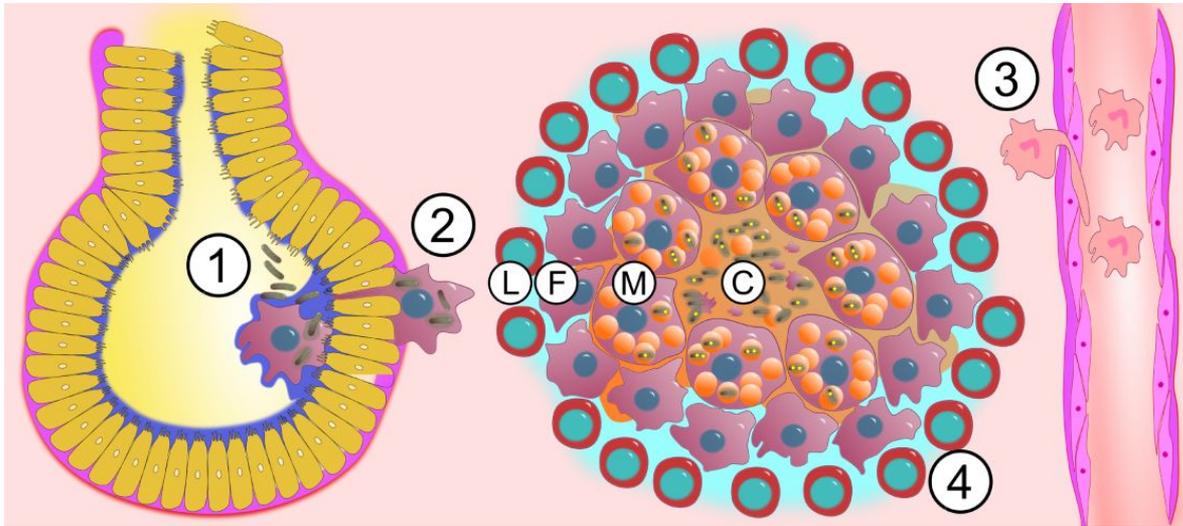


# Специфическая (постиммунная) гранулема

## Структура специфической туберкулезной гранулемы



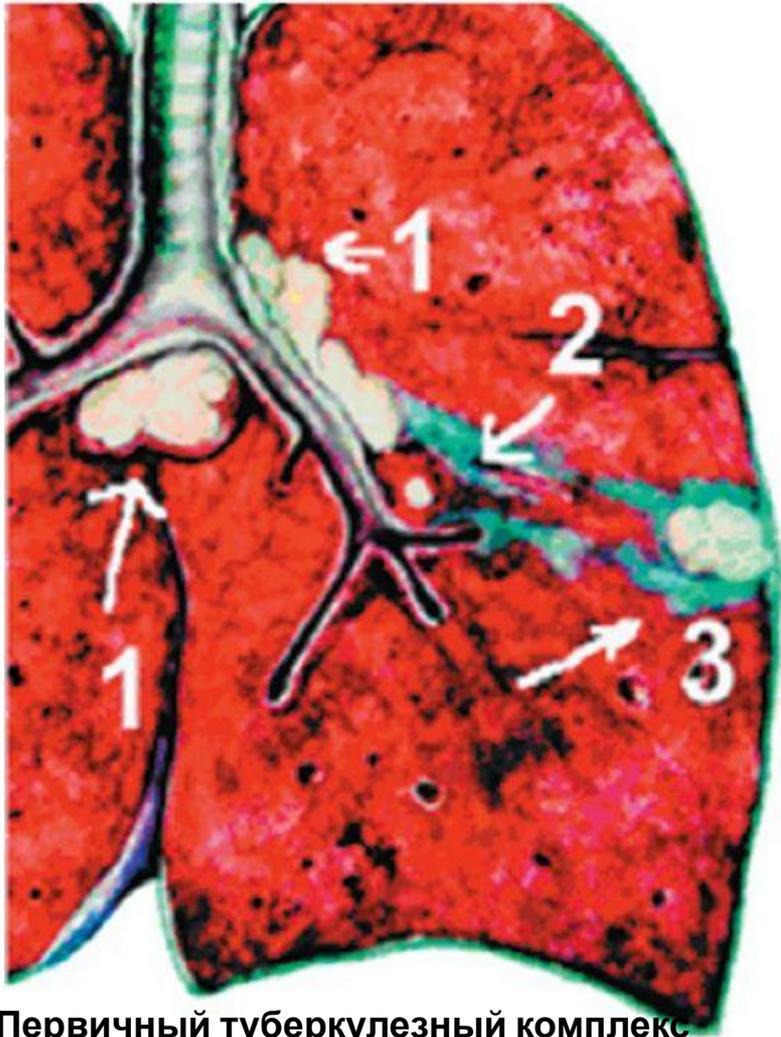
- ❑ Итог появления неспецифической гранулемы – развитие иммунного ответа против туберкулезной палочки
- ❑ Осуществляется Т-зависимая активация макрофагов
- ❑ Приток сенсibilизированных Т-лимфоцитов провоцирует обострение воспаления
- ❑ Цитотоксические Т-лимфоциты вызывают гибель инфицированных макрофагов и лишают микобактерии среды обитания
- ❑ Гранулема увеличивается в размерах
- ❑ В ней появляются гигантские многоядерные клетки Лангерганса-Пирогова (результат слияния активированных макрофагов)
- ❑ Макрофаги трансформируются в эпителиоидные клетки
- ❑ Центр гранулемы подвергается казеозному некрозу
- ❑ Активированные макрофаги секретируют коллаген, репарируют очаг повреждения
- ❑ Нередко это сочетается с кальцификацией



Развитие и структура туберкулезной гранулемы человека.

1. Захват *M. tuberculosis* альвеолярными макрофагами.
2. Миграция инфицированных макрофагов в ближайший лимфоузел
3. Появление системных моноцитов
4. Образование гранулемы
  - L – лимфоциты на периферии гранулемы
  - F – фиброзная капсула; содержит фибробласты. Коллаген и другие экстрацеллюлярные матриксные протеины
  - M – «вспененные» макрофаги
  - C – участок казеозного некроза
  - Оранжевым цветом показаны включения липидов в макрофаге
  - Желтые точки - липиды

# Патогенез (продолжение)



## Первичный туберкулезный комплекс

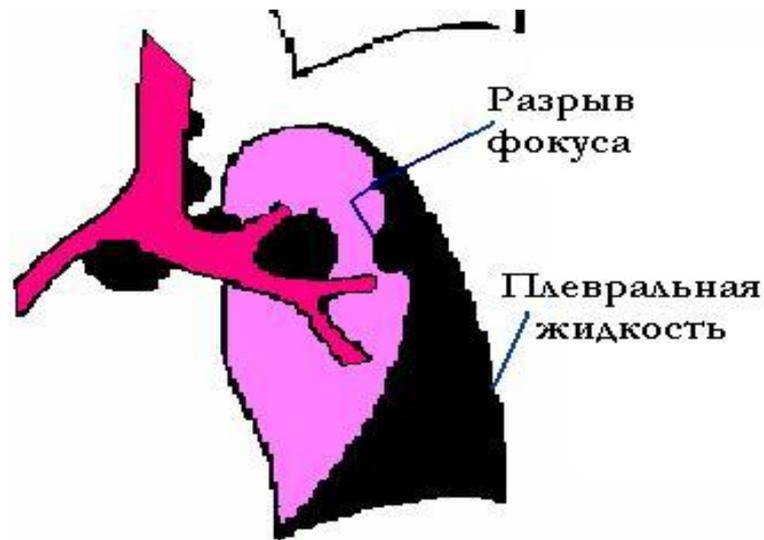
1- увеличенные прикорневые лимфатические узлы (лимфаденит);

2 - усиление бронхо-сосудистого рисунка между очагом и корнем легкого (лимфангит);

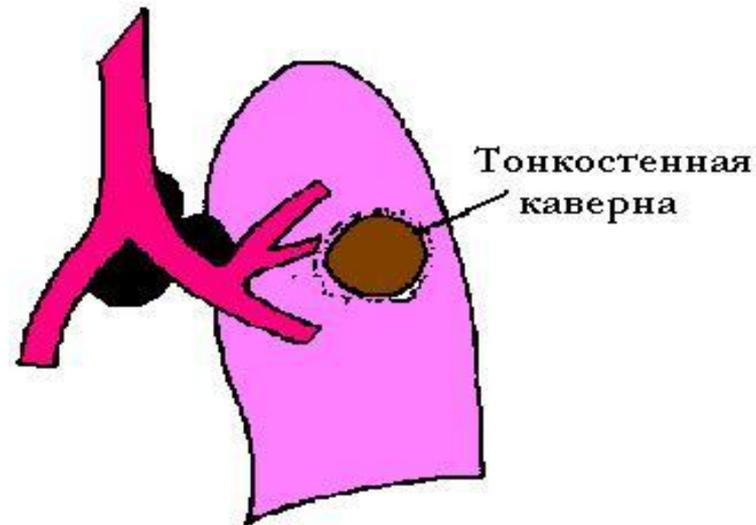
3 - первичный легочный аффект (очаг Гона).

- ❑ Описанные события – результат сбалансированного взаимодействия клеток
- ❑ В случае заживления очага некротические массы уплотняются, обызвествляются в результате отложения солей кальция, вокруг очага формируется соединительно-тканная капсула – **очаг Гона или первичный аффект**
- ❑ Первичный аффект в сочетании с регионарным лимфаденитом наз. **Первичный туберкулезный комплекс**
- ❑ Чаще всего он самоизлечивается
- ❑ **Но** микобактерии в виде L-форм сохраняют в таком очаге жизнеспособность долгие годы
- ❑ При снижении резистентности макроорганизма происходит активация очага с развитием вторичного туберкулеза

## Осложнения первичного туберкулезного комплекса у детей



Прорыв в плевральную полость



Распад легочного фокуса с вовлечением стенки бронха

### Исходы первичного туберкулезного комплекса:

1. заживление с инкапсуляцией, обызвествлением или окостенением;
2. прогрессирование с развитием различных форм **генерализации**, присоединением неспецифических осложнений типа ателектаза, пневмосклероза и пр.

При прогрессировании первичного туберкулезного комплекса различают **генерализацию**:

- гематогенную;
- лимфогенную;
- бронхогенную.

# Патогенез туберкулеза

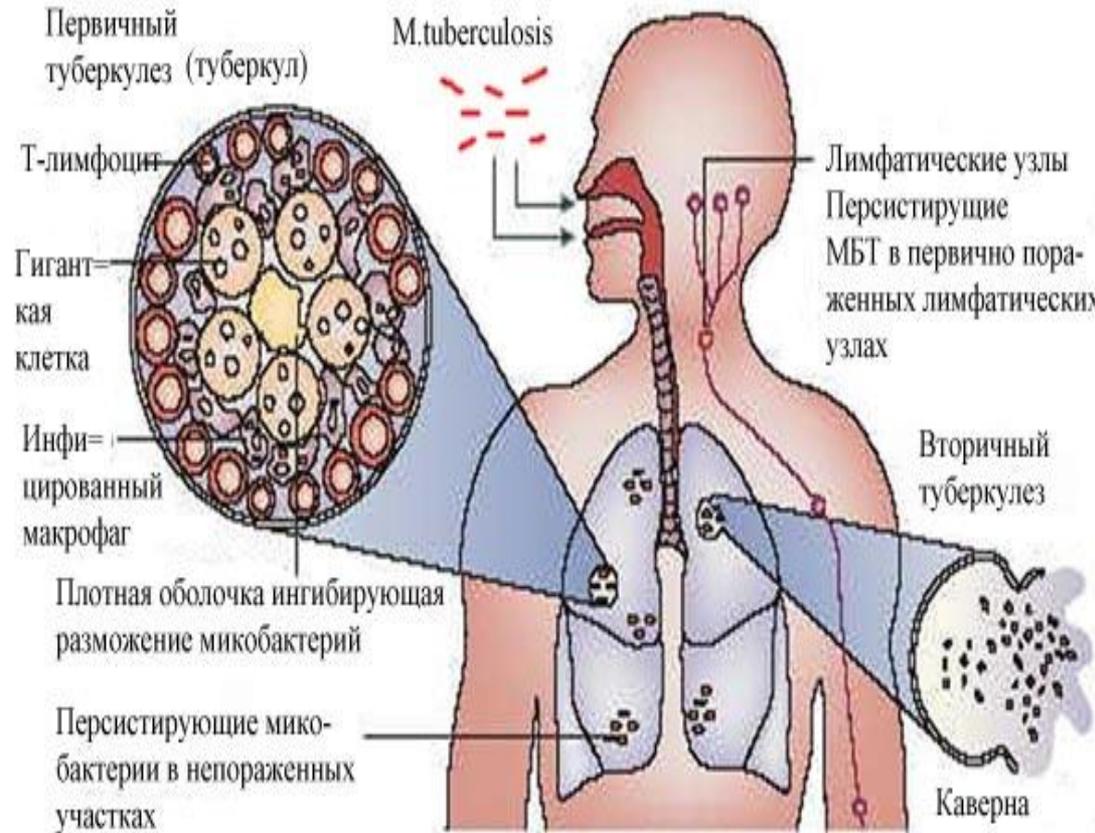
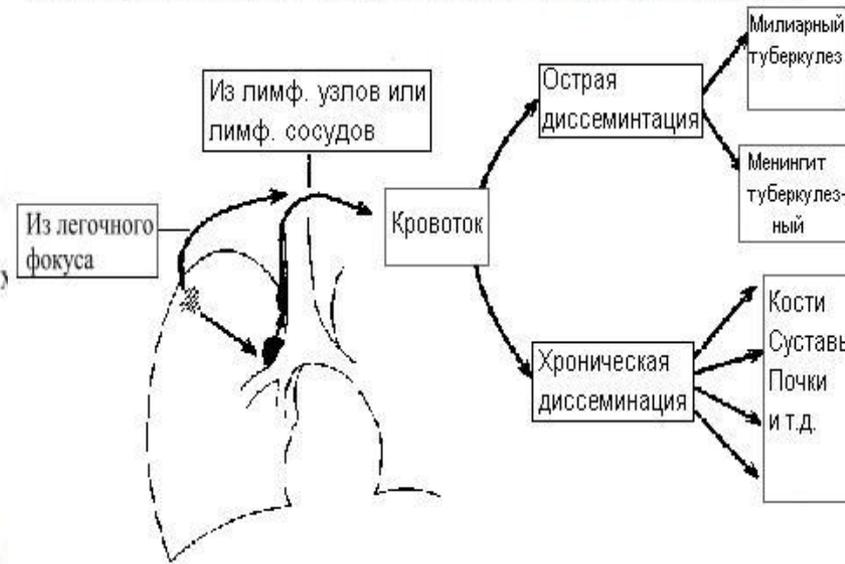
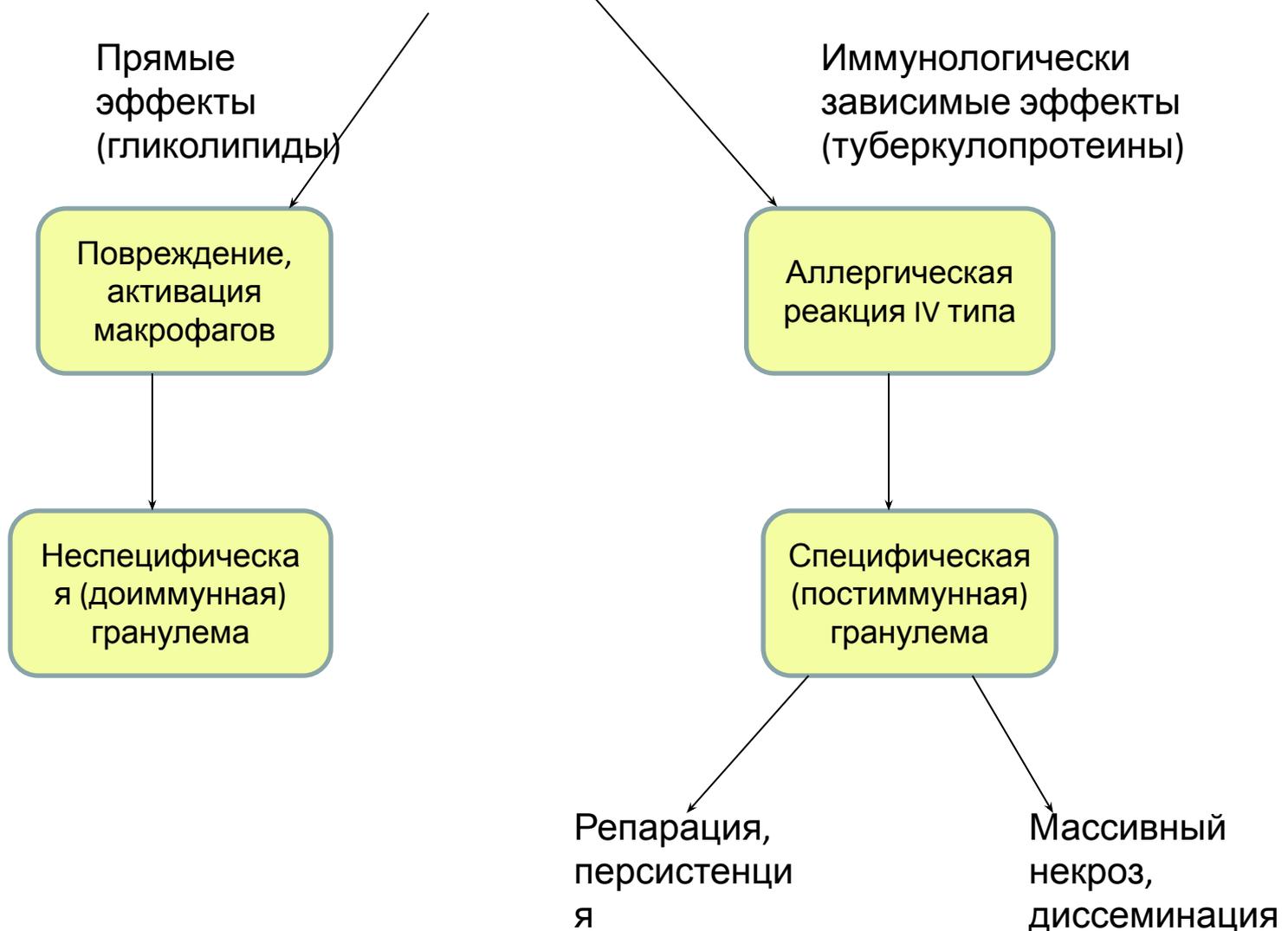


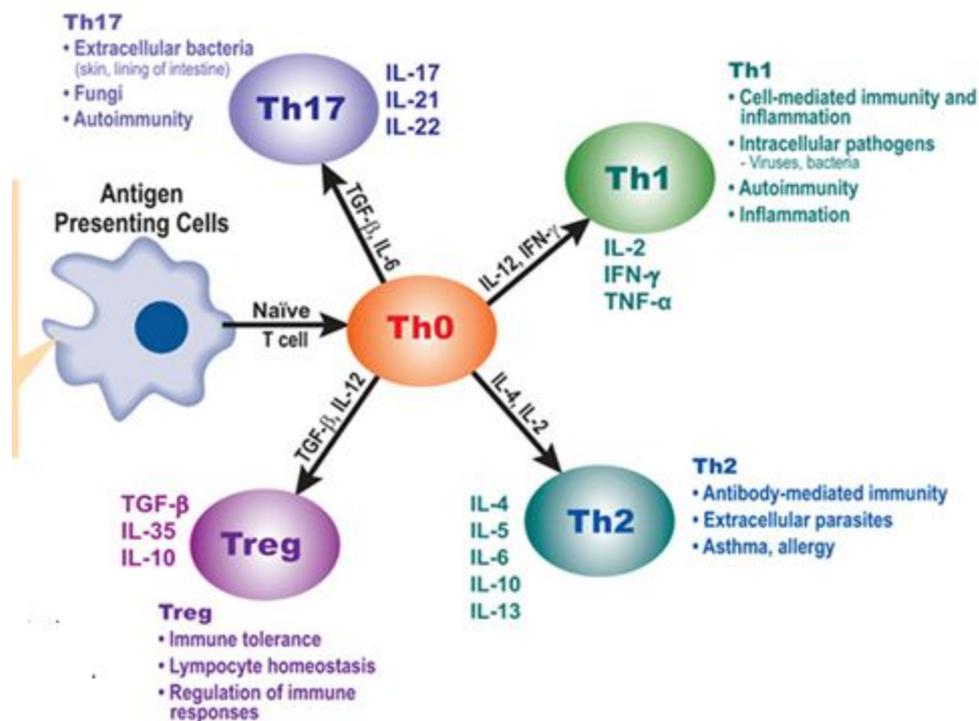
Рис. 1.4.8. Гематогенная и лимфогематогенная диссеминация МБТ



# M.tuberculosis



- Туберкулез органов дыхания – заболевание, сопровождающееся вторичным иммунодефицитом
- При активном туберкулезе клеточное звено угнетено, гуморальное – усилено
- Прогрессирование туберкулеза ведет к угнетению клеточного и гуморального иммунитета



# Патогенез

- Обобщая, туберкулез следует отнести к реактивным (иммунологически зависимым) патологиям, возбудители которых, не обладая достаточным арсеналом прямых деструктивных начал, поддерживают болезнь за счет конфликта с эффекторами иммунитета, вынуждая их к патогенетически значимым реакциям

А.Н. Маянский

# Клинические проявления

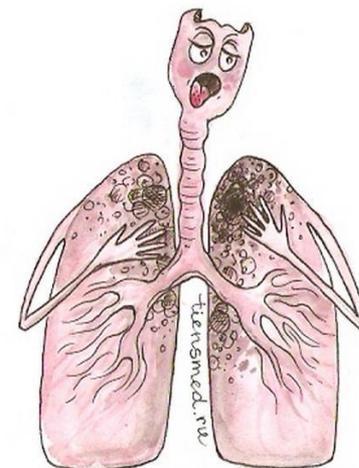
- Различают три клинические формы заболевания:
- ❖ Первичная туберкулезная интоксикация у детей и подростков
- ❖ Туберкулез органов дыхания
- ❖ Туберкулез других органов и систем

# Основные клинические формы туберкулеза

1. Туберкулезная интоксикация у детей и подростков

2. Туберкулез органов дыхания:

- Первичный туберкулезный комплекс
- Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов
- Диссеминированный туберкулез легких
- Милиарный туберкулез
- Очаговый туберкулез легких
- Инфильтративный туберкулез легких
- Казеозная пневмония
- Туберкулема легких
- Кавернозный туберкулез легких
- Фиброзно-кавернозный туберкулез легких
- Цирротический туберкулез легких
- Туберкулезный плеврит (в том числе эмпиема)
- Туберкулез бронхов, трахеи, верхних дыхательных путей
- Туберкулез органов дыхания, комбинированный с профессиональными пылевыми заболеваниями легких (кониотуберкулез)



# Основные клинические формы туберкулеза

## 3. Туберкулез других органов и систем:

- Туберкулез мозговых оболочек и центральной нервной системы
- Туберкулез кишечника, брюшины и брыжеечных лимфатических узлов
- Туберкулез костей и суставов
- Туберкулез мочевых, половых органов
- Туберкулез кожи и подкожной клетчатки
- Туберкулез периферических лимфатических узлов
- Туберкулез глаз
- Туберкулез прочих органов



# Генетический контроль

- В настоящее время можно считать установленным, что развитие инфекционного процесса контролируется на всех его стадиях двумя категориями генов. Одна из них — *система Ir-генов* — определяет интенсивность гуморального и (или) клеточно-опосредованного иммунного ответа к данному возбудителю. Другая — *контролирует степень естественного иммунитета (резистентности) к возбудителю*.
- **Ген BCG**, который контролирует размножение *Mycobacterium bovis* (BCG) во внутренних органах мыши, - оказался универсальным геном, определяющим естественный иммунитет животного к разным видам микроорганизмов.
- Есть указания на то, что устойчивость к туберкулезу ассоциирована с HLA-фенотипом
- Вызывают интерес наблюдения о гиперрезистентности к возбудителям туберкулеза и микобактериозов у лиц с избирательными иммунодефицитами, например, с врожденным дефектом по Th-цитокинам и их рецепторам (гамма-интерферон, интерлейкин-12)
- Международная группа ученых провела в Сингапуре (Индонезия) исследование, в результате которого они нашли новый ген, который играет важную роль в возникновении туберкулеза легких. Ген получил название TLR8.
- В ходе исследования специалисты выявили, что чувствительность человека к туберкулезу определяется геном TLR8, который находится в X хромосоме. Мужчины более чувствительны к туберкулезу, так как имеют только одну X хромосому и, соответственно, только один вариант гена. Женщины, благодаря двум X хромосомам, имеют два разных варианта одного и того же гена, что

# Иммунитет

- ❑ Противотуберкулезный иммунитет формируется в ответ на проникновение в организм микобактерий в процессе инфекции или после вакцинации и носит *нестерильный*, инфекционный характер, что обусловлено длительной персистенцией L-форм
- ❑ Решающая роль принадлежит *клеточному* иммунитету с развитием ГЗТ
- ❑ Исход заболевания определяется активностью Т-хелперов, которые активируют фагоцитарную активность макрофагов и активность Т-киллеров
- ❑ При нормальном функционировании врожденной системы иммунитета по-видимому, не требуется участия специфического иммунитета для защиты против микобактерий
- ❑ Однако при снижении по разным причинам функции альвеолярных макрофагов и нейтрофилов активация специфического иммунитета может быть необходимой. В этом случае протективный иммунный ответ ассоциирован с активацией Тх1. И, наоборот, развитие как инвазивных процессов, так и гиперчувствительности к *M. tuberculosis* связано с недостаточной активацией Тх1 и доминированием Тх2.

# Иммунитет

Протективная роль антител в защите против *M. tuberculosis*, была описана еще в конце 19 века П. Паквиным и К. Фишем. Например, П. Паквин в 1897 году отмечал положительный эффект терапии туберкулезных больных лошадиными антитуберкулиновыми сыворотками [98, 113, 228].

В настоящее время также получены экспериментальные доказательства протективной роли антител в защите против микобактериальной инфекции [121].

В ряде исследований было продемонстрировано, что введение иммунокомпетентным мышам (дефицитным по В-клеткам или с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID)), инфицированным *M. tuberculosis* или *M. bovis*, моноклональных антител против некоторых антигенов *M. tuberculosis* (НВНА, 16кДа белок, Ag85А, Ag85В, МРТ83, ЛАМ), способствует снижению обсемененности тканей микобактериями и увеличению продолжительности жизни животных за счет уменьшения гранулематозного воспаления и некроза [30, 66, 112, 114, 174, 188, 229, 312].

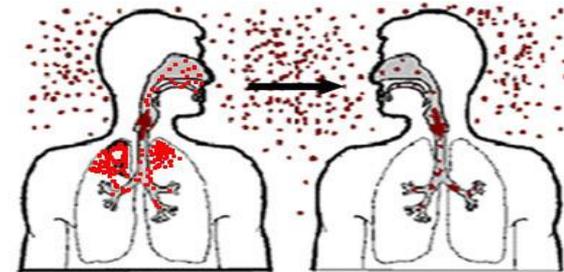
Данные, полученные А. М. Costello, свидетельствуют об участии антимикуобактериальных антител (антител против ЛАМ и сониката культуры *M. tuberculosis*) в предотвращении развития диссеминированных форм туберкулеза у детей [74].

Гуморальный иммунитет может играть большую роль в защите против туберкулеза, чем предполагалось ранее. Так, например, в недавних исследованиях было показано, что в легких у больных туберкулезом людей обнаруживаются фолликулоподобные агрегаты, состоящие из В-клеток, а у больных обезьян - даже

Характер иммунного ответа при туберкулезе зависит от природы антигенов *M. tuberculosis* и их свойств. Например, замечено, что гуморальный иммунный ответ формируется преимущественно на высокомолекулярные белки (38 кДа, 81кДа белки, 309 кДа белок (Rv3347), а Т-клеточный ответ - на низкомолекулярные белки (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) [50, 57, 169, 170,180].

# Эпидемиология

- ❑ *Основной источник инфекции – больной туберкулезом органов дыхания*
- ❑ *Пути передачи – воздушно-капельный, реже алиментарный, контактный, крайне редко трансплацентарный*
- ❑ *Туберкулез распространен повсеместно*
- ❑ *Росту заболеваемости способствуют социально-экономические факторы (основной фактор – голодание)*
- ❑ *С 1990 года во всем мире регистрируется резкий подъем заболеваемости*
- ❑ *Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и синдром приобретенного иммунодефицита вызвали заметное увеличение числа случаев туберкулеза в некоторых странах*
- ❑ *С другой стороны, проблема заключается в распространении микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью*





СТРЕСС

- ❑ Сейчас известно, что примерно две трети жителей Земли являются носителями микобактерии туберкулеза.
- ❑ А вот болеет всего один процент от числа зараженных.
- ❑ "Клинический туберкулез - настоящая ошибка природы, - говорит руководитель лаборатории экспериментальной иммуногенетики Центрального НИИ туберкулеза РАМН Александр Апт. - Обычно иммунитет хорошо защищает человека, инфицированного микобактерией. Приходится удивляться не тому, что среди носителей этой бактерии мало больных, а тому, что они вообще есть. Это заболевание - результат какого-то сбоя в тонких клеточных механизмах".
- ❑ Ученые спорят, что именно в конечном итоге заставляет микобактерию проснуться, почему один процент из тех, кто носит ее в своем организме, вдруг заболевает. Возможно, это гормональные изменения, происходящие с возрастом. Не менее важно и другое - в популяциях, "нагруженных" стрессом, таких как население современной России, туберкулезом болеют более молодые люди. Доказано, что звонком будильника для микобактерии служит и неправильное питание, в первую очередь недостаток белковой пищи.



# Эпидемиология

- ❑ Основной причиной смертности больных СПИДом на сегодняшний день является туберкулез (ТБ).
- ❑ Увеличение доли больных ТБ и ВИЧ-инфекцией оказывает значительное влияние на эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в России в последние годы
- ❑ Процесс выявления туберкулеза у таких больных достаточно сложный.

## Внелегочный туберкулез. Структура в сравнении

ВИЧ – (3-7%)		ВИЧ + (30-70%)	
1.	Туберкулез мочевыделительной системы	1.	Туберкулез лимфатической системы
2.	Туберкулез костей и суставов	2.	Туберкулез ЦНС
3.	Туберкулез лимфатических узлов	3.	Туберкулез мочевыделительной системы
4.	Туберкулез ЦНС	4.	Туберкулез печени
5.	Наиболее часто изолированное (моноорганный) поражение	5.	Течение по типу туберкулозепа (туберкулозепа Ландузи)

# ИЛЛ. *Mycobacterium avium-intracellulerae* комплекс (МАК) у больных СПИДом и его значение

Два вида нефотохромогенных микобактерий (*M. avium*, возбудитель туберкулеза птиц, и *M. intracellulare*) морфологически и культурально идентичны друг другу.

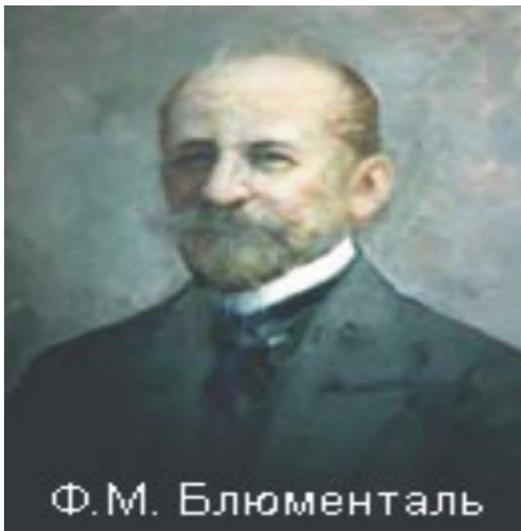
У человека вызывают туберкулезоподобные поражения легких, почек, кожи и костно-суставной системы.

Особую опасность представляют для больных иммунодефицитами (особенно со СПИДом), так как в примерно половине случаев у таких людей вызывают генерализованные поражения.

Отличаются от других условно-патогенных микобактерий множественной устойчивостью к лекарственным препаратам, в связи с чем лечение вызванных МАК поражений представляет большую проблему. Часто приходится прибегать к хирургическому удалению пораженных тканей. При этом у 20% пациентов в течение 5 ближайших лет заболевание рецидивирует.

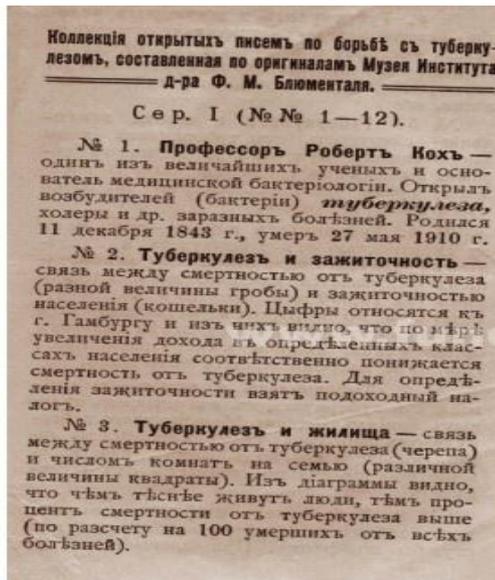
- Возможно, в развитии ВИЧ-ассоциированных инфекций существуют факторы X, делающие данных паразитов «востребованными»
- Для возбудителя другой СПИД-индикаторной инфекции — *M. avium*, известны, по крайней мере, два “фактора X”. Первый, это интерлейкин 6. Его повышенный синтез у ВИЧ-инфицированных людей резко увеличивает чувствительность макрофагов к *M. avium*. Второй — белок gp120 самого ВИЧ. При исследовании бронхоальвеолярных смывов инфицированных и здоровых лиц было установлено, что присутствие этого белка усиливает размножение *M. avium* в альвеолярных макрофагах, — заражение человека этой микобактерией становится *специфическим и неизбежным*.
- Роль одного из “факторов X” для пандемического распространения возбудителя туберкулеза играет сурфактантный белок А ( SP - А ), присутствующий в бронхоальвеолярной жидкости ВИЧ-инфицированных людей. Он усиливает прикрепление *M. tuberculosis* к альвеолярным макрофагам, по этой причине пандемия туберкулеза, всегда считавшегося социальной болезнью, имеет упорное течение в богатых странах с развитым здравоохранением. Не привлеки в начале 1970-х гг. ретровирусы внимание онкологов, то ВИЧ не был бы открыт, и современная нам пандемия туберкулеза рассматривалась бы учеными как самостоятельное явление.

# Немного истории



Ф. М. Блюменталь

Организатор общественной борьбы с туберкулезом, доктор Филипп Маркович Блюменталь



Коллекція открытых писемъ по борьбѣ съ туберкулезомъ, составленная по оригиналамъ Музея Института д-ра Ф. М. Блюментала.

Сер. I (№ № 1—12).

№ 1. Профессоръ Робертъ Кохъ — одинъ изъ величайшихъ ученыхъ и основатель медицинской бактериологiи. Открылъ возбудителя (бактерiю) **туберкулеза**, холеры и др. заразныхъ болѣзней. Родился 11 декабря 1843 г., умеръ 27 мая 1910 г.

№ 2. **Туберкулезъ и зажиточность** — связь между смертностью отъ туберкулеза (разной величины гробы) и зажиточностью населенiя (кошельки). Цифры относятся къ г. Гамбургу и изъ нихъ видно, что по мѣрѣ увеличенiя дохода въ опредѣленныхъ классахъ населенiя соответственно понижается смертность отъ туберкулеза. Для опредѣленiя зажиточности взяты подоходный налогъ.

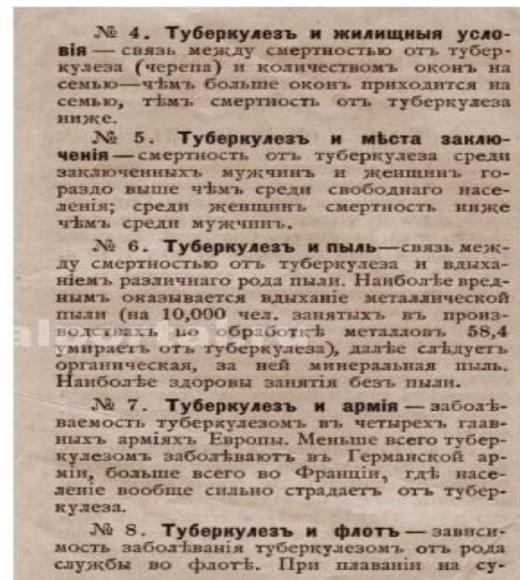
№ 3. **Туберкулезъ и жилища** — связь между смертностью отъ туберкулеза (черепъ) и числомъ комнатъ на семью (различной величины квадраты). Изъ диаграммы видно, что чѣмъ тѣснѣе живутъ люди, тѣмъ процентъ смертности отъ туберкулеза выше (по расчету на 100 умершихъ отъ всѣхъ болѣзней).

дахъ заботливость туберкулезомъ значительно ниже, чѣмъ при пребыванiи на берегу во флотскихъ казармахъ.

№ 9. **Туберкулезъ и алкоголизмъ** — смертность отъ туберкулеза въ зависимости отъ потребления алкоголя въ отдѣльныхъ департаментахъ Францiи. На каждой бутылкѣ указанъ размѣръ душевого потребления алкоголя въ литрахъ въ годъ въ каждомъ отдѣльномъ департаментѣ (губернiи), черепъ на ярлыкахъ означаютъ величину смертности отъ туберкулеза. Изъ диаграммы видно, что чѣмъ больше въ данномъ округѣ потребление алкоголя, тѣмъ выше въ немъ смертность отъ туберкулеза.

№ 10. **Туберкулезъ въ Англии и Уэльсѣ** — диаграмма показываетъ фактическое паденiе смертности отъ туберкулеза въ Англии и Уэльсѣ съ 1851 по 1905 г. въ зависимости отъ планоустроеннаго улучшенiя общихъ санитарныхъ условий и оздоровительныхъ мѣропрiятiй, проведенныхъ въ этой странѣ. Если паденiе смертности и впредъ будетъ продолжаться въ такой мѣрѣ, — а сомнѣваться въ этомъ нѣтъ основанiй, — то можно ожидать, что къ концу 1940 г. туберкулезъ, какъ народная болѣзнь, въ Англии будетъ искорененъ.

№ 11. **Туберкулезъ и лѣченiе** — успѣхи лѣченiя туберкулеза въ Германскихъ народныхъ санаторiяхъ, какъ въ клиническомъ (возстановленiе здоровья), такъ и въ эконо-



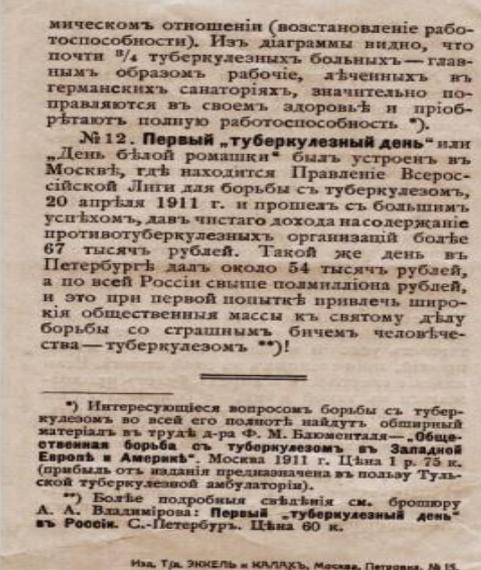
№ 4. **Туберкулезъ и жилищныя условия** — связь между смертностью отъ туберкулеза (черепъ) и количествомъ оконъ на семью — чѣмъ больше оконъ приходится на семью, тѣмъ смертность отъ туберкулеза ниже.

№ 5. **Туберкулезъ и мѣста заключенiя** — смертность отъ туберкулеза среди заключенныхъ мужчинъ и женщинъ гораздо выше чѣмъ среди свободнаго населенiя; среди женщинъ смертность ниже чѣмъ среди мужчинъ.

№ 6. **Туберкулезъ и пыль** — связь между смертностью отъ туберкулеза и вдыханiемъ различнаго рода пыли. Наиболѣе вреднымъ оказывается вдыханiе металлической пыли (на 10,000 чел. занятыхъ въ производствѣ по обработкѣ металловъ 58,4 умираетъ отъ туберкулеза), далѣе слѣдуетъ органическая, за ней минеральная пыль. Наиболѣе здоровы занятiя безъ пыли.

№ 7. **Туберкулезъ и армiя** — заботливость туберкулезомъ въ четырехъ главныхъ армiяхъ Европы. Меньше всего туберкулезомъ заболѣваютъ въ Германской армiи, больше всего во Францiи, гдѣ населенiе вообще сильно страдаетъ отъ туберкулеза.

№ 8. **Туберкулезъ и флотъ** — зависимость заболѣванiя туберкулезомъ отъ рода службы во флотѣ. При плаванiи на су-



мическомъ отношенiи (возстановленiе работоспособности). Изъ диаграммы видно, что почти  $\frac{3}{4}$  туберкулезныхъ больныхъ — главнымъ образомъ рабочiе, лѣченныхъ въ германскихъ санаторiяхъ, значительно поправляются въ своемъ здоровьѣ и приобрѣтаютъ полную работоспособность \*).

№ 12. **Первый „туберкулезный день“** или „День бѣлой ромашки“ былъ устроенъ въ Москвѣ, гдѣ находится Правленiе Всероссийской Лиги для борьбы съ туберкулезомъ, 20 апрѣля 1911 г. и прошелъ съ большимъ успѣхомъ, давъ чистаго дохода насодержанiе противотуберкулезныхъ организаций болѣе 67 тысячъ рублей. Такой же день въ Петербургѣ далъ около 54 тысячъ рублей, а по всей Россii свыше полмиллиона рублей, и это при первой попыткѣ привлечь широкiя общественныя массы къ святому дѣлу борьбы со страшнымъ бичемъ человечества — туберкулезомъ \*\*).

\*). Интересующiеся вопросамъ борьбы съ туберкулезомъ во всей его полнотѣ найдутъ обширный материалъ въ трудѣ д-ра Ф. М. Блюментала — „Общественная борьба съ туберкулезомъ въ Западной Европѣ и Америкѣ“. Москва 1911 г. Цѣна 1 р. 75 к. (пробыль отъ изданiя предназначена въ пользу Тульской туберкулезной амбулаторiи).

\*\*). Болѣе подробныя свѣдѣнiя см. брошюру А. А. Владимiрова: „Первый „туберкулезный день“ въ Россii“. С.-Петербургъ. Цѣна 60 к.

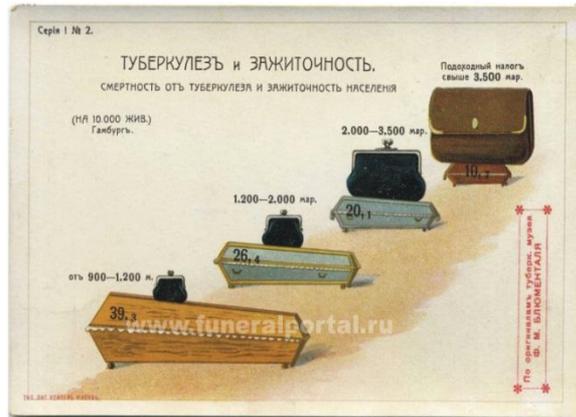
Изд. Т. д. ЭНГЕЛЬ и КАЛАХЪ, Москва, Петровка, № 15.



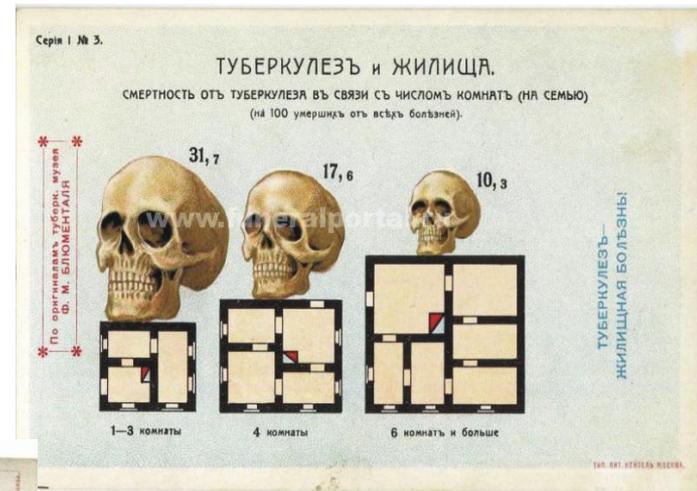
Коллекция открытых писем по борьбе с туберкулезом, составленная по оригиналам Музея Института доктора Ф. М. Блюментала. Сер. I (№№1-12) (упаковка почтовых карточек)

Описание почтовых карточек из коллекции открытых писем по борьбе с туберкулезом

# Немного истории



Карточка №2 из коллекции. Туберкулез и зажиточность - связь между смертностью от туберкулеза (разной величины гробы) и зажиточностью (кошельки). Цифры относятся к Гамбургу, и из них видно, что по мере увеличения дохода в определенных класса населения соответственно снижается смертность от туберкулеза. Для определения зажиточности взят подоходный налог



карточка №3 из коллекции. Туберкулез и жилища - связь между смертностью от туберкулеза (череп) и числом комнат на змью (различной величины квадраты). Из диаграммы видно, го чем теснее живут люди, тем процент смертности от /беркулеза выше (по расчету на 100 умерших от всех болезней)



Карточка №5 из коллекции. Туберкулез и места заключения - смертность от туберкулеза среди заключенных мужчин и женщин гораздо выше, чем среди свободного населения; среди женщин смертность ниже, чем среди мужчин



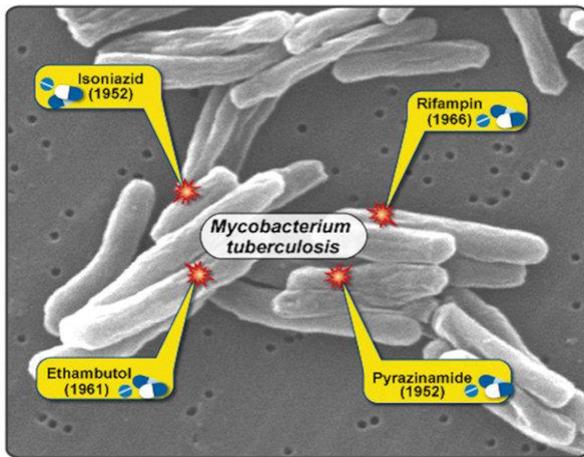
Карточка №9 из коллекции. Туберкулез и алкоголизм - смертность от туберкулеза в зависимости от потребления алкоголя в отдельных департаментах Франции. На каждой бутылке указан размер потребления алкоголя на душу населения в литрах в год в каждом отдельном департаменте (губернии), черепа на ярлыках означают величину смертности от туберкулеза. Из диаграммы видно, что чем больше в данном округе потребление алкоголя, тем выше в нем смертность от туберкулеза



Карточка №4 из коллекции. Туберкулез и жилищные условия - связь между смертностью от туберкулеза (череп) и количеством окон на семью - чем больше окон приходится на семью, тем смертность от туберкулеза ниже



Карточка №12 из коллекции. В верхнем левом углу карточки крест обвитый белыми ромашками. Первый “туберкулезный день”, или “День белой ромашки” был устроен в Москве, где находится Правление Всероссийской Лиги для борьбы с туберкулезом, 20 апреля 1911 г. И прошел с большим успехом, дав чистого дохода на содержание противотуберкулезных организаций более 67 тысяч рублей. Такой же день в Петербурге дал около 54 тысяч рублей, а по всей России свыше полумиллиона рублей, и это при первой попытке привлечь широкие общественные массы к святому делу борьбы со страшным бичом человечества - туберкулезом!



# Лечение

В настоящее время по степени эффективности противотуберкулезные препараты делятся на 3 группы:

- Группа **A** – изониазид, рифампицин и их производные (рифабутин, рифатер)
- Группа **B** – стрептомицин, канамицин, этионамид, циклосерин, фторхинолоны и др.
- Группа **C** – ПАСК и тиацетозон



# Противотуберкулёзные препараты (Классификация ВОЗ, 1998)

## Препараты 1-го ряда

- Изониазид
- Рифампицин
- Пиразинамид
- Этамбутол
- Стрептомицин

## Препараты 3-го ряда

Кларитромицин

Амоксициллин + клавулановая кислота

Клофазимин

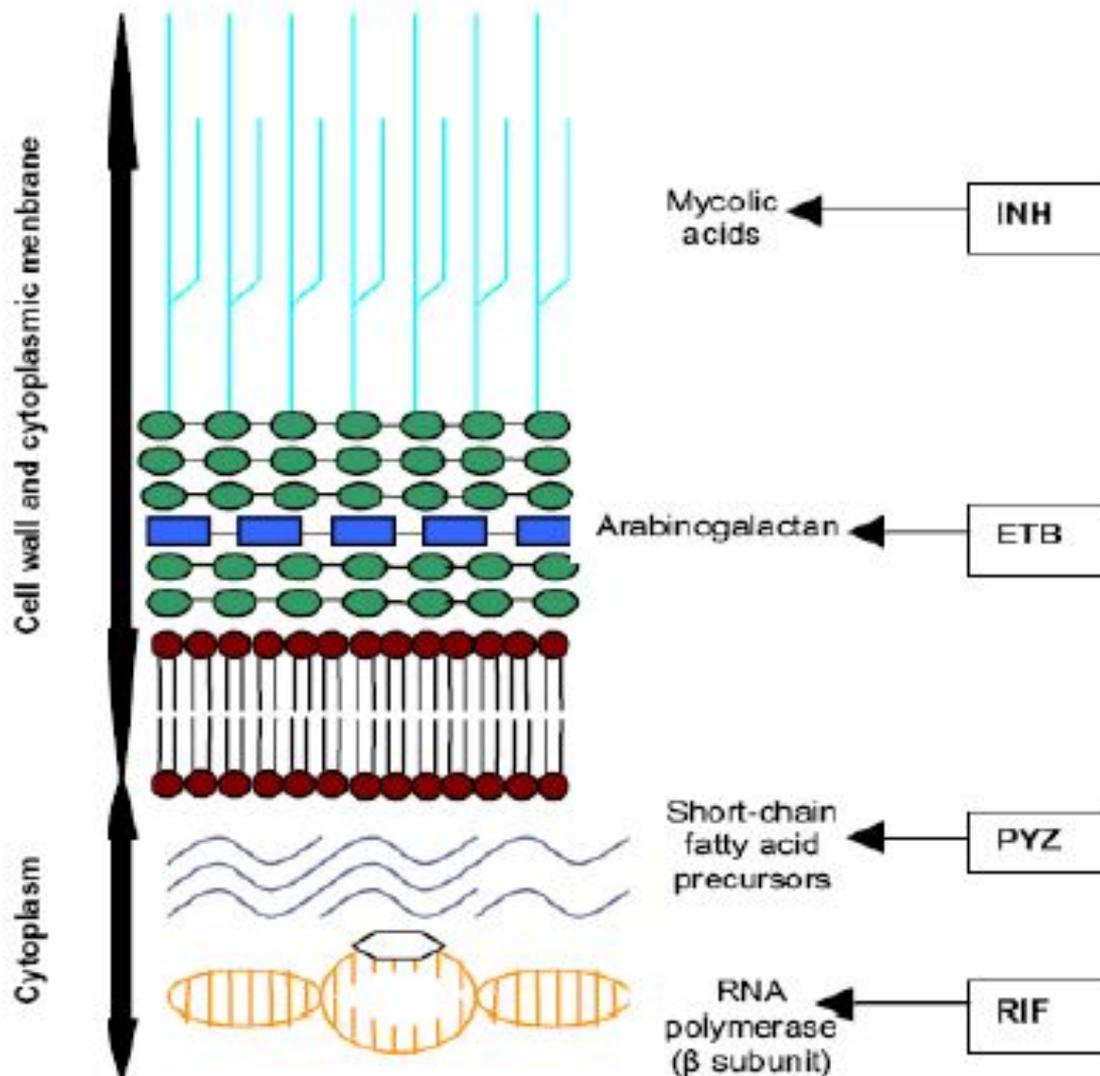
Линезолид

\* Доказательная база применения  
отсутствует.

## Препараты 2-го ряда

- Канамицин (амикацин)
- Этионамид  
(протионамид)
- Циклосерин
- Капреомицин
- Аминосалициловая  
кислота
- Фторхинолоны

# Мишени, на которые направлено действие ПТП



- Изониазид

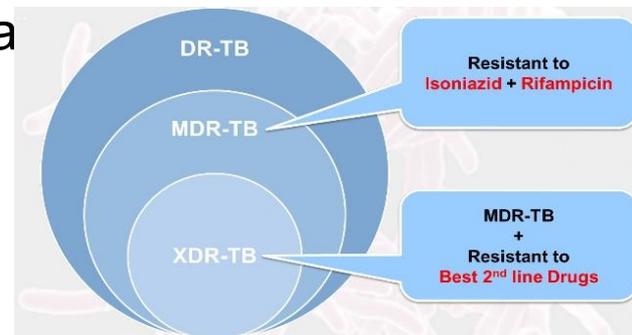
- Этамбутол

- Пиразинамид

- Рифампицин

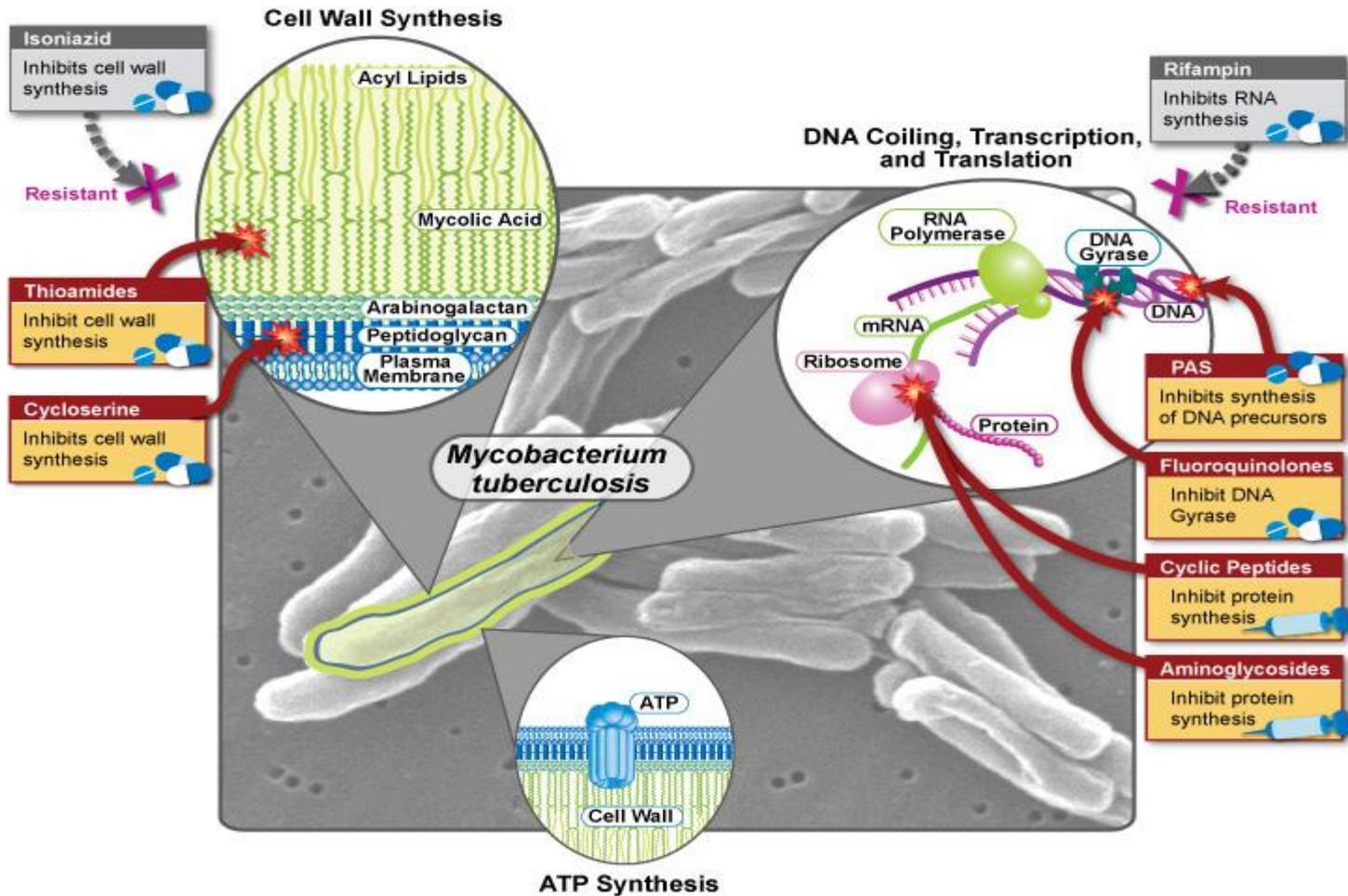
- ❑ Изониазид и пиразинамид убивают микобактерии только в фазе размножения.
- ❑ Если же микобактерии находятся в фазе низкой метаболической активности (т.е. бактериальный рост почти полностью приостановлен и бактерии можно назвать «дремлющими»), бактерицидные препараты на них не действуют.
- ❑ Такое состояние принято называть дормантным, а микроорганизмы - персистерами.
- ❑ Персистеры не чувствительны к химиопрепаратам, т.е. ведут себя как устойчивые микроорганизмы.

- Туберкулез с **множественной лекарственной устойчивостью** (MDR TB Multidrug-resistant TB – англ., **МЛУ-ТБ** – рус.) – это форма туберкулеза, которая не поддается стандартному лечению на протяжении 6 месяцев препаратами «первой линии» (например, двумя наиболее важными противотуберкулезными лекарствами: ***изониазидом и рифампицином***). Лечение МЛУ-ТБ может продолжаться до 2-х лет с использованием гораздо более токсичных и более дорогих препара

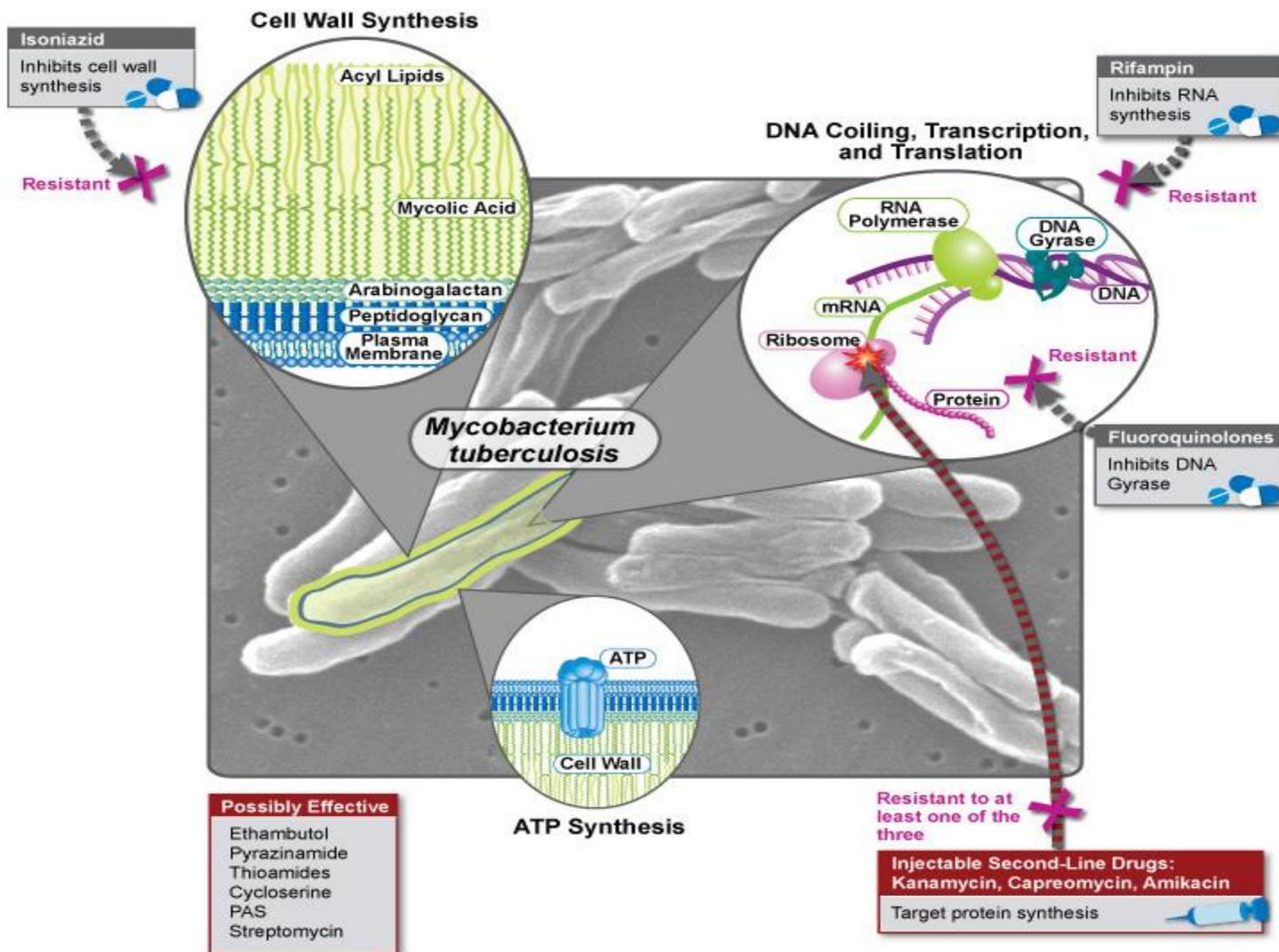


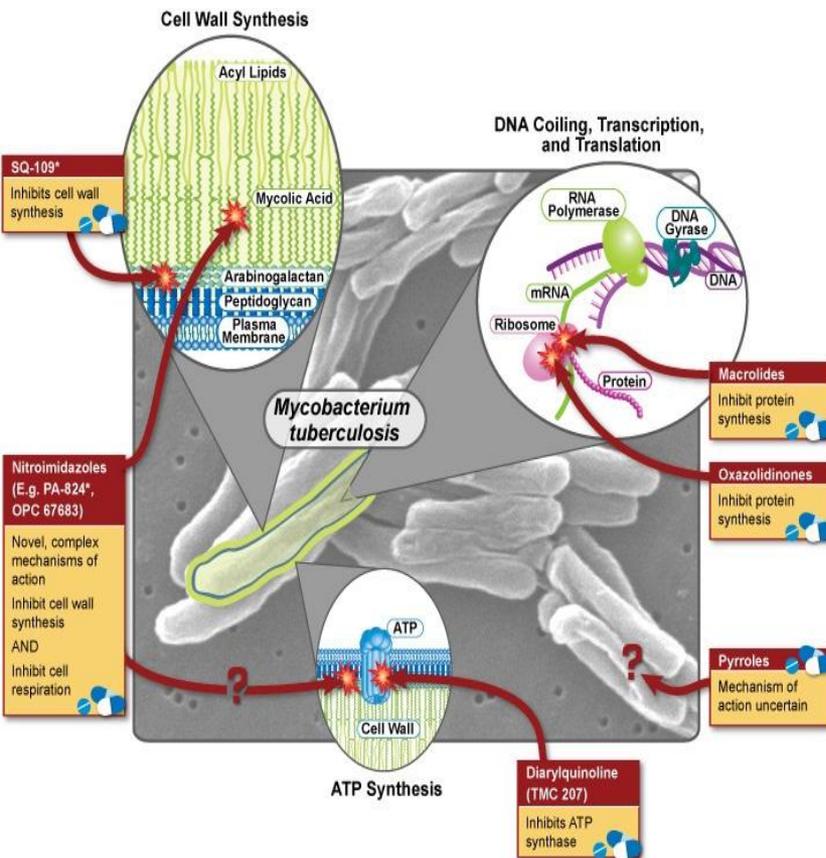
- Туберкулез с **широкой лекарственной устойчивостью** (XDR TB Extensively drug resistant TB – англ., **ШЛУ-ТБ** – рус.) – это форма туберкулеза, вызванная бактериями, которые в дополнение к лекарственной устойчивости, свойственной для МЛУ-ТБ устойчивы ко ***всем фторхинолонам*** и, как минимум, ***к одному из трех*** инъекционных лекарств второй линии (***капреомицину, канамицину или амикацину***). Такое определение ШЛУ-ТБ было принято Глобальной целевой группой ВОЗ по ШЛУ-ТБ в октябре 2006 года.

# Препараты выбора при лечении МБТ, устойчивой к изониазиду и рифампицину



# Препараты для МБТ с множественной лекарственной устойчивостью



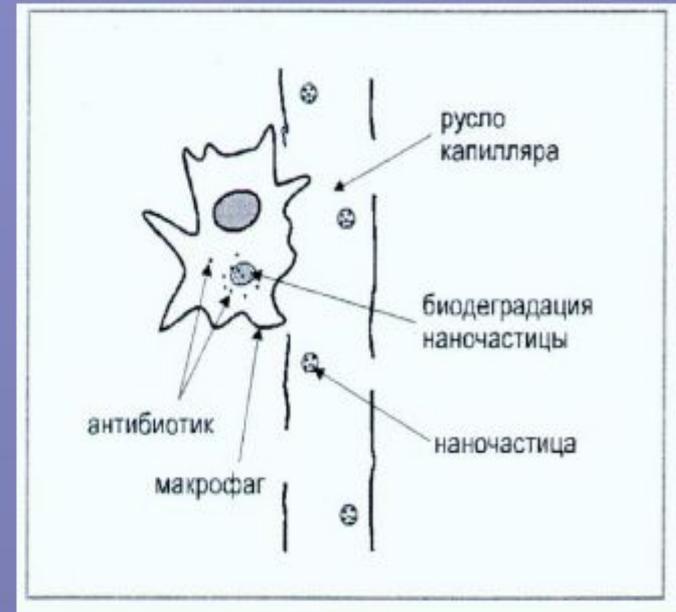
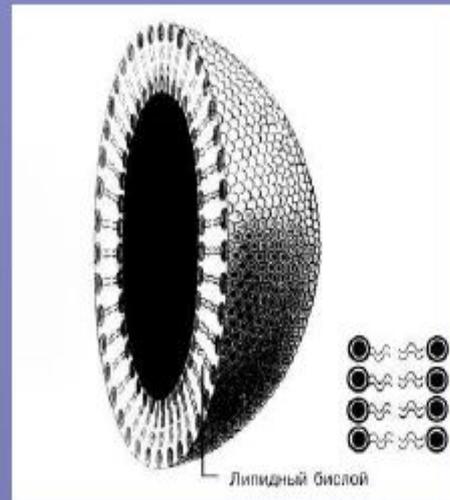


## ПТП нового поколения ИХ МИШЕНИ

Препарат (класс соединений)	Механизм действия	Мишень	Механизм образования устойчивости
PA824 (нитроимидазооксазины)	Подавление синтеза белка и липидов клеточной стенки, в т.ч. в анаэробных условиях; образование интермедиатов, высвобождающих активные оксиды азота	F <sub>420</sub> -зависимая нитратредуктаза	Мутация генов rv0407, rv3547, rv3261, rv3262
OPS67683 (нитроимидазооксазины)	Подавление синтеза липидов клеточной стенки и биосинтеза миколовых кислот	Нитратредуктаза	Мутация гена rv3547
TMC207 (R207910) (диарилхинолины)	Подавление синтеза АТФ	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> АТФ-синтаза	Мутация гена atpE
SQ109 (диэтиламины)	Подавление синтеза клеточной стенки	Н/д	Н/д
LL3858 (пирролы)	Н/д	Н/д	Н/д
Линезолид (оксазолидиноны)	Подавление синтеза белка	Рибосомы	Н/д
BTZ043 (нитробензотиазиноны)	Подавление синтеза арабинана	DprE1-субъединица фермента декапренил-фосфорил-β-O-рибозы 2'-эпимеразы	Мутация гена rv3790
Тритразин-Н (азолотетразины)	Ингибирование серин-треониновых протеинкиназ	Протеинкиназы PknA и PknB	Н/д

# Системы доставки противотуберкулезных препаратов

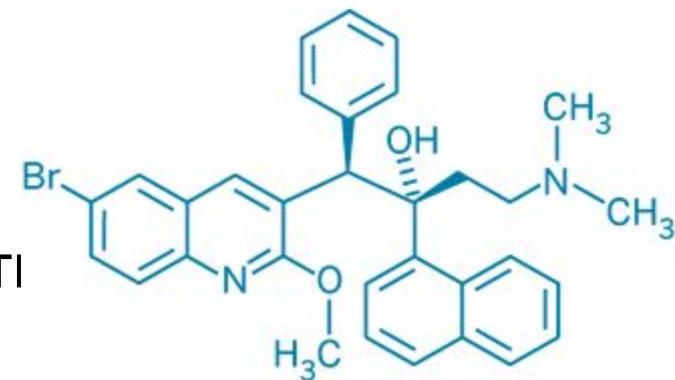
## 1. Липосомы



2. Микросферы (микрочастицы, наночастицы) на основе полимеров

3. Полимерные имплантанты

- **Бедаквилин** – представитель класса диарилхинолинов, является новым препаратом, применяемым в лечении туберкулеза.
- Бактерицидное действие бедаквилаина обусловлено специфическим ингибированием протонной помпы АТФ-синтазы микобактерий (аденозин 5'-трифосфат-синтазы) — фермента, играющего основную роль в процессе клеточного дыхания *Mycobacterium tuberculosis*
- Не имеет перекрестной резистентности с другими противотуберкулезными препаратами в связи с уникальным механизмом действия



**Bedaquiline**

- *Деламанид* – это первый препарат нового класса нитро-дигидро-имиксооксазолов.
- Механизм действия – подавление синтеза компонентов клеточной стенки.
- Кроме того, один из продуктов метаболизма деламанида, оксид азота, тоже обладает цитотоксическим действием против микобактерий.



# лекарственных препаратов на основе модуляторов фармакологической активности

## НЕЭФФЕКТИВНАЯ АНТИБИОТИКОТЕРАПИЯ

Внутриклеточное  
паразитирование  
микобактерий  
туберкулеза

## АНТИБИОТИК+МРА

Удаление  
микобактерий  
туберкулеза  
из макрофага

- ❑ В качестве средств повышения терапевтической эффективности химических молекул с известным биологическим действием и фармакологической активностью используются **модуляторы фармакологической активности (modulators of pharmacological activity, MPA)**
- ❑ Глутоксим® – российский инновационный препарат, единственный зарегистрированный представитель нового класса лекарственных средств (IDR, innate defense regulators – регуляторы защитных систем организма).
- ❑ Глутоксим® является **средством выбора для потенцирования антибактериального эффекта противотуберкулезных препаратов с целью преодоления лекарственной устойчивости Mycobacterium tuberculosis, уменьшения токсических осложнений противотуберкулезной химиотерапии и стимуляции репаративных процессов.**



# Специфическая профилактика

- ❑ Вакцина БЦЖ (BCG – бацилла Кальметта и Герена) – содержит живые авирулентные микобактерии, полученные из *M.bovis* путем многолетних пассажей на средах, содержащих желчь
- ❑ Поствакцинальный иммунитет связан с формированием ГЗТ (гиперчувствительности замедленного типа)



Неблагоприятные последствия прививки БЦЖ принято называть БЦЖ-инфекцией. Неблагоприятные последствия прививки БЦЖ принято называть БЦЖ-инфекцией или БЦЖит (BCG disease, BCGitis): Осложнения, возникающие при вакцинации БЦЖ (по классификации, предложенной Международным союзом по борьбе с туберкулёзом ВОЗ в 1984 г.):

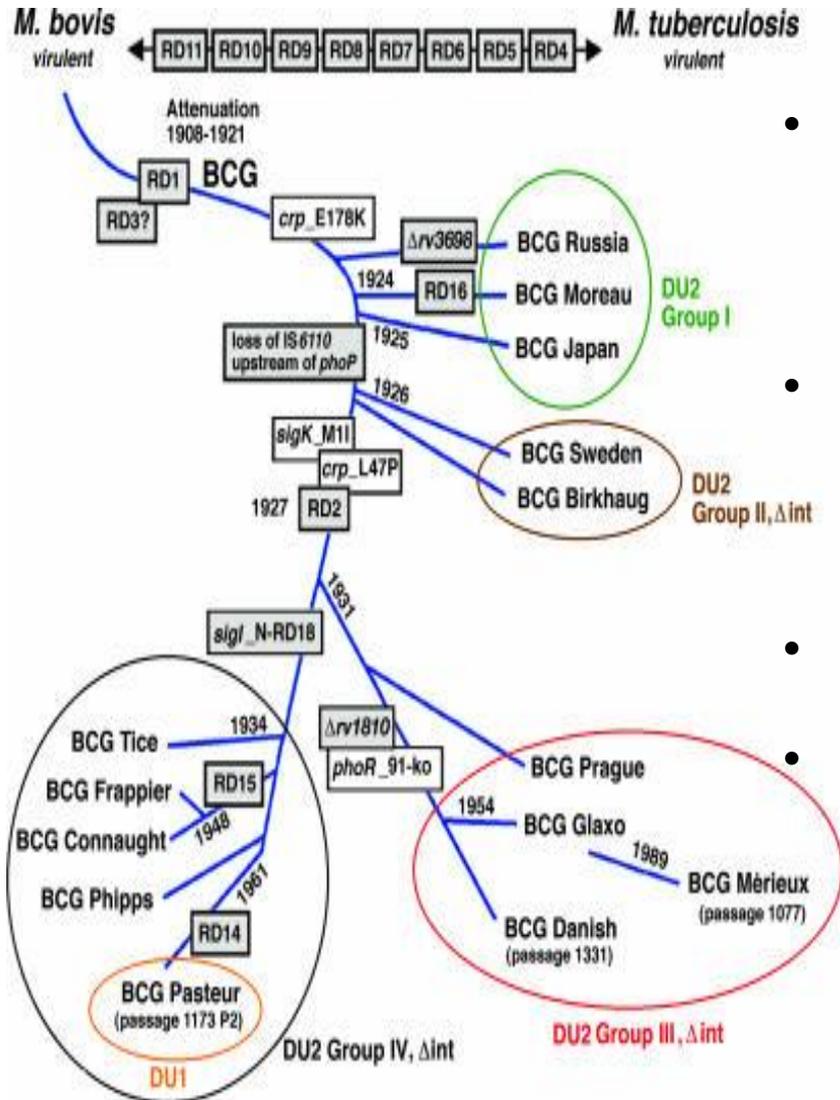
Категория 1: локальные поражения (подкожные инфильтраты, холодные абсцессы, язвы) и регионарные лимфадениты.

Категория 2: персистирующая и диссеминированная БЦЖ-инфекция без летального исхода (волчанка, оститы, остеомиелит).

Категория 3: диссеминированная БЦЖ-инфекция, генерализованное поражение с летальным исходом, отмечаемое при врождённом иммунодефиците.

Категория 4: пост-БЦЖ-синдром (узловатая эритема, кольцевидная гранулёма,

# Штаммы БЦЖ



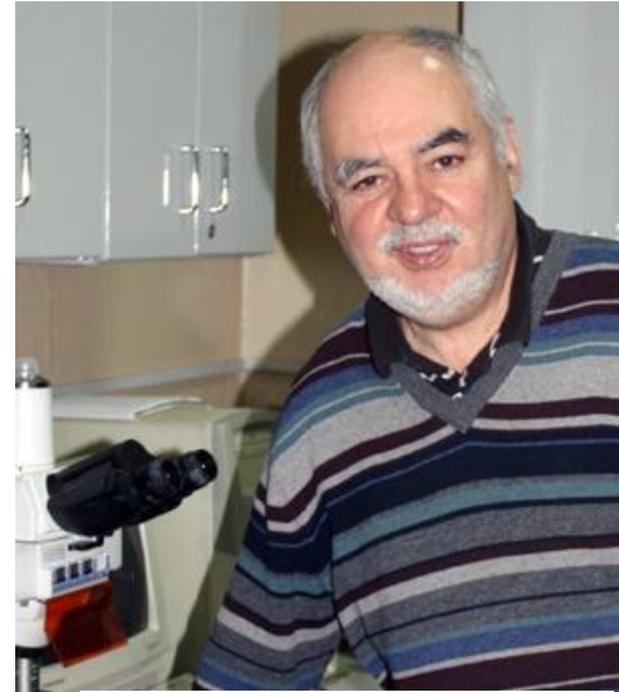
- Все существующие ныне вакцинные штаммы имеют происхождение от первоначального изолята *M. bovis*, который Кальметт и Герен пассировали через многочисленные циклы в течение 13-летнего периода 1909-1921 годов.
- В результате последующих циклов в различных лабораторных условиях были получены разнообразные новые штаммы БЦЖ с фенотипическими и генотипическими различиями.
- обнаружены значительные антигенные различия между разными штаммами БЦЖ.
- В настоящее время установлено, что в процессе культивирования штамма БЦЖ в разных лабораториях возникли новые вакцинные штаммы, отличающиеся от исходного делециями, инсерциями и tandemными дупликациями.

# Новые вакцины, находящиеся на различных стадиях разработки

1. Вакцинные кандидаты *на основе живых модифицированных штаммов M. bovis БЦЖ* (Рекомбинантный штамм БЦЖ Prague, экспрессирующий N-терминальную область антигена 85B и листериолизин; с делецией гена, кодирующего уреазу; Рекомбинантный штамм БЦЖ, экспрессирующий перфринголизин и антигены 85A, 85B, Rv3407)
2. Вакцинные кандидаты *на основе живых аттенуированных штаммов M. Tuberculosis* (Живая вакцина на основе аттенуированного штамма M. tuberculosis с инактивацией генов phoP и fadD26; Нерепликативный ауксотрофный по лизину и пантотенату штамм M. tuberculosis, аттенуированный за счет удаления гена secA2)
3. Вакцинные кандидаты *на основе рекомбинантных белков* с адъювантом
4. Вакцинные кандидаты *на основе рекомбинантных вирусных векторов* (Модифицированный вирус Vaccinia штамм Ankara, экспрессирующий антиген 85A)

# Специфическая профилактика. Новый подход

- ❑ Создана новая противотуберкулезная живая вакцина на основе штаммов *M.tuberculosis* с deletированными генами *rpf* .
- ❑ Rpf(Resuscitation promoting factor), что в переводе на русский означает „фактор, ускоряющий оживление“ или просто — фактор роста. Было обнаружено: Rpf стимулирует рост и живых, не „спящих“ бактерий, что позволило говорить о нём как о первом бактериальном факторе роста
- ❑ Rpf действительно стимулирует рост микобактерий. Кроме того, оказалось, что антитела, образуемые против фактора роста, практически останавливают рост бактерий туберкулёза.
- ❑ Нокаут не менее трёх RPF генов из пяти привёл к снижению вирулентности штаммов *M.tuberculosis* на животных. Кроме того, обнаружилась неспособность оживления этих штаммов из покоящегося состояния *in vitro*. Инактивация четырех генов RPF привела к практически полной потере вирулентности таких штаммов.



# Лабораторная диагностика

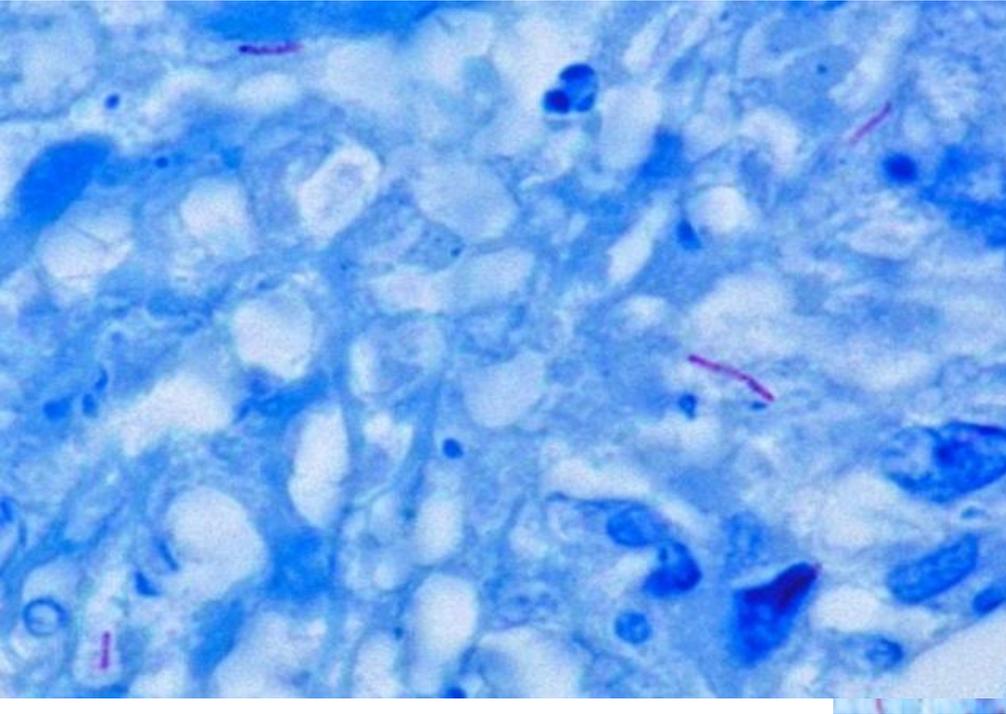


**Клинический материал:** гной, мокрота, кровь, бронхиальный экссудат, спинномозговая жидкость, плевральная жидкость, моча и др.

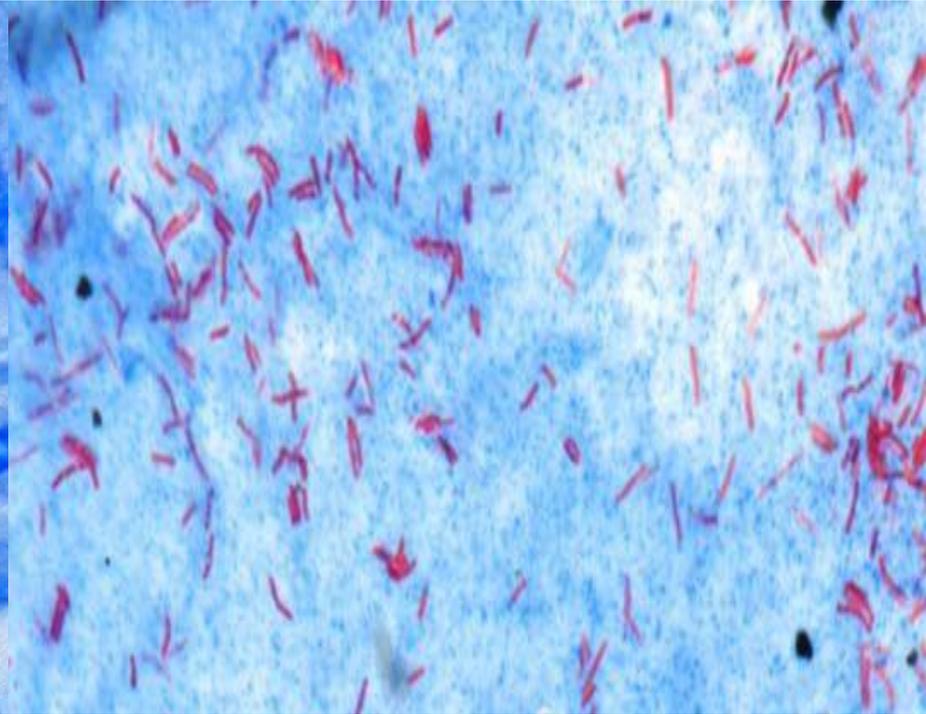
## **Методы:**

- 1. Бактериоскопический :** прямая окраска мазка мокроты по методу Циля-Нильсена или мазка после обогащения (концентрирования методами флотации или гомогенизации)

**Прямая окраска мазка мокроты по Цилю-Нильсену**

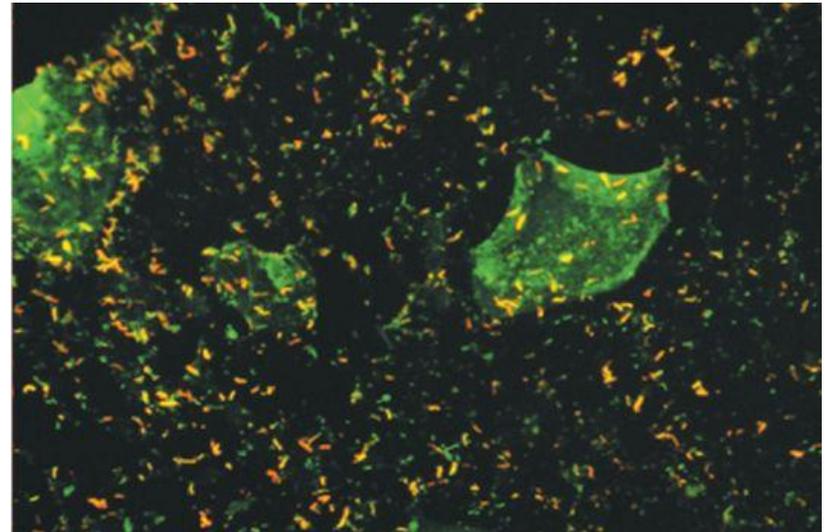


**Мазок из флотационного слоя по Цилю-Нильсену**



# Лабораторная диагностика

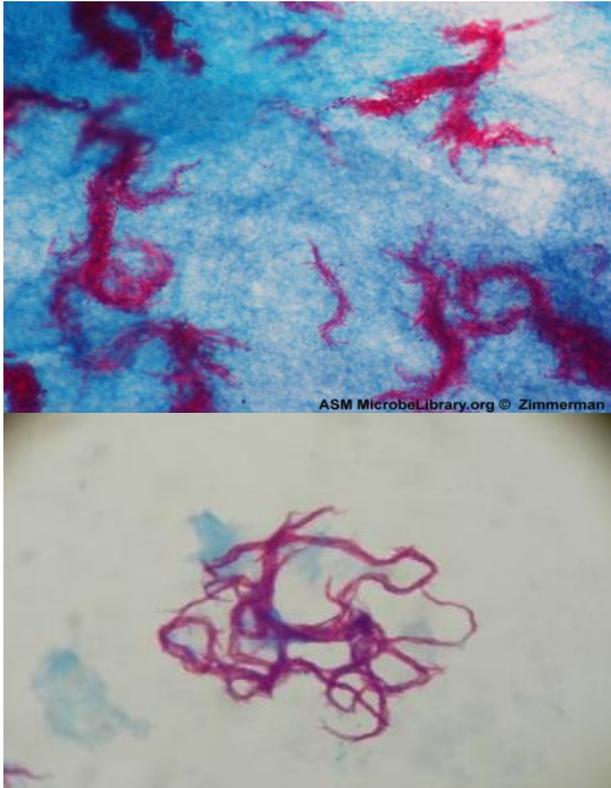
## 2. Люминесцентный метод (окраска родамин-ауромином));



Разработан метод наноиммунофлюоресценции, предназначенный для быстрого выявления туберкулезных бактерий в патологическом материале и культурах. Его проводят с применением силиконовых наночастиц с ковалентно иммобилизованным протеином А. По чувствительности он значительно превосходит флюоресцентный метод диагностики туберкулеза.

# Лабораторная диагностика

3. **Метод микрокультур Прайса** (густой мазок мокроты на стекле обрабатывают кислотой, не фиксируют и помещают в цитратную кровь; через 5-7 дней окрашивают по Цилю-Нильсену; при наличии корд-фактора видны слипшиеся в жгуты микобактерии)



# Лабораторная диагностика

4. **Бактериологический (культуральный) метод** используется для проверки эффективности лечения (2-8 недель необходимы для роста колоний на среде Левенштейна-Йенсена и еще некоторое время для оценки эффекта препаратов, вводимых в среду роста);
5. **Серологические методы** (ИФА, радиоиммунный и др.);
6. **Биологический метод** (заражение морских свинок и кролика с последующим выделением чистой культуры возбудителя);
7. **Туберкулиновая проба Манту** ;
8. **Молекулярно-генетические методы** (ПЦР)

# Ускоренные методы выявления возбудителя

Культуральные

Культивирование на жидких питательных средах с автоматической регистрацией роста культуры

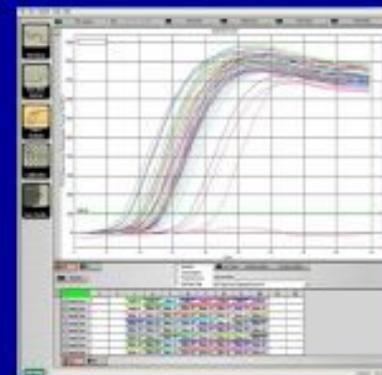
**Bactec MGIT 960 7-14 дней**



Молекулярно-генетические

Выявление ДНК возбудителя в диагностическом материале

**ПЦР 1-2 дня**



## 4. Бактериологический (культуральный) метод

**I этап:** посев обогащенного исследуемого материала, предварительно обработанного кислотой и нейтрализованного щелочью на питательные среды

- среда Сотона
- среда Левенштейна-Йенсена

**II этап:** изучение выросших колоний по культуральным, морфологическим и тинкториальным свойствам

**III этап:**

**A.** идентификация чистой культуры по биохимическим свойствам

- Тест на каталазную активность (позволяет отличить *M. tuberculosis* и *M. bovis* от других микобактерий)
- Ниациновая проба (ниациновый тест, проба Кона) (позволяет отличить *M. tuberculosis* от *M. bovis*)
- Восстановление нитратов в нитриты (позволяет отличить *M. tuberculosis* от *M. bovis*)

**B.** ускоренные методы идентификации см. следующий слайд

- Традиционная микробиологическая диагностика туберкулеза с помощью посева на плотные яичные среды (типа Левенштейна-Йенсена) дает визуальный результат через 6-8 недель, а с учетом определения лекарственной резистентности микобактерий туберкулеза - через 10-12 недель при наличии в посеянном материале не менее 100 жизнеспособных клеток.
- В настоящее время разработаны полностью автоматизированные системы для выявления микобактерий на жидких средах, что дает возможность получить результаты, начиная с 4 дня после поступления диагностического материала. Среднее время детекции микобактерий на анализаторе ВАСТЕС 960 составляет 10,7 суток, а на МВ/ВасТ - 18,7 суток



**Видовая идентификация возбудителя,  
выросшего на средах  
(референс-лаборатория)**

**МИКРОСКОПИЯ**

**КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫЕ ПАЛОЧКИ**

**Микобактерии туберкулезного  
комплекса  
(МТК)**

**Нетуберкулезные микобактерии  
(НТМ)**

**Быстрая дифференциация  
МТК от НТМ:**

- ПЦР IS6110
- ТВс-ID (Becton Dickinson)

**Идентификация НТМ до вида:**

- технология ДНК-стрипов (Hain-test)
- масс-спектрометрия

## 5. Серологические методы

- ❑ Относительно широкие возможности для скрининга туберкулёза предоставляют методы серодиагностики, целью которых 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.



## 5. Серологические методы (продолжение)



- ❑ Специфичность определения антител и антигенов *M.tuberculosis* зависит от используемых при иммунном анализе диагностикумов.
- ❑ Последнее время научные исследования нацелены на изучение следующих антигенов, связанных с туберкулезом:
  - *Антиген 38 Kilodaltons;*
  - *Антиген 5 (Daniel);*
  - *Антиген A60(Coccito);*
  - *Антиген 88 Kilodaltons;*
  - *липоарабиноманнан;*
  - *Мультиантигеновый тест*
- ❑ 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.

## 5. Серологические методы. Тесты на содержание гамма-интерферона в образцах цельной крови

- ❑ - являются тестами, выявляющим клеточный иммунный ответ на пептидные антигены, симулирующие микобактериальные протеины.
- ❑ Эти протеины ESAT-6, CFP-10 и TB7.7(p4) отсутствуют во всех штаммах BCG и в большинстве нетуберкулёзных микобактерий
- ❑ В крови индивидуумов, инфицированных сложными организмами *M.tuberculosis*, как правило, имеются лимфоциты, которые распознают те или иные микобактериальные антигены.
  - Этот процесс распознавания влечёт за собой генерирование и секрецию цитокина, гамма-интерферона.
  - Выявление и последующий количественный анализ гамма-интерферона является основой данного теста.
- ❑ Тест способен диагностировать как скрытое заражение туберкулёзом, так и активную фазу заболевания.



# Иммунохроматографические тесты

## Набор реагентов «ИХА-ТБ-ФАКТОР»

для иммунохроматографического выявления антител к Микобактерии туберкулезис в сыворотке (плазме) или цельной крови

Набор реагентов предназначен для *in vitro* одноэтапного быстрого качественного определения антител к Микобактерии туберкулезис (*Mycobacterium tuberculosis*) в сыворотке, плазме или цельной человека методом иммунохроматографического анализа.

В состав набора входят следующие компоненты:

- планшет индикаторный, упакованный в индивидуальную вакуумную упаковку из фольги алюминиевой с осушителем;
- реагент для разведения образца;
- пипетка для внесения образца сыворотки или плазмы крови;
- скарификатор одноразовый;
- салфетка асептическая.



## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ



Положительный результат  
(антитела к Микобактерии туберкулезис выявлены)



Отрицательный результат  
(антитела к Микобактерии туберкулезис не выявлены)

Несколько лет назад был запатентован новый иммунологический метод выявления туберкулеза «Antibodies from lymphocyte secretion», также называемый «Antibody in lymphocyte supernatant» (ALS), основанный на детекции с помощью ИФА антимикобактериальных антител, секретируемых активированными циркулирующими В-лимфоцитами и плазматическими клетками. По мнению автора патента, R. Raqib, антитело-продуцирующие клетки - короткоживущие и обнаруживаются в крови только в период активного заболевания, поэтому данный метод выявляет только активный туберкулез. Чувствительность ИФА с образцами ALS, детектирующими антитела к различным антигенам *M. tuberculosis*, достигает в некоторых случаях 93% при высокой специфичности. Данный метод имеет перспективы для использования в серодиагностике туберкулеза, в том числе у детей [244, 245, 248, 254].

# 7. 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.
- ❑ Используют *два вида очищенного туберкулина*:
  - ❑ Аллерген туберкулезный очищенный жидкий (очищенный туберкулин в стандартном разведении) - готовые к употреблению растворы туберкулина. Выпуск готовых к употреблению разведений ППД-Л (модификация Линниковой) позволяет использовать в стране для массовой туберкулинодиагностики стандартный по активности препарат и избежать ошибок при разведении туберкулина на местах его применения.
  - ❑ Аллерген туберкулезный очищенный сухой (сухой очищенный туберкулин) - это растворенный в фосфатном буфере с сахарозой лиофильно высушенный очищенный туберкулин. Сухой очищенный туберкулин используют для диагностики туберкулеза и туберкулинотерапии только в противотуберкулезных диспансерах и стационарах.
- ❑ Современный препарат туберкулина, помимо самого туберкулина, содержит соли фосфатного буферного раствора, натрия хлорид, стабилизатор Твин-80, и фенол в качестве консерванта.
- ❑ *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 очаговых форм туберкулеза у детей и подростков

# ДИАСКИНТЕСТ (*DIASKINTEST*)

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



## 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



Открытие МБТ  
Р. Кохом



Открытие Р. Кохом  
туберкулина



Внедрение метода  
тубердиагностики  
К. Пирке



Синтез  
очищенного  
туберкулина



2008г.  
Создание  
Диаскинтеста®  
в НИИ Молекулярной  
медицины ММА  
им. И. М. Сеченова



1965г.  
Внедрение  
пробы Манту  
в СССР

# 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.*

## 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  $\geq 15$  мм или везикуло-некротических изменениях



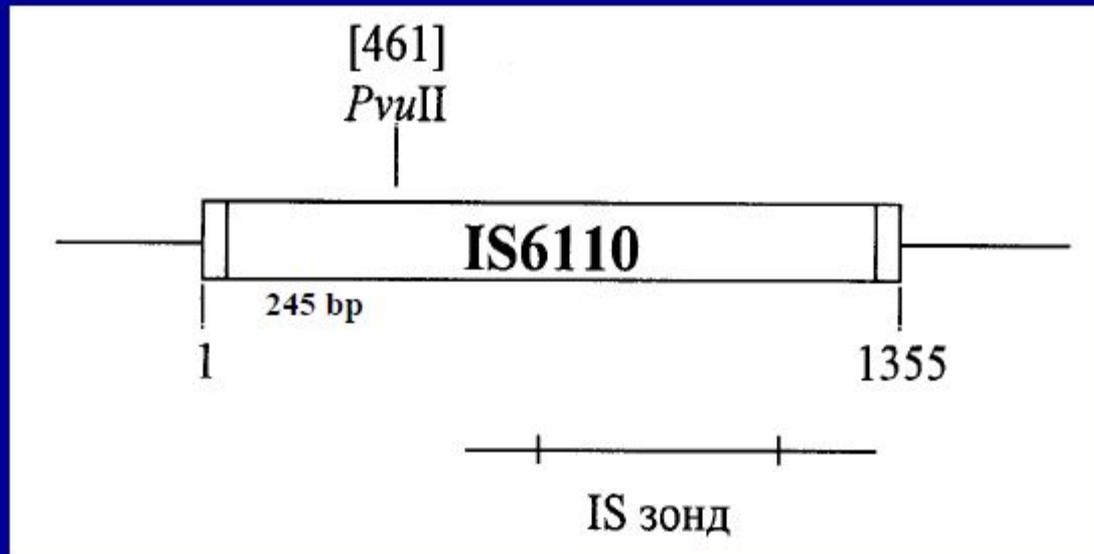
- Отрицательный (туберкулеза нет) – в месте введения препарата нет ни покраснения, ни уплотнения, ни отека.
- Сомнительный – есть гиперемия (покраснение) любого размера, но уплотнения нет либо оно не больше 2–4 мм.
- Положительный (нужны дополнительные обследования на туберкулез) – покраснение и уплотнение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

## 8. Молекулярно-генетические методы

- Серьезную проблему представляет в связи со сложностью диагностики и лечения туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) и ВИЧ-ассоциированный туберкулез
- К настоящему времени имеется информация об 11-ти генах, вовлеченных в формирование устойчивости микобактерий к основным противотуберкулезным препаратам. Такая устойчивость обусловлена возникновением мутаций в генах, продукты которых являются мишенями для лекарств или участвуют в их активации.
- Например, к изониазиду – гены *katG*, *inhA*, *kasA*, к рифампицину – *rpoB*, к стрептомицину – *rpsL* и *16SpPHK*, к этамбутолу – *emb1*, к фторхинолонам – *gyrA* и т.д.
- Молекулярно-генетические методы диагностики основаны на ПЦР и гибридизации с ДНК-зондами
- Наиболее перспективным направлением является технология биочипов

# IS6110

обнаружена только у микобактерий  
туберкулезного комплекса



- IS6110 – инсерционная последовательность
- Наиболее совершенные схемы генотипирования микобактерий основаны на выявлении геномного полиморфизма, обусловленного элементом IS6110.

# Современные методы определения лекарственной чувствительности микобактерий

МТК

Культуральные

Vacotec MGIT 960  
ПТП 1-го и 2-го ряда

**7-14 дней**  
(после получения культуры)

Молекулярно-генетические  
**(1-3 дня)**

- Мультиплексная ПЦР (Синтол)  
RIF, INH, Fq
- ТБ-биочип, ТБ-биочип-2  
RIF, INH, Fq
- ДНК-стрипы (Hain Lifescience)
  - GenoType® MTBDRplus  
RIF, INH
  - GenoType® MTBDRsl  
фторхинолоны  
аминогликозиды/циклические пептиды  
этамбутол
- -Xpert MTB/RIF (Cepheid Inc.)

НТМ

Культуральные

Sensititre TREK Diag  
(Magellan Biosciences)

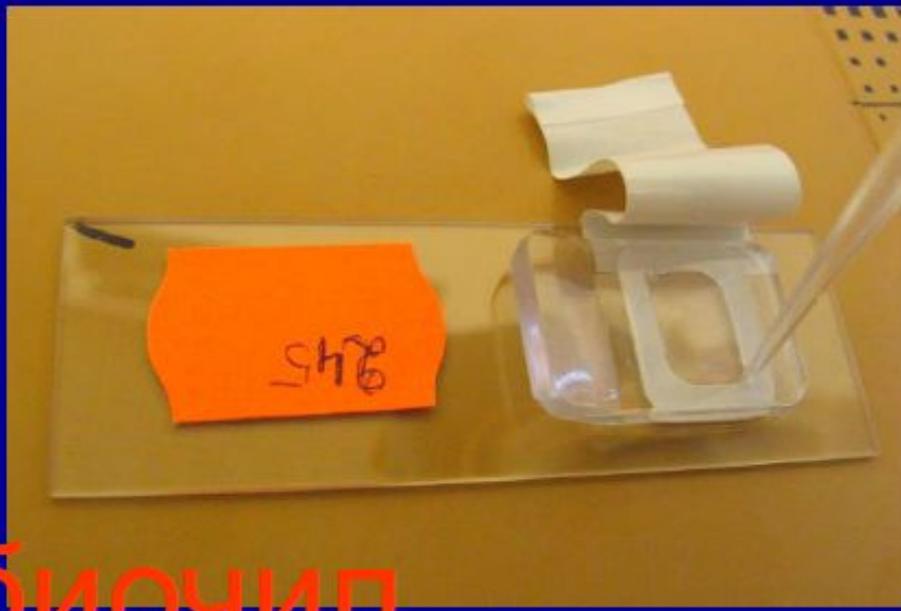


# Тест-система «ТБ-Биочип»

- позволяет обнаруживать не менее 95% рифампицин- и свыше 80% изониазид-устойчивых штаммов возбудителя туберкулеза менее, чем за сутки.
- предназначена для определения точного типа мутации, приводящей к устойчивости возбудителя туберкулеза к рифампицину или изониазиду.

## **Порядок проведения анализа с использованием тест-системы «ТБ-БИОЧИП»**

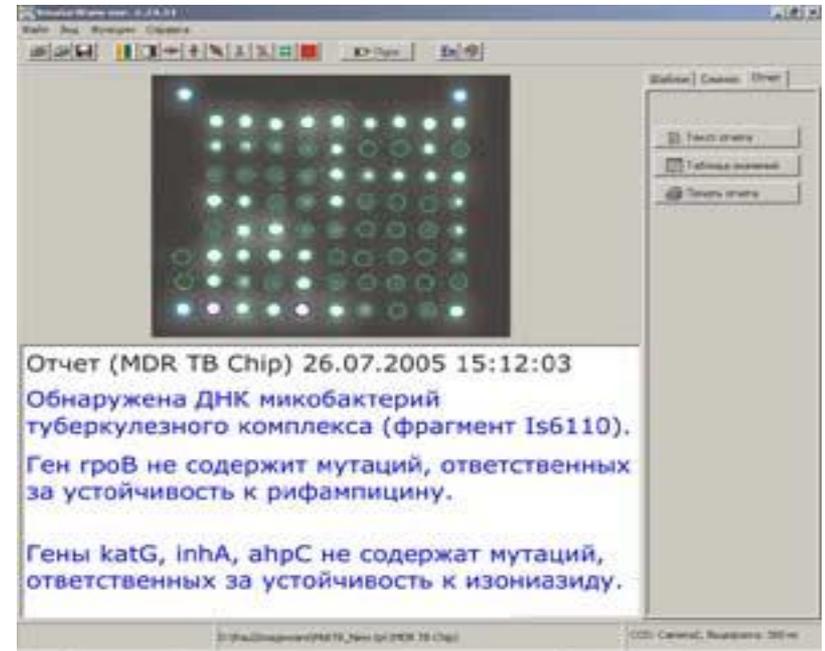
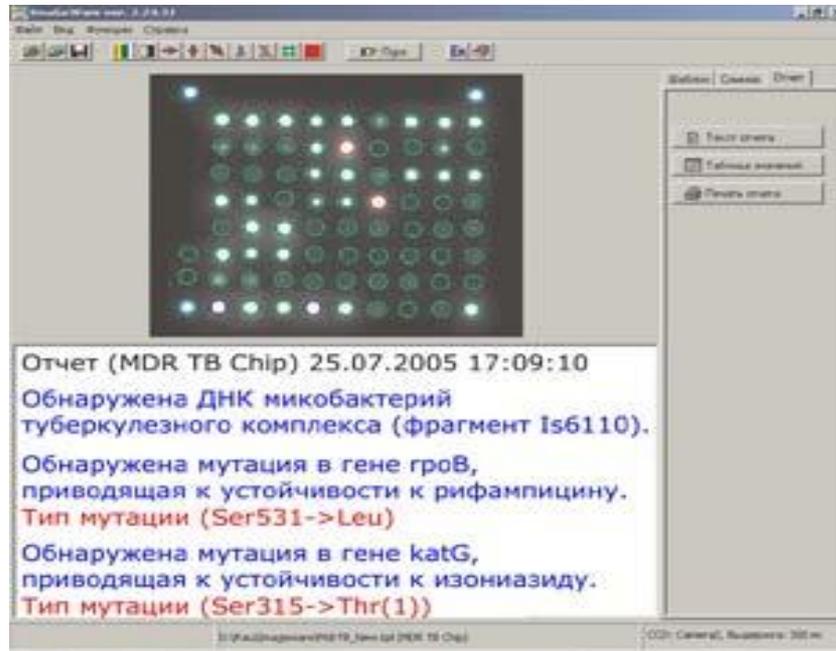
- Взятие пробы диагностического материала.
- Разрушение клеток возбудителей туберкулеза в мокроте с высвобождением ДНК.
- Проведение реакции ПЦР - размножение необходимых для генетического анализа фрагментов ДНК, определяющих устойчивость к противотуберкулезным препаратам.
- Гибридизация - взаимодействие фрагментов ДНК микобактерий, приводящих к МЛУ, с зондами на биочипе.
- Анализ свечения ячеек биочипа с помощью прибора анализатора биочипов.



# ТБ-биочип



# Отчеты в специализированной программе ImageWare



Комментарий для неспециалиста:

1. обнаружен туберкулез
2. выявлена устойчивость к препаратам первого ряда
3. лечится резервными препаратами

Комментарий для неспециалиста:

1. обнаружена обычная форма туберкулеза
2. лечится стандартными препаратами

# Современные технологии микробиологической диагностики туберкулеза



Методы	Преимущества	Недостатки
Клинические признаки	Быстрая диагностика	Неспецифичный, нерешающий
Кожный тест	Простой в исполнении, не требует оборудования	Требует повторного визита; на результат влияют: БЦЖ, ВИЧ, контакт с НМБ
Рентгенография	Визуальный, определяет локализацию, протяженность процесса	Неспецифичный, облучение пациентов
Бактериоскопия	Низкая стоимость, быстрый	Низкая чувствительность
Культуральное исследование	Специфичный, позволяет определять устойчивость к антибиотикам	Трудности в сборе материала, длительный (4-8 недель), не всегда возможен
ВАСТЕС	Специфичный	Длительный (2-3 недели), дорого-стоящий, не всегда применим
ПЦР	Относительно быстрый (5 часов), высокоспецифичный	Относительно дорог, необходимы специалисты, оборудование, де-тектирует латентный туберкулез

Методы	Преимущества	Недостатки
IGRA	Быстрый, воспроизводимый	Необходимо оборудование, специалисты, дорогостоящий
Иммуно-гистохимический	Высококчувствительный, исследование различных тканей	Требуется подготовка биопсийного материала, подтверждение результатов другими методами
Биосенсоры	Быстрый (1-3 часа), чувствительный	Дорог для ежедневного использования
ИФА	Быстрый (2 часа), воспроизводимый	Необходимо специальное оборудование
ИХ тесты	Очень быстрый (10 минут), воспроизводимый, не требует оборудования, специального обучения методу	Нет количественной характеристики, менее чувствительный, по сравнению с ИФА

Примечания: IGRA – interferon gamma release assays - методы детекции высвобождения гамма-интерферона ( $\gamma$ -ИНФ) лимфоцитами.