



Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского

Микробиология дифтерии
Микробиология туберкулеза

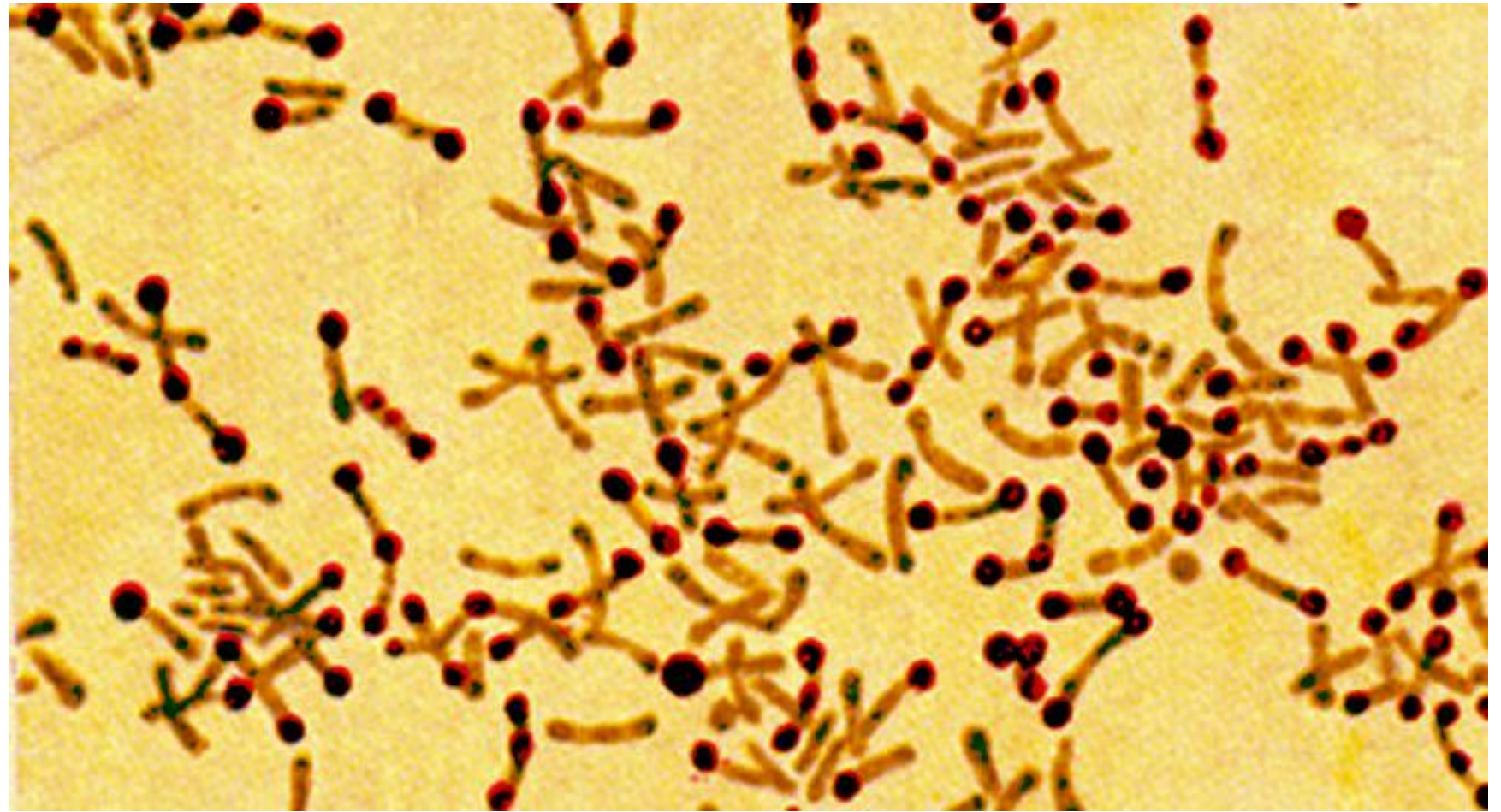
Кафедра микробиологии,
вирусологии и иммунологии

• МИКРОБИОЛОГИЯ ДИФТЕРИИ

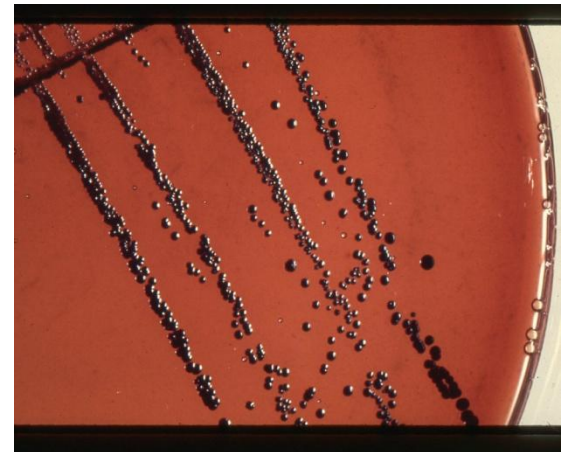
- **Дифтерия** — это острая, антропонозная, воздушно-капельная, токсинемическая инфекция, которая характеризуется развитием воспалительных изменений слизистых оболочек ротоглотки и верхних дыхательных путей, сопровождающихся образованием плотно спаянных с подлежащими тканями фибриновых пленок, на фоне симптомов специфической интоксикации макроорганизма.
- **Возбудитель** дифтерии относится к роду *Corynebacterium*, виду *C. diphtheriae*.

Морфологические — тонкие, слегка изогнутые или прямые грамположительные палочки. Утолщены на концах за счет наличия зерен волютина на одном или обоих полюсах клетки, что придает им вид булавы или булавки.

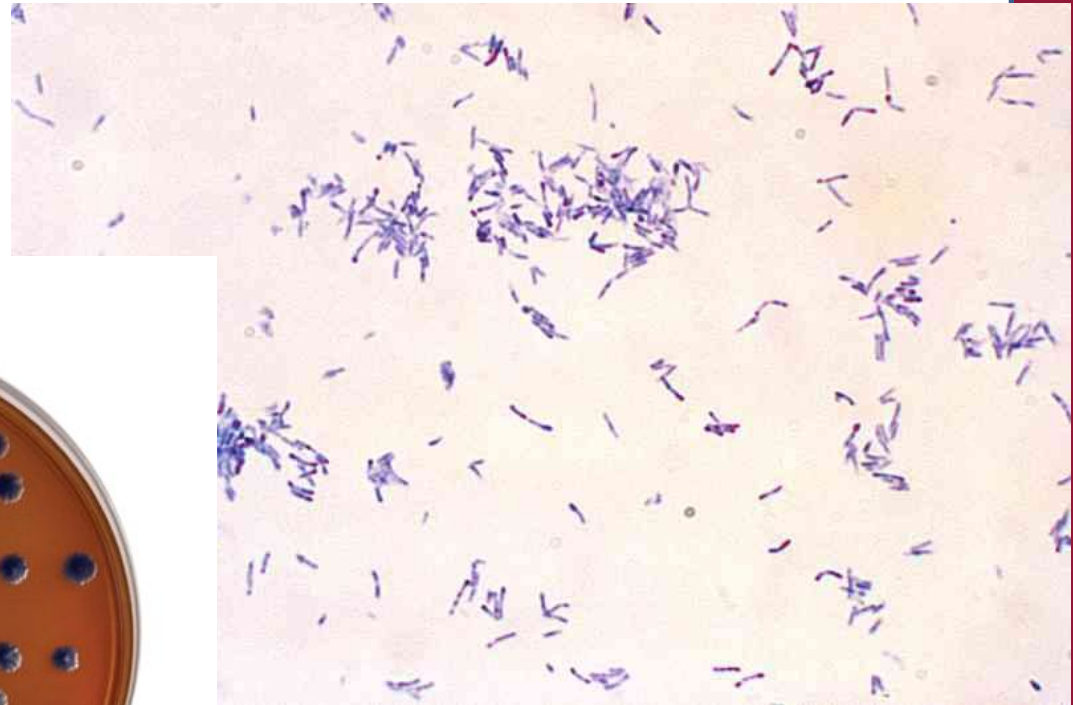
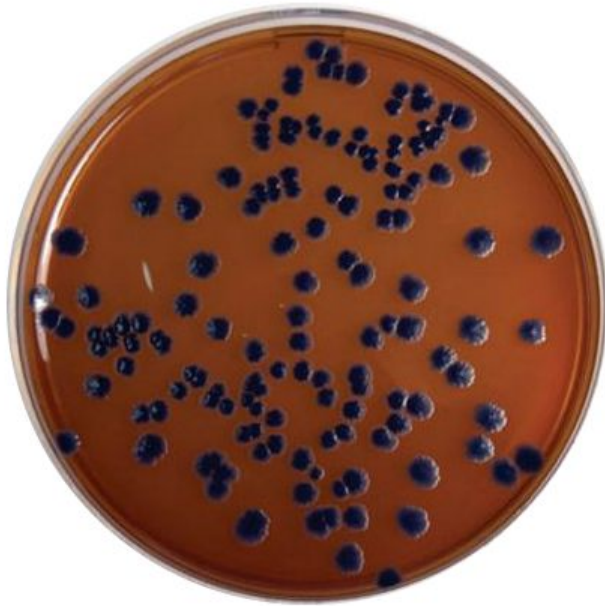
- Дифтерийная палочка неподвижна, спор и капсул не образует; имеет микрокапсулу. Клеточная стенка у *C. diphtheriae* содержит вещества пептидополисахаридной природы, в состав которых входят галактоза, манноза, арабиноза. Как и микобактерии, содержат в составе клеточной стенки большое количество липидов, в том числе некислотоустойчивые корииеформные миколовые кислоты.



- **Культуральные и биохимические свойства.** Возбудитель дифтерии относится к факультативным анаэробам. Гетеротроф. Для выделения *C. diphtheriae* из патологического материала применяется свернутая кровяная сыворотка как таковая (элективная среда Ру) или с добавлением сахарного бульона (элективная среда Ру—Леффлсра), а также кровяной агар, кровяной теллуритовый агар (среда Клауберга II), хинозольная среда Бучина. На теллуритовых средах *C. diphtheriae* растут в виде черных или черно-серых колоний в результате восстановления теллурита до металлического теллура, который накапливается внутри бактерий в виде кристаллов.
- Другим важным дифференциально-диагностическим признаком является способность *C. diphtheriae* продуцировать фермент цистиназу (проба Пизу). Вид *C. diphtheriae* подразделяют на 4 биовара: *gravis*, *mitis*, *intermedius* и *belfanti*.



Рост культуры на среде Клауберга и результаты микроскопии мазка из колоний



Результаты фенотипических тестов



Тест Пизу



Уреазный тест



Мальтоза

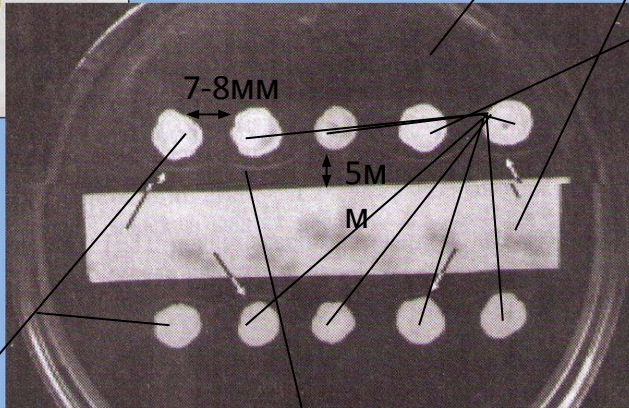
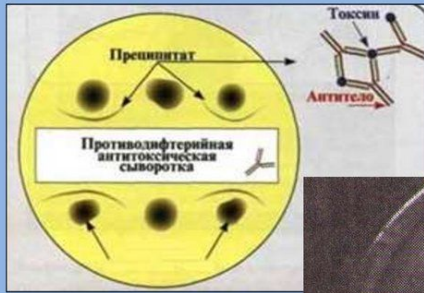


Сахароза

Модифицированный Elek-тест

РП в геле

(для определения токсигенности культуры)



Среда для определения токсигенности 10 мл+СКРС 2мл

Стерильная полоска фильтровальной бумаги 0,7 ×8см, смоченная 0,125мл разведенного до 500МЕ/мл антитоксина

Опытные культуры *C.diphtheriae* Посеянные бляшками
(из одного анализа по три бляшки бляшками
– две из отдельных колоний и d 6-7мм
одну из смеси нескольких)

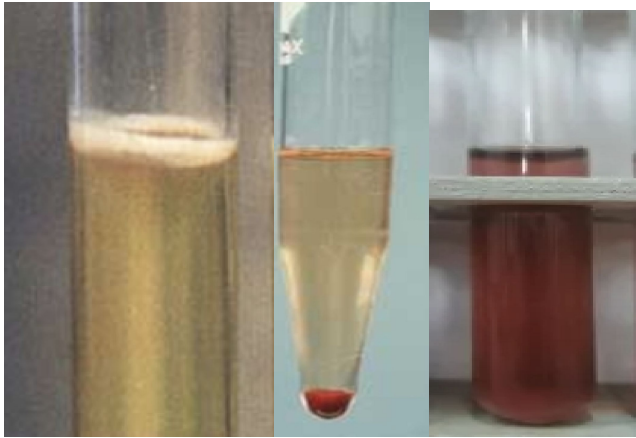
Розлив среды → нанесение полоски с антитоксином → подсушивание дном вверх 15мин 37°C → посев культур → инкубация 37°C → учет через 18-24 и 48ч

Контрольный (токсигенный) штамм

Линии преципитации у бляшек токсигенных культур

Результаты фенотипических тестов

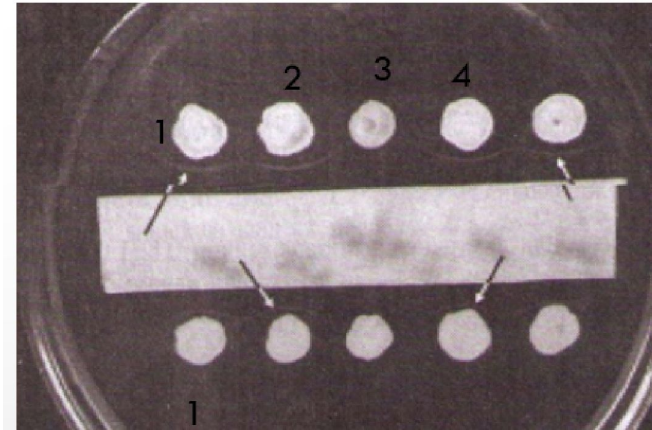
Elek тест



Рост в питательном бульоне

Тест на гемолиз

Расщепление крахмала



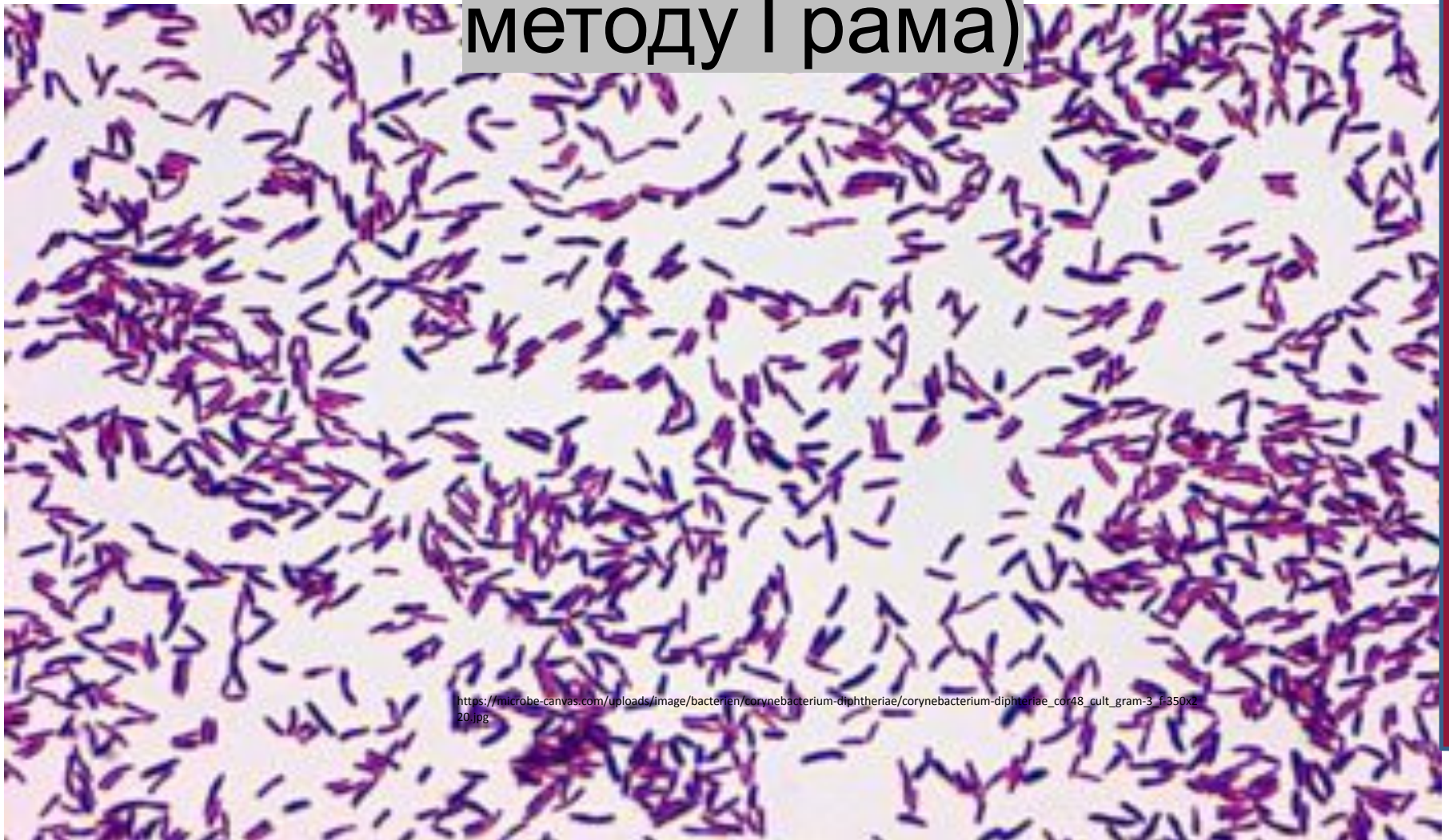
1 – tox+контроль
2,3,4 – исследуемая культура

- **Антигенная структура.** *C. diphtheriae* по антигенной структуре не однородны. Их серологическая неоднородность обусловлена поверхностными термолабильными серовароспецифическими К-антигенами (белками). Видовыми и межвидовыми термостабильными липидными и полисахаридными фракциями О-антигенов, расположенных в глубине клеточной стенки.
- **Факторы патогенности.** Основными факторами патогенности возбудителей дифтерии являются:
 - 1. **поверхностные структуры** липидной и белковой природы, к которым относится корд-фактор,
 - 2. **коринеформная миколовая кислота**, входящий в состав микрокапсулы, 3. **ферменты и токсины**, ферменты агрессии и инвазии, нейраминидазу и N-ацетилнейраминатлизу, гиалуронидазу, а также гемолизин и дермонекротоксин.
- *C. diphtheriae* делятся на токсигенные и нетоксигенные штаммы. Заболевание вызывают только **токсигенные штаммы *C. diphtheriae***. Способность токсинообразованию проявляют штаммы *C. diphtheriae*, содержащие профаг в своем геноме, несущий **tox-ген** ответственный за синтез токсина.
- **Устойчивость в окружающей среде.** *C. diphtheriae* обладают **значительной устойчивостью** к воздействию факторов окружающей среды. Выживаемость их на предметах окружающей среды может достигать 5,5 месяцев и не сопровождается утратой или снижением вирулентности.

- **Эпидемиология.** Дифтерия относится к антропонозным заболеваниям. **Источником** инфекции при дифтерии являются больные и носители *токсигенных штаммов*. **Больной эпидемиологически опасен в течение всего периода заболевания.**
- В соответствии с основной локализацией возбудителя в верхних дыхательных путях, **аэрозольный механизм заражения является основным.**
- Ведущая роль принадлежит *воздушно-капельному пути передачи инфекции*, при котором микробы выделяются в окружающую среду больным или носим гелем токсигенных штаммов *C. diphtheriae* при разговоре, кашле или чихании.
- Возбудитель передается инфицированными через предметы общего пользования (полотенца, игрушки, носовые платки) руками..
- **Этиопатогенез.** **Входными** воротами инфекции служат слизистые оболочки ротоглотки, носа, гортани, трахеи, слизистые оболочки глаз и половых органов, поврежденные кожные покровы, раневая или ожоговая поверхность. Дифтерия **относится к токсинемическим инфекциям**, при которых **микроб остается в месте входных ворот инфекции**, все основные клинические проявления заболевания связаны с действием бактериального токсина.
- **Начальным этапом инфекционного процесса** является адгезия микроба в месте входных ворот инфекции за счет поверхностных структур бактериальной клетки (корд-фактор и коринеформные миколовые кислоты) и их колонизация. **Размножаясь в месте входных ворот инфекции, *C.diphtheriae* образует дифтерийный гистотоксин**, который оказывает местное воздействие на клетки тканей, поступает в кровь, что ведёт к возникновению токсинемии.
- **В области входных ворот инфекции развивается воспалительная реакция**, сопровождающаяся некрозом эпителиальных клеток, отеком и выходом фибриногена из сосудистого русла в окружающие ткани и превращением его в фибрин под действием тромбина, освободившейся при некрозе эпителиальных клеток.
- Это ведет к образованию налетов белого цвета с сероватым или желтоватым оттенком, содержащих большое количество микробов, продуцирующих токсин. Фибриновая пленка - характерный признак дифтерии. **Фибринозное воспаление при дифтерии может быть дифтерическим или крупозным.**

- **Дифтерическое воспаление** возникает на слизистых оболочках с **многослойным плоским эпителием** (ротоглотка, надгортанник, голосовые связки, некоторые отделы полости носа), все клетки которого прочно связаны как между собой так и с подлежащей соединительнотканной основой. В таком случае фибринозная плёнка плотна спаяна. С подлежащей тканью и не снимается тампоном при осмотре.
- **Крупозное воспаление** возникает при локализации патологического процесса в дыхательных путях (гортань, трахея и бронхи), где слизистые оболочки содержат железы, выделяющие слизь и покрытые **однослойным, цилиндрическим** эпителием. Пленка легко отделяется от подлежащих тканей.
- **Особенности иммунитета.** После перенесенного заболевания формируется длительный и напряженный гуморальный антитоксический иммунитет.
- **Микробиологическая диагностика дифтерии.**
- **Бактериологический метод диагностики с определением токсигенности коринобактерий.**
- **Материалом для исследования** служат слизь, пленки из очагов воспаления, мокрота, а также секрет из очагов патологического процесса.

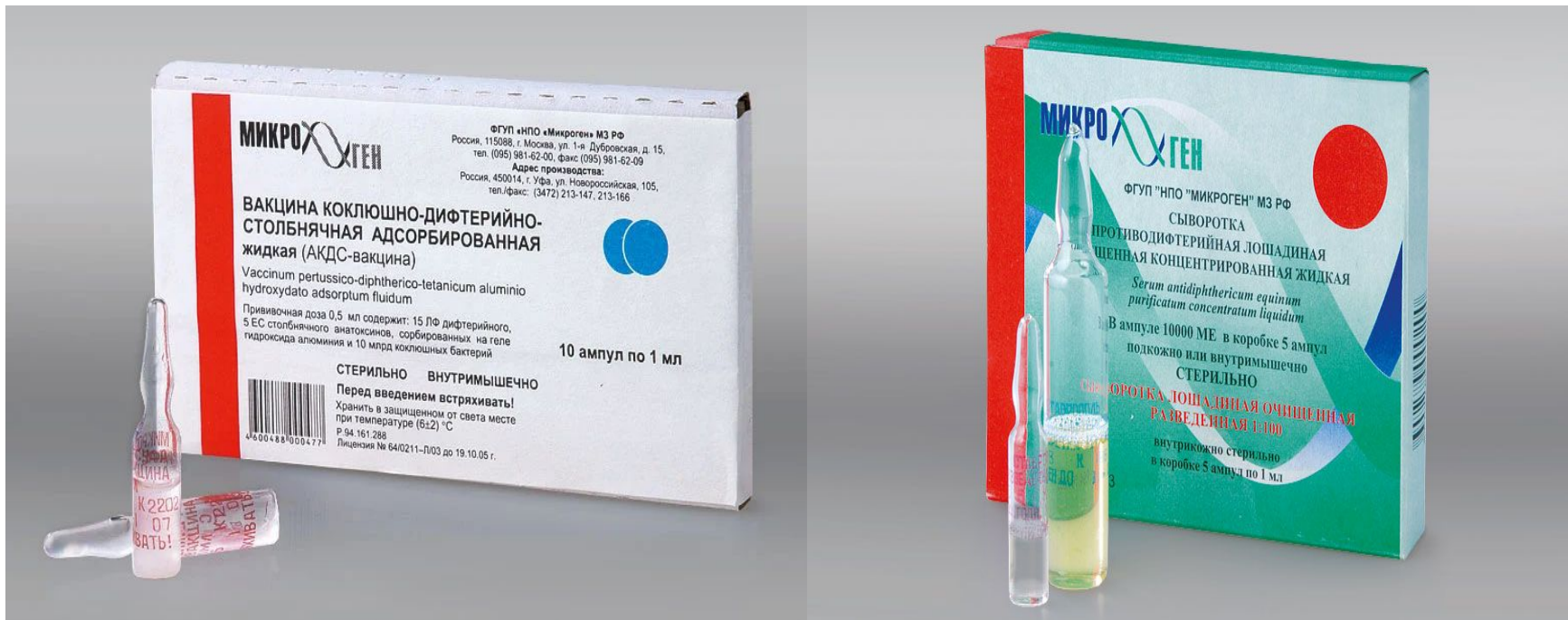
Результаты микроскопии мазка из фибринозной пленки (окраска по методу Грама)



https://microbe-canvas.com/uploads/image/bacterien/corynebacterium-diphtheriae/corynebacterium-diphtheriae_cor48_cult_gram-3_f350x20.jpg

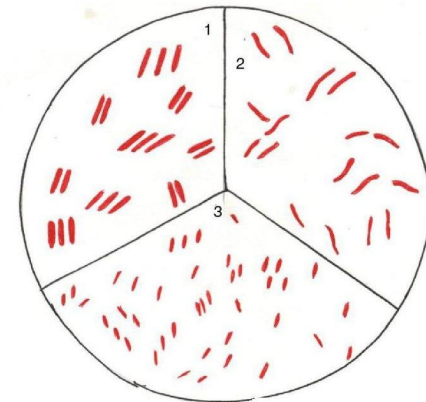
- **Профилактика и лечение.** Дифтерия - токсинемическая инфекция. В целях нейтрализации дифтерийного гистотоксина проводят **лечение** антитоксической противодифтерийной сывороткой. Одновременно с введением антитоксической противодифтерийной сыворотки больным необходимо обязательно назначать антибиотики, оказывающие действие на эти бактерии.
- **Специфическая профилактика дифтерии**
- - **адсорбированной коклюшно-дифтерийно-столбнячной вакцины (АКДС-вакцина),**
- - **адсорбированного дифтерийно-столбнячного анатоксина (АДС-анатоксин),**
- -**адсорбированного дифтерийно-столбнячного анатоксина с уменьшенным содержанием антигенов (АДС-М-анатоксин),**

Иммунопрепараты



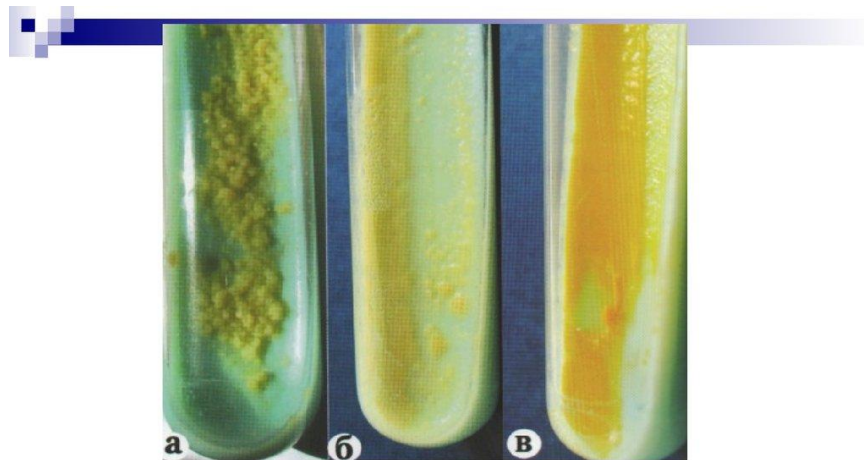
• МИКРОБИОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

- Туберкулез – бугорчатка, чахотка - хроническая инфекционное заболевание, характеризующееся образованием в различных органах, чаще в лёгких, специфических воспалительных изменениях. Возбудители туберкулеза относятся к семейству *Mycobacteriaceae*, туберкулез вызывает комплекс *M. tuberculosis* (вариант *M. microti*, *M. canettii* – непатогенны для человека), *M bovis*, *M africanum*
- По морфологии это тонкие, прямые или слегка изогнуты. Большинство липидов представлено миколовыми кислотами, которые не только фиксированы в каркасе клеточной стенки, но и присутствуют в виде свободных гликопептидов - и корд - факторов. Высокое содержание липидов в клеточной стенке придаёт этим бактериям ряд характерных свойств - устойчивость к кислотам, щелочам и спирту. Для окраски микобактерий используют метод Циля- Нильсона.



Возбудитель туберкулеза:
I – *Mycobacterium tuberculosis*, II - *Mycobacterium avium*,
III - *Mycobacterium bovis* (окраска по Целю – Нильсену).

- **2. Культуральные свойства.** Требовательны к питательным средам: для роста необходимы глицерин и аминокислоты. Используются яично-глицериновая среда Левинштейна-Йенсена; картофельная глицериновая среда. Микобактерии туберкулеза. растут очень медленно. Видимый рост на твёрдых питательных средах появляется на 21-28 день, в жидких на 7-10 день, для появления обильного роста необходимо 4-6 нед.
- На **плотных средах бактерии** дают морщинистые, сухие, с неровными краями, изолированные, не сливающиеся друг с другом колонии. При культивировании на жидких средах - рост на поверхности в виде сухой пасты, которая со временем уплотняется, становится бугристо-морщинистой.

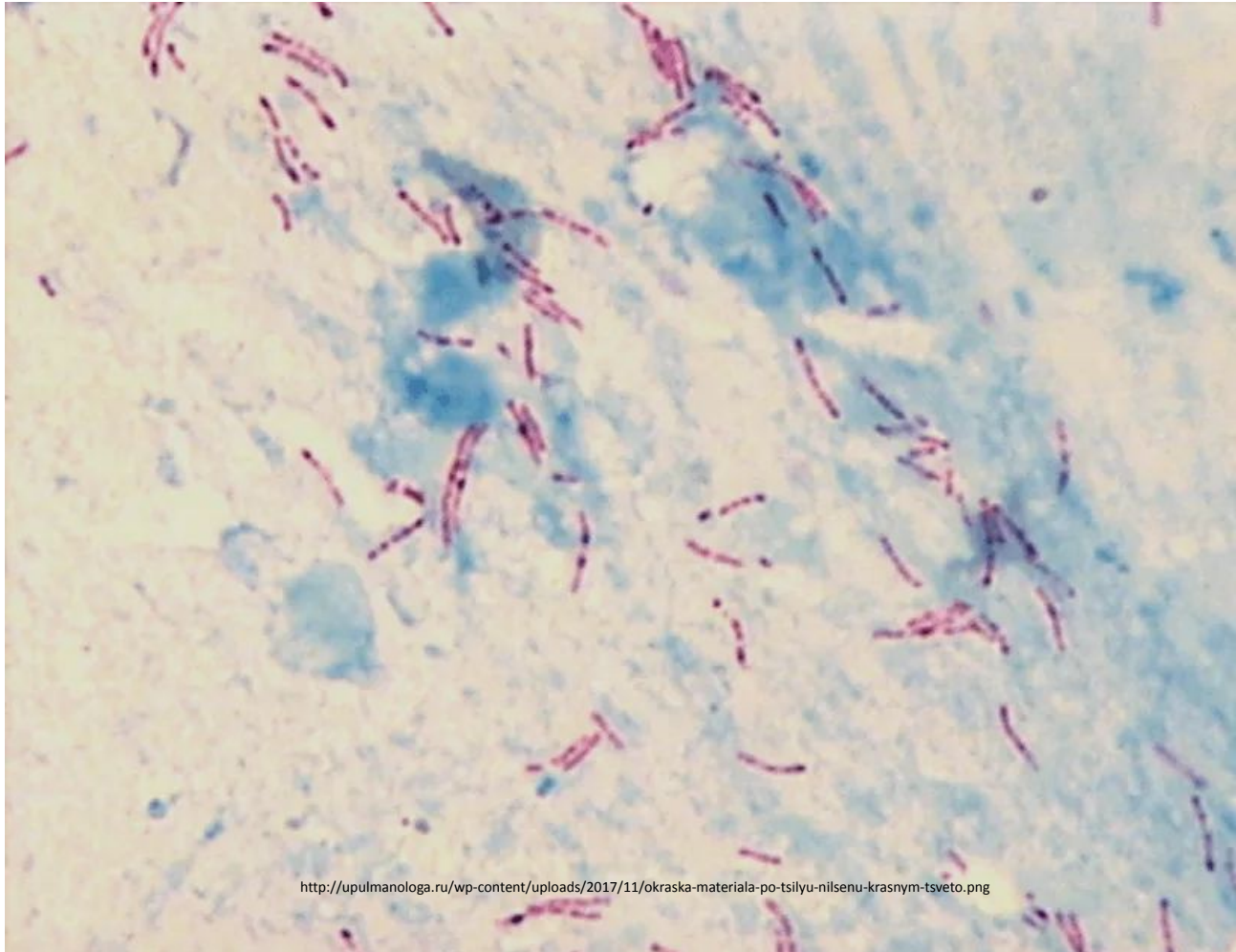


Рост микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена (состоит из яичной основы, малахитового зеленого и добавок):

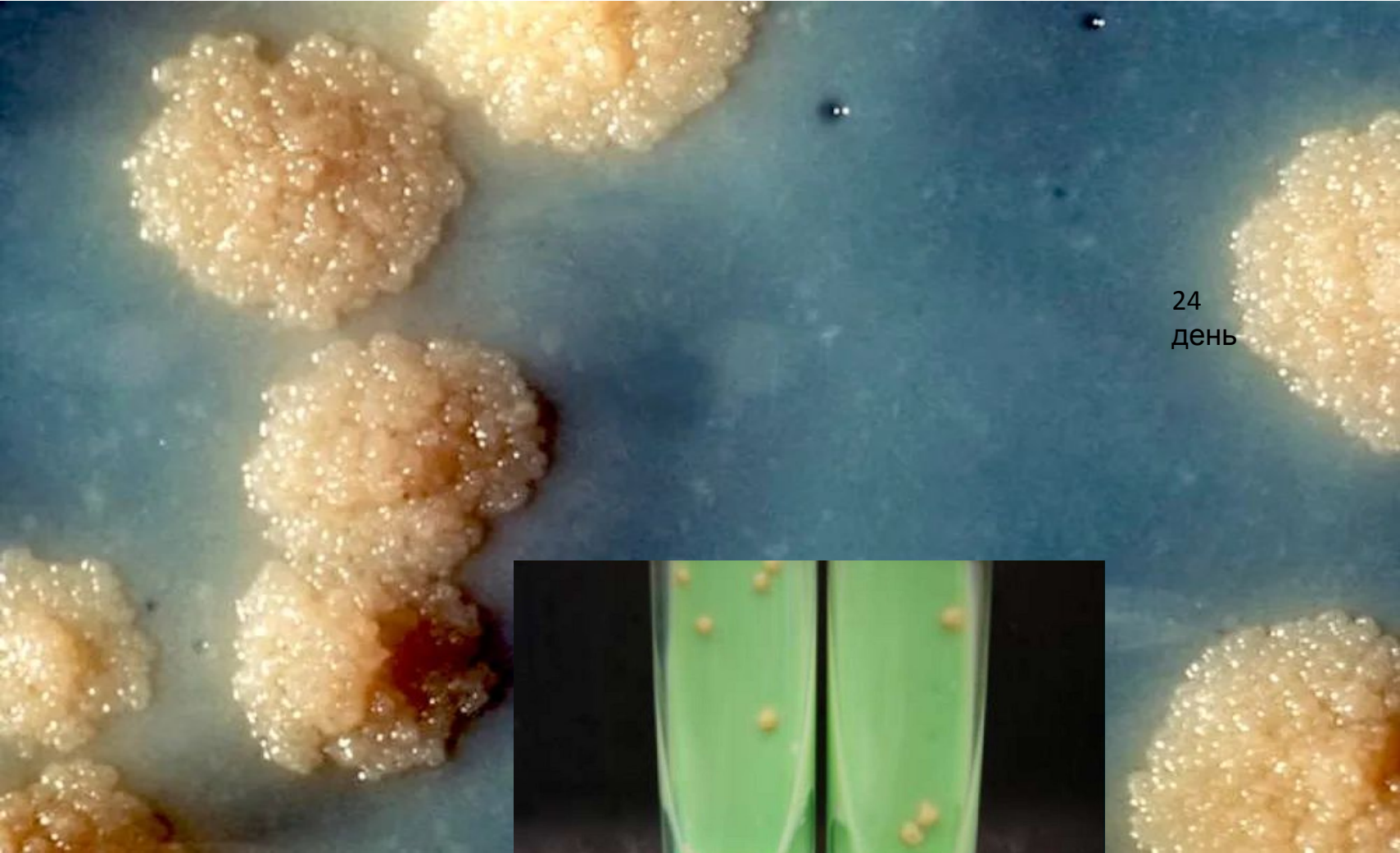
А) рост гранулированных, бородавчатых, сухих колоний *M. tuberculosis*;

Б, В) рост фотохромогенных, от гладких до неровных колоний

Результаты микроскопии мазка из мокроты (окраска по Цилю-Нильсену)



Рост культуры на среде Левенштейна-Йенсена



Для дифференциации микобактерий комплекса *M. tuberculosis* от медленнорастущих нетуберкулезных кислотоустойчивых микобактерий необходимо применять следующие основные биохимические тесты:

- **Ниациновый тест.** К водному экстракту агаровой культуры микобактерий добавляют полоску, пропитанную реактивами (20% ПАСК, 60% роданистым калием и 50% хлорамином В). Появление желтого окрашивания экстракта у дна пробирки через 15-30 минут свидетельствует о положительном результате.
- **Тест на наличие нитратредуктазы.** Суспензию микобактерий в течение 3 часов инкубируют с буферным раствором нитрата натрия. Затем последовательно добавляют реактивы: разведенную 1:1 соляную кислоту, 0,2% раствор сульфаниламида, 0,1% раствор N-нафтилэтилендиамина. Красное окрашивание свидетельствует о положительном результате.
- **Тест на наличие термостабильной каталазы.** После прогревания суспензии бактерий при 68°C в течение 2 часов микобактерии, не имеющие термостабильной каталазы, не расщепляют перекись водорода.
- **Тест на наличие способности расти на среде с салициловокислым натрием (1 мг/мл).** Микобактерии комплекса *M. tuberculosis* не обладают способностью утилизировать салициловокислый натрий, который оказывает на их рост угнетающее действие. Микобактерии комплекса не дают роста на среде с салициловокислым натрием.

Для дифференциации *M. tuberculosis* и *M. bovis* следует учитывать результаты следующих проб:

- **Тест на наличие пиразинамидазы.** Этот тест основан на способности *M. tuberculosis* в течение 4-х дней дезаминировать пиразинамид до пиразиновой кислоты и аммония, что указывает на наличие пиразинамидазы. Тест применяется для дифференциации *M. tuberculosis* от *M. bovis* не проявляет пиразидазной активности.
- **Рост на среде, содержащей 2 мкг/мл гидразида тиофен-2-карбоксиловой кислоты (ТСН).** Тест с гидразидом тиофен-2-карбоксиловой кислоты (ТСН) используется для дифференциации *M. bovis* и *M. tuberculosis* и других медленнорастущих микобактерий. Только *M. bovis* чувствительны к низким концентрациям ТСН (от 1 до 5 мкг/мл) *M. tuberculosis* и другие микобактерии устойчивы к действию этого соединения.

Таблица по фенотипической дифференцировке микобактерий

Вид	Редукция нитратов	Ниациновый тест	Каталазная активность (68° С)	Уреаза	Пиразинамидазный тест	Пигмент	Рост при 25°С
<i>M.tuberculosis</i>	+	+	-	±	+	-	-
<i>M.bovis</i>	-	-	-	±	-	-	-
<i>M.africanum</i>	-	±	-	+	+	-	-
<i>M.kansassii</i>	+	-	+	+	±	Фотохром.	+
<i>M.xenopi</i>	-	-	+	-	+	Скотохром.	-
<i>M.avium</i>	-	-	±	-	+	-	-

Результаты фенотипических тестов

Ниациновый тест



Нитратредуктазный тест



Пиразинамидазный тест

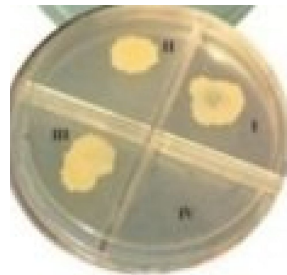


Результаты фенотипических тестов

Рост на среде Левенштейна-Йенсена с 1000мкг/мл салицилата натрия



Рост в присутствии 1-5 мкг/мл ТСН (гидразидом тиофен-2-карбоксилевой кислоты)



I-III – посевы на разные концентрации ТСН
IV – незасеянный контроль

Наличие термостабильной каталазы (68°C)



- **Антигенные свойства.** В АГ структуре микобактерий выделяют 4-е гр. АГ:
 - - общие для всех,
 - - общие для медленно растущих,
 - - общие для быстрорастущих, общие для определенного вида.
- Возбудители имеют сложное АГ строение. АГ микобактерий. являются белки и фосфолипиды клеточной стенки, Корд-фактор и эндотоксин-туберкулим.
- **Факторы-вирулентности:** токсический компонент клеточной стенки - жирные кислоты: миколовая, фтионовая и др.; эндотоксин и корт-фактор.

- **Этиопатогенез** - источник инфекций - больной человек (бациллярный больной), выделяющий с мокротой микобактерии.
- Для возбуждения конфликта с хозяином, бактерии должны попасть в альвеолы, где микобактерии поглощаются резидентными макрофагами, отношения с которыми определяют дальнейшее развитие событий. Неслучайно ТВС относится к классическим **внутримакрофагальным** инфекциям - **ТВС”- болезнь макрофагов**. Взаимодействие между палочками и макрофагами инициируют базисный для ТВС процесс воспаления - **гранулематозного типа**. Неспецифическая гранулема трансформируется в специфическую, обретая признаки, характерные для ТВС. Именно с этого момента гранулема называется туберкулом.
- **По эпидемиологической опасности:**
 - -открытую и закрытую формы.
 - При открытой форме в мокроте обнаруживаются микобактерии и больной представляет опасность для окружающих. При закрытой микобактерий в мокроте нет, больной опасности для окружающих не представляет.
 - Для выявления состояния инфекционной аллергии ставят диаскин тест.

- Выделяют 2 патогенетических варианта туберкулёза: **первичный и вторичный**. **Первичный** – возникает у лиц ранее не имевших контакт с возбудителем. **Инфицирование обычно происходит в раннем детском возрасте, развивается без аллергии к возбудителю. В зоне внедрения возбудитель захватывается макрофагами, возбуждая неспецифическую гранулематозную реакцию. Бактерии легко проходят этот барьер, быстро проникают в регионарные лимфатические узлы.**
- Развитие истинного туберкулёза (т.е. **специфической гранулемы**) занимает 2-3 недели – формируется **первичный аффект**, а втягивание в процесс регионарной лимфоидной ткани ведёт развитию **лимфаденита и лимфангита**, т.е. **формируется первичный ТВС комплекс**. Первичный очаг поражения в лёгких со временем может инкапсулироваться и кальцинироваться с образованием петрификата – **очаг Гона**. Этот процесс не завершается полным освобождением организма от возбудителя и микобактерии могут сохраняться в организме на протяжении многих лет, создавая состояния инфицированности. **Запомните! бактерионосительства при ТВС – нет.**
- **Вторичный ТВС**-развивается в более позднем возрасте при **эндогенной инфекции** или повторном инфицировании. С мокротой возбудитель попадает в гортань, ротовую полость, кишечник, кровяное русло, угрожая экстрапульмонарными осложнениями. **Интоксикация – одно из обязательных проявлений ТВС.**

- **Лабораторная диагностика ТБС**

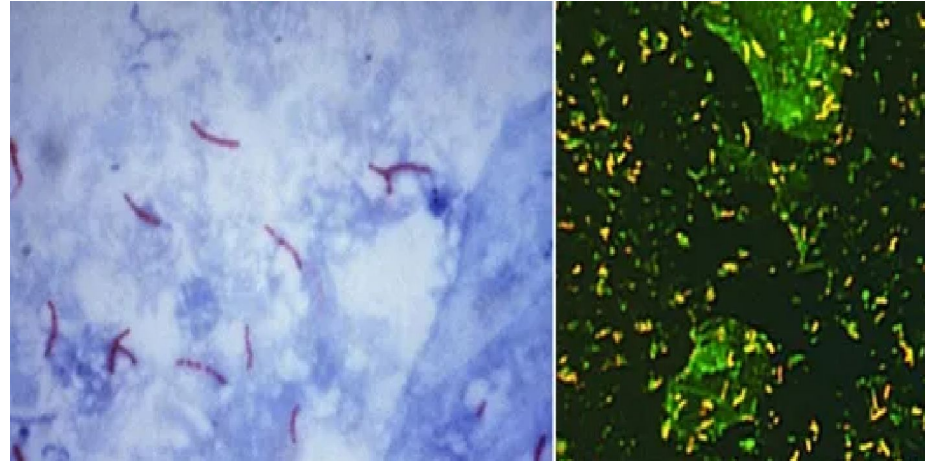
- **1. бактериоскопический** - окраска мазков по методу Циля – Нильсона.
- **2. люминисцентная микроскопия** – носит ориентировочный характер, т.к. не позволяет отличить возбудителя ТБС от других микобактерий.
- **3. стандартом является бактериологический метод.**
- **4. биологический метод** - используется только если трудно выделить возбудителя при бакисследовании - чаще при ТБС почек.
- **5. метод микрокультур Прайса** - в качестве ускоренного метода .
- **6. в последнее время применяют молекулярно-генетические методы** - ПЦР и ДНК зондирование для обнаружения генов *M.tub.* в исследуемом материале.
- **7. используют аллергический метод** – постановка кожно-аллергической пробы Манту с туберкулином, выявление состояния инфекционной аллергии.

Материал для выделения
культуральным методом, обнаружения
антигенов и нуклеиновых кислот
микобактерий зависит от очага
поражения:

- Мокрота, бронхо-альвеолярный лаваж, биоптаты, экссудаты, моча, спинно-мозговая жидкость и др.

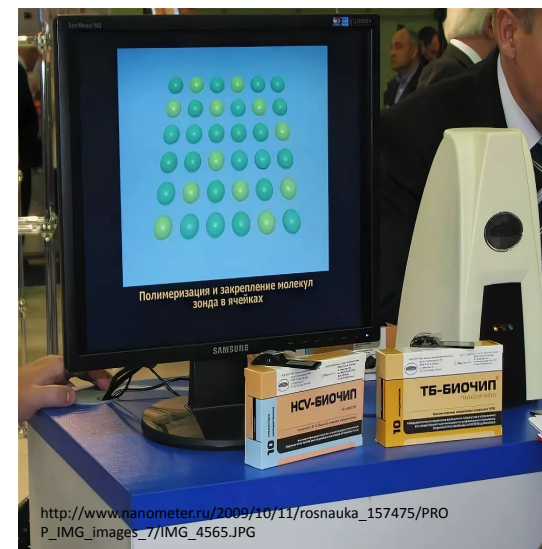
Микроскопический метод

- Иммерсионная микроскопия мазков из исследуемого материала, окрашенных по методу Циля-Нильсена или флуоресцентными красителями. Позволяет выявить возбудителя, когда в 1 мл мокроты содержится не менее 5000-10 000 МБТ, и при условии, если просмотрены 300 полей зрения. Люминесцентный метод на 10-15% чувствительнее обычной световой микроскопии.



Бактериологическое исследование с обязательным определением чувствительности к противотуберкулезным препаратам (ПТП); **чувствительный метод**; отношение выделенных культур к микобактериям туберкулеза определяется с помощью ИХА или генетических методов, условно патогенным микобактериям - с помощью генетических методов и масс-спектрометрии

- Определение устойчивости к ПТП:
- Фенотипические -метод абсолютных концентраций, метод пропорций
- Генотипические - биологические микрочипы, ДНК-стрипы, набор GeneXpert MTB/RIF, мультиплексная ПЦР в режиме реального времени



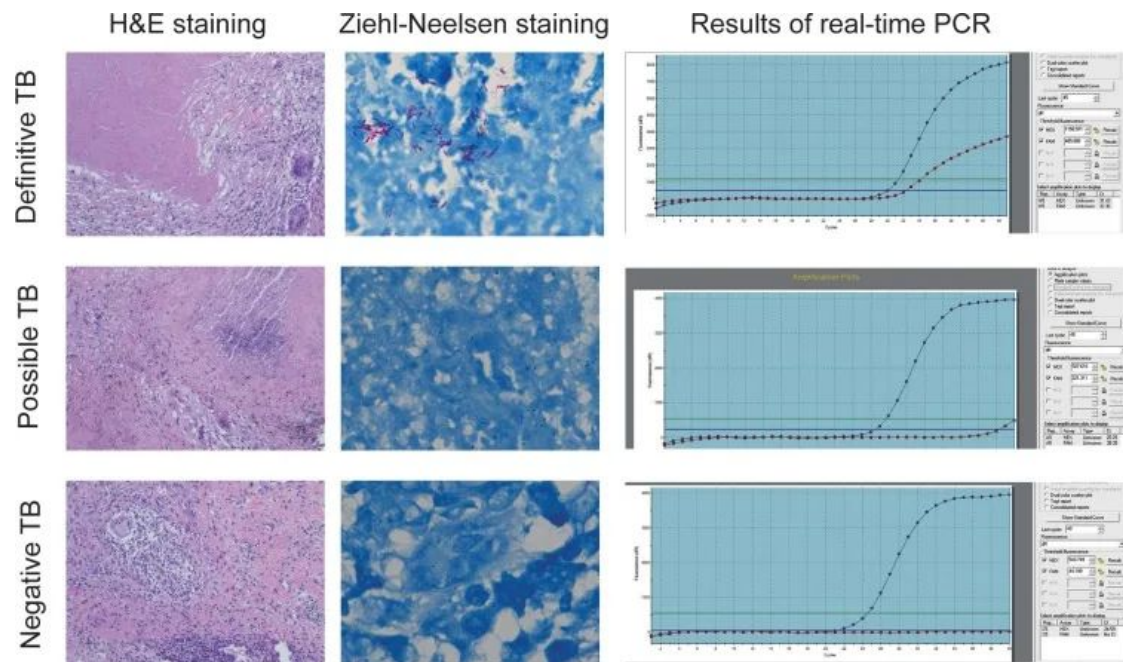
Фенотипическая дифференцировка *M.tuberculosis* и медленно растущих условно патогенных микобактерий

Тесты	<i>M.tuberculosis</i>	Медленно растущие условно патогенные микобактерии
Ниациновый тест	+	-*
Нитратредуктазный тест	+	±
Термостабильность каталазы	-	+
Рост на среде: с салицилатом натрия (1мг/мл)	-	±
паранитробензойной кислотой (0,5мг/мл)	-	+*
5% хлоридом натрия	-	+*

*есть единичные исключения

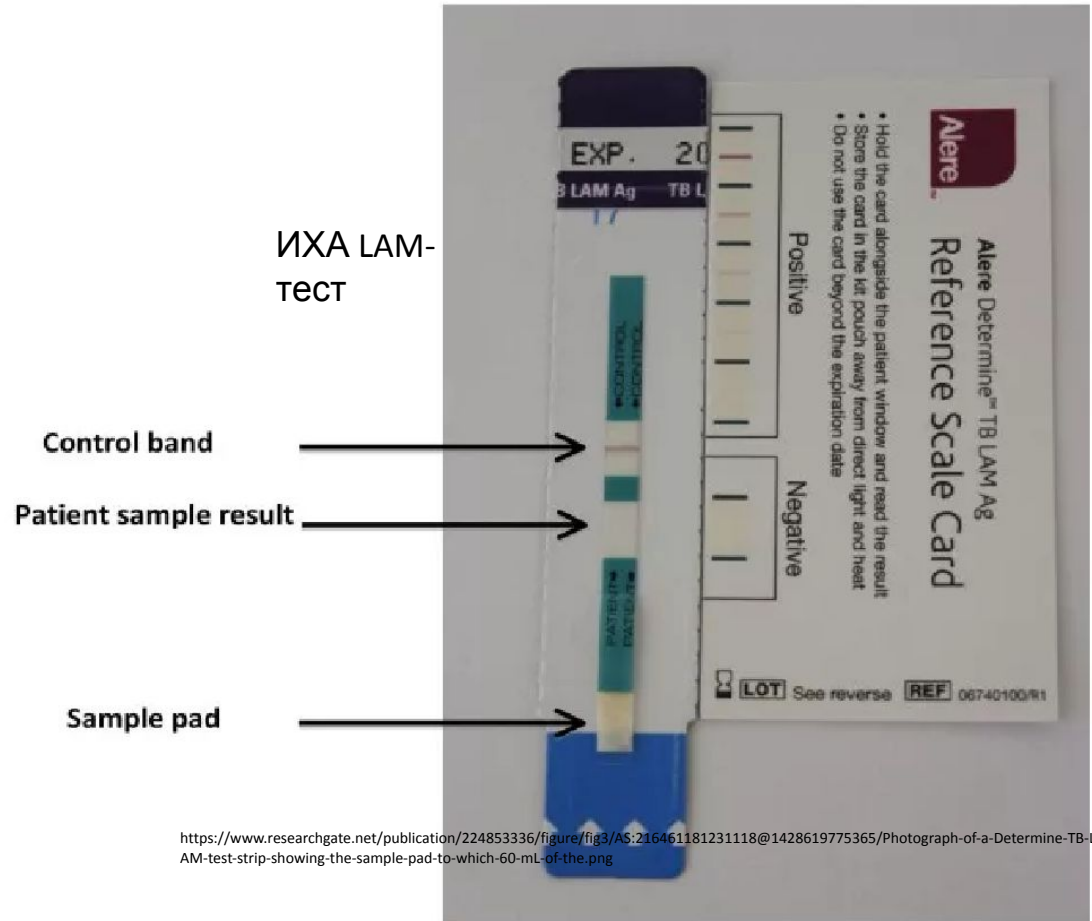
Молекулярно-генетические методы: используются отдельно и сочетаются с бактериологическим исследованием для определения лекарственной устойчивости и идентификации нетуберкулезных микобактерий

- ПЦР Real time и другие методы с определением генов устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам



Иммунодиагностика: серологическая диагностика (ИФА); иммуноиндикация - обнаружение липоарабиноманнана микобактерий в клиническом образце, чаще мс

- LAM присутствует и у нетуберкулезных микобактерий



Аллергические методы: внутрикожные тесты - диаскин-тест с рекомбинантным белком CFP10-ESAT6, методы ИФА для оценки сенсibilизации CD4-клеток к антигенам микобактерий туберкулеза, проба Манту с туберкулином

IGRA-методы

(Interferon-Gamma Release Assays): реакция Т-лимфоцитов на специфические белки МБТ - ESAT-6 и CFP10 (гены, кодирующие эти белки, отсутствуют в геноме *Mycobacterium bovis* BCG и большинстве нетуберкулезных микобактерий). Основаны на ИФА:

- квантифероновый тест (детекция количества освобожденного интерферона- γ Т-лимфоцитами).
- «Т-SPOT-TB» (детекция самих активированных лейкоцитов не только в венозной крови, но и в экссудатах и СМЖ).



Для забора крови пациента (квантифероновый тест – нулевая пробирка, пробирка с АГ МБТ и пробирка с митогеном)

Профилактика ТБС. Живой аттенуированной вакциной **БЦЖ**, содержащий авирулентный штамм *M.bovis*. Проводят на 3-7нед. Ревакцинации в 5-7лет и более поздние сроки. Ревакцинацию проводят БЖЦ вакциной.

Особенности иммунитета: нестерильный; неустойчивый, клеточный.

Иммунопрепараты по теме





Мемориальный
памятник
Петру Ивановичу
Лаврову
1828-1891