**Учебная дисциплина: «Основы микробиологии и иммунологии»**

**Преподаватель Романенко Т. А.**

**Лекция№11**

**Тема: «Возбудители бактериальных**

**респираторных инфекций: дифтерии, коклюша, паракоклюша, туберкулеза».**

**Группы 223-СК( дата проведения- 24.01.22); 222-СК( дата проведения 24.0122);11-ФК(дата проведения 25.01.22); 11-ФБ(25.01.22);13-С1(дата проведения28.01.22);13-С2( 28.01.22);221-С( ).**

**Коринебактерии. Бордетеллы. Род Corynebacterium.**

Возбудитель дифтерии - Corynebacterium diphtheriae и большая группа близких по морфологическим и биохимическим свойствам микроорганизмов рода коринебактерий называют коринеформными бактериями или дифтероидами. Они представлены грамположительными неподвижными палочками, чаще с утолщениями на концах, напоминающими булаву (coryne - булава).

**Дифтероиды** широко распространены в почве, воздухе, пищевых продуктах (молоке). Среди них можно выделить три экологические группы: - патогены человека и животных; - патогены растений; - непатогенные коринебактерии. Многие виды дифтероидов являются нормальными обитателями кожи, слизистых зева, носоглотки, глаз, дыхательных путей, уретры и половых органов**.**

**Дифтерия**. Дифтерия - острое инфекционное антропонозное заболевание преимущественно детского возраста, которое характеризуется интоксикацией организма дифтерийным токсином и характерным фибринозным (дифтеритическим) воспалением в месте локализации возбудителя (phther - пленка).

**Морфологические и тинкториальные свойства**. C.diphtheriae - тонкие полиморфные палочки с булавовидными концами, часто содержащие волютиновые включения, выявляемые окраской метиленовым синим или по Нейссеру. При последнем палочки окрашены в желто - соломенный цвет, зерна волютина (полиметафосфата) - в темно - коричневый цвет. В культурах палочки находятся под углом друг к другу (особенности деления) , образуя различные фигуры - растопыренных На простых средах коренебактерии дифтерии не растут. Они пальцев, V, Y, L и т.д. Имеют микрокапсулу, а также фимбрии, облегчающие адгезию к эпителию слизистых оболочек**.**

**Культуральные свойства**. требуют сред с кровью или сывороткой крови (среды Леффлера, Ру), на которых рост отмечается уже через 10-12 часов, за это время сопутствующая (контаминирующая пробы) микрофлора полностью развиться не успевает. Наиболее оптимальны теллуритовая среда и теллурит - шоколадный агар Маклеода. Высокие концентрации теллурита калия в этих средах подавляют рост посторонней флоры. Коринебактерии дифтерии восстанавливают теллурит до металлического теллура, что придает их колониям темно - серый или черный цвет. У этого возбудителя выделяют биотипы - gravis, mitis, intermedius, отличающиеся по морфологии, антигенным и биохимическим свойствам, тяжести заболеваний у человека. Тип gravis чаще вызывает вспышки и более тяжелое течение, для него характерны крупные с неровными краями и радиальной исчерченностью колонии в виде маргаритки (R- формы). Тип mitis вызывает преимущественно легкие спорадические заболевания, образует на плотных средах мелкие гладкие колонии с ровными краями (S- формы). Тип intermedius занимает промежуточное положение, образует на плотных средах переходные по характеристикам RS- формы, однако еще более мелкие. На жидких средах вызывают помутнение сред, образуют крошковидный осадок.

**Биохимические свойства.** Коринебактерии дифтерии ферментируют глюкозу, мальтозу. Отсутствие активности в отношении сахарозы и мочевины - важный дифференциальный признак среди дифтероидов. Обладают цистеназной активностью (расщепляют цистеин) - проба Пизу.

**Антигенная структура.** Выделяют О- и К- антигены. Полисахаридные компоненты О- антигенов клеточной стенки обладают межродовыми свойствами, обусловливая неспецифические перекрестные реакции с микобактериями, актиномицетами (нокардиями). Поверхностные К- антигены - капсульные белки, обладают видовой специфичностью и иммуногенностью. Выделяют 11 серотипов. Серотипы 1-5 и 7 относятся к биовару gravis. Серотипирование культур проводят в РА с диагностическими сыворотками к соответствующим сероварам и полигрупповой агглютинирующей сывороткой. В серологической диагностике у людей чаще применяют РПГА, более чувствительную, чем РА. В настоящее время применяют также ИФА. Многие штаммы коринебактерий дифтерии (особенно нетоксигенные) обладают спонтанной агглютинабельностью и полиагглютинабельностью. Факторы патогенности. Токсигенные штаммы возбудителя дифтерии продуцируют сильный экзотоксин (термолабильный высокотоксичный иммуногенный белок). Нетоксигенные штаммы не вызывают заболевания. Токсин вызывает необратимое блокирование удлинения полипептидной цепи, т.е. любого белкового синтеза. Поражаются в основном определенные системы: симпатико - адреналовая, сердце и кровеносные сосуды, периферические нервы. Отмечаются структурные и функциональные нарушения миокарда, демиелинизация нервных волокон, приводящая к параличам и парезам. Способность к токсинообразованию проявляют лишь лизогенные штаммы, инфицированные бактериофагом (бета - фагом), несущим ген tox, который кодирует структуру токсина (т.е. несущие гены умеренного профага в своей хромосоме). Фаготипирование применяют для дифференциации штаммов коринебактерий дифтерии.

**Эпидемиология.** Резервуар - человек (больной, реконвалесцент, бактерионоситель). Основной путь передачи - воздушно - капельный, сезонность - осенне - зимняя. Возбудитель хорошо сохраняется при низких температурах, высушенном состоянии (слюна, слизь, пыль).

**Клинико - патогенетические особенности**. Возбудитель в месте внедрения вызывает фибринозное воспаление с образованием плотно спаянной с тканями фибринозной пленки. Существенное значение в вызываемой патологии имеет действие экзотоксина (описано в разделе “факторы патогенности” ). По локализации выделяют дифтерию ротоглотки (наиболее часто), дыхательных путей, носа и редкой локализации (глаза, наружные половые органы, кожа, раневая поверхность). Дифтерия зева может быть причиной крупа и асфиксии. Лабораторная диагностика. Основной метод диагностики - бактериологический. Применяют для выявления больных, бактерионосителей, контактных. Стерильными тампонами берут материал для микроскопии и посевов - слизь из зева и носа, пленки с миндалин и других мест, подозрительных на наличие дифтеритических поражений. Возбудитель выделяют посевом на элективные теллуритовые среды и кровяной агар. На слизистой оболочке глаза часто выявляют C.xerosis (возможная причина хронических конъюнктивитов), в носоглотке - C.pseudodiphtheriticum (палочка Хофманна), выявляют и другие дифтероиды. Для дифференциации возбудителя дифтерии от дифтероидов используют такие показатели, как способность восстанавливать теллурит и образовывать темные колонии, пробу Пизу, ферментацию углеводов (глюкоза, мальтоза, сахароза) и мочевины, способность расти в анаэробных условиях (характерно для возбудителя дифтерии). Обязательным этапом является определение токсигенности культуры. Наиболее распространенные методы - биопробы на морских свинках, реакция преципитации в агаре. Используют также ИФА с антитоксином, генетические зонды и ПЦР для выявления фрагмента А гена tox. Лечение. Используют антитоксическую противодифтерийную сыворотку, антибиотики и сульфаниламидные препараты. Постинфекционный иммунитет - стойкий, преимущественно антитоксический. Для количественного определения уровня антитоксического иммунитета ранее применялась проба Шика (внутрикожное введение токсина), сейчас - РПГА с эритроцитарным диагностикумом, получаемым сенсибилизацией эритроцитов дифтерийным анатоксином. Профилактика. В основе - массовая иммунизация населения. Используют различные препараты, содержащие дифтерийный анатоксин - АКДС, АДС, АДС- М, АД и АД- М. Род Bordetella. Бордетеллы - мелкие коккобациллы, имеют форму овоидной палочки, грамотрицательны, неустойчивы во внешней среде. Основное значение имеют три вида. 1. B.pertussis - возбудитель коклюша - острого инфекционного заболевания, сопровождающегося воспалением гортани, трахеи и бронхов и приступообразным кашлем. 2. B.parapertussis - возбудитель паракоклюша. 3. B.bronchiseptica - возбудитель коклюшеподобного заболевания собак, кошек и кроликов, может вызывать у людей респираторные заболевания по типу ОРВИ (относительно редко). Культуральные особенности. Бордетеллы требовательны к средам, особенно возбудитель коклюша. Для первичной изоляции этих гемофильных микроорганизмов используют картофельно - глицериновый агар с добавлением крови (среду Борде - Жангу) или казеиново - угольный агар (КУА). На кровяных средах возбудитель коклюша вызывает образование мелких колоний металлического оттенка с потемнением сред, на КУА - буровато - коричневое окрашивание колоний. Основные формы колоний - гладкие (S) - так называемая Iфаза (вирулентные культуры) через промежуточные формы переходят в шероховатые (R) - фаза IV, что сопровождается изменением культуральных, биохимических и антигенных свойств, потерей вирулентности. Антигенный состав. Имеются общие (родовые) и специфические (видовые) антигены. Видоспецифическими являются соматические О- антигены (агглютиногены), выявляемые в РА. Факторы патогенности. Главный фактор - термолабильный экзотоксин белковой природы, обладающий тропизмом к нервной и сосудистой системе. Имеется термостабильный эндотоксин, обладающий токсическими и сенсибилизирующими свойствами. Трахеальный цитотоксин вызывает повреждение мерцательного эпителия. Бактерии продуцируют гиалуронидазу, лецитиназу, плазмокоагулазу**.**

**Эпидемиология**. Источник инфекции при коклюше и паракоклюше - больные типичными и стертыми формами инфекции. Механизм заражения - воздушно - капельный. Возбудитель, попавший на слизистую оболочку дыхательных путей, размножается, выделяет экзо- и эндотоксины, некротизирует слизистую, раздражают кашлевые рецепторы и кашлевой центр продолговатого мозга, вызывает спазматические приступы кашля. Лабораторная диагностика. Посев проводят методом “кашлевых пластинок” или материал берут заднеглоточным тампоном с посевом на агар Борде - Жангу и КУА. **Идентификация выделенных культур** проводится по морфологическим и культуральным свойствам, а также в РА со специфическими сыворотками. **Для экспресс - диагностики и идентификации** **применяют метод флюоресцирующих антител**. Для серологической диагностики используют различные методы - РА, РСК, РПГА с исследованием парных сывороток, взятых в динамике инфекционного процесса.

**Лечение.** В основе лечения - антибактериальная терапия антибиотиками (гентамицин, ампициллин и др.). **Иммунитет и иммунопрофилактика.** Постинфекционный иммунитет стойкий, видоспецифический, обусловлен гуморальными и клеточными факторами. Для вакцинации используют убитые бордетеллы I фазы. В вакцине АКДС имеется коклюшный компонент (20 млрд микробных тел/ мл).

**Микобактерии. Род Mycobacterium**. Микобактерии - кислотоустойчивые неподвижные грамположительные палочковидные (прямые или изогнутые) бактерии, способные образовывать нитевидные и мицелиальные структуры. Для них характерно высокое содержание липидов и восков в клеточных стенках, что обеспечивает устойчивость к спиртам, кислотам, щелочам, дезинфицирующим средствам, высушиванию и действию солнечных лучей, плохую окрашиваемость красителями, высокую гидрофобность, патогенность. Наряду с кислотоустойчивостью, важной характеристикой микобактерий является медленный рост на питательных средах, особенно микобактерий туберкулеза. Еще одна особенность микобактерий - образование пигментов, часть видов образует пигмент в темноте. Род микобактерий может насчитывать до 200 паразитических и сапрофитических видов, из них хорошо изучено и идентифицировано около 30 видов. Микобактерии широко распространены в почве и воде, их выявляют у широкого круга тепло- и холоднокровных животных. Среди патогенных микобактерий наибольшее значение имеют основной возбудитель туберкулеза человека - M.tuberculosis (палочка Коха), M.bovis - возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота и M.leprae - возбудитель проказы (лепры). Заболевания у людей могут вызывать также M.avium - возбудитель туберкулеза птиц и около 20 других потенциально патогенных видов, способных вызывать у человека атипичные формы поражений (микобактериозы). Mycobacterium tuberculosis (палочка Коха). Морфологические свойства типичны для микобактерий. Это тонкие прямые или слегка изогнутые палочки с зернистыми образованиями в цитоплазме, могут встречаться кокковидные структуры, L - формы. Кислотоустойчивы (высокое содержание липидов и миколовой кислоты в клеточной стенке). Имеют кислотолабильные гранулы (зерна Муха) в цитоплазме. Грамположительны, плохо красятся анилиновыми красителями, по Цилю - Нильсену они окрашиваются в ярко - красный цвет.

**Культуральные свойства.** Растут в аэробных и факультативно - анаэробных условиях. Растут очень медленно - в течении нескольких недель. Микобактерии нуждаются в белке и глицерине, факторах роста. Наиболее часто используют плотные яичные среды Левенштайна - Йенсена, Финна II, синтетические и полусинтетические жидкие среды. На плотных средах рост отмечается на 15-40 сутки в виде сухого морщинистого налета кремового цвета (R- формы), колонии по виду напоминают цветную капусту. На жидких средах отмечается рост в виде поверхностной пленки. Палочка Коха устойчива во внешней среде, в высохших биосубстратах сохраняется до нескольких недель.

**Факторы патогенности.** Патогенные свойства туберкулезной палочки и биологические реакции, которыми отвечает макроорганизм на внедрение возбудителя, связано с особенностями его химического состава, высоким содержанием липидов и их составом (наличие жирных кислот - фтиоидной, миколовой, туберкулостеариновой и др., фосфатидов и других фракций). Главный фактор - токсичный гликолипид - “корд - фактор”, легко выявляемый при культивировании на жидких средах. Он обеспечивает сближенное расположение микобактерий в виде кос, жгута, корда. Корд - фактор оказывает токсическое действие на ткани, а также блокирует окислительное фосфорилирование в митохондриях макрофагов (защищает от фагоцитоза). С химическим составом микобактерий связаны еще две их важнейшие характеристики: - незавершенный фагоцитоз этого внутриклеточного паразита (механизмы - блокада фагосомо - лизосомального слияния, устойчивость к действию лизосомальных ферментов); - способность вызывать выраженную реакцию ГЗТ, выявляемую с помощью туберкулиновой пробы - “ГЗТ туберкулинового типа”.

**Антигенная структура.** Микобактерии туберкулеза имеют сложный и мозаичный набор антигенов. В антигенном отношении M.tuberculosis имеет наибольшее сходство с M.bovis и M.microti. Имеются перекрестно - реагирующие антигены с коринебактериями, актимомицетами. Для идентификации микобактерий антигенные свойства практически не используют**.**

**Эпидемиология**. Основными путями заражения являются воздушно - капельный и воздушно - пылевой. Основным источником заражения является больной туберкулезом человек. Особую роль имеет скученность проживания, в России наибольшую значимость имеют места заключения, лагеря беженцев, лица без определенного места жительства и другиен социально ущербные группы населения. В относительно небольшом проценте случаев туберкулез обусловлен заражением от животных (чаще - через молоко) М.bovis.

**Патогенетические особенности.** В течение жизни человек неоднократно контактирует с микобактериями туберкулеза, однако туберкулезный патологический процесс развивается далеко не у всех инфицированнных. Это зависит от многих факторов и прежде всего - резистентности организма. Наиболее часто заражение происходит через дыхательные пути. Попавшие в организм микобактерии захватываются альвеолярными и легочными макрофагами. В месте попадания может развиться первичный аффект (бронхопневмонический фокус). Далее возбудитель транспортируется в регионарные лимфоузлы, вызывая воспалительную реакцию - лимфангоит и лимфаденит. Первичный аффект, лимфангоит и лимфаденит - первичный комплекс (первичный очаг туберкулеза), характеризующийся образованием по ходу лимфатических путей и узлов гранулем в виде бугорков (бугорчатка или туберкулез). Образование гранулем представляет собой клеточную реакцию ГЗТ на ряд химических компонентов микобактерий. В центре гранулемы в очаге некроза (казеозного распада) находятся микобактерии. Очаг окружен гигантскими многоядерными клетками Пирогова - Лангханса, их окружают эпителиоидные клетки а по периферии - лимфоциты, плазматические и мононуклеарные клетки. Исходы первичного очага: - при достаточной резистентности организма размножение возбудителя в гранулемах прекращается, очаг окружается соединительнотканной капсулой и обезизвествляется (откладываются соли кальция). Этот процесс определяется формированием нестерильного инфекционного иммунитета к возбудителю туберкулеза. **Нестерильность -** способность микобактерий длительно сохраняться в первичном очаге и ждать свой час (иногда через несколько десятилетий); - при недостаточной резистентности - усиленный казеозный распад очага, казеозная пневмония, тяжелая первичная легочная чахотка и генерализованный туберкулез (диссеминированный или милиарный туберкулез с гранулемами в различных органах). Вторичный туберкулез.Вторичный туберкулезный процесс - реактивация возбудителя в результате ослабления резистентности наблюдается при стрессах, нарушениях питания и у лиц пожилого возраста. Возникают очаги казеозного распада в легких с образованием полостей, поражение бронхов, мелких кровеносных сосудов. **Иммунитет.** В основе нестерильного инфекционного и вакцинального иммунитета при туберкулезе - клеточный иммунитет в виде гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), опосредуемой Т- лимфоцитами и макрофагами. Т- лимфоциты при участии белков главной системы гистосовместимости класса I распознают клетки, инфицированные микобактериями туберкулеза, атакуют и разрушают их. Антибактериальные антитела связываются с различными антигенами возбудителя, образуют циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК) и способствуют их удалению из организма. Аллергическая перестройка (ГЗТ) к туберкулезной палочке свидетельствует о формировании приобретенного иммунитета и может быть выявлена с помощью туберкулиновой пробы. Эта проба является достаточно специфичной. Старый туберкулин Коха представляет концентрированный фильтрат стерилизованных компонентов микобактерий. Очищенный препарат PPD (новый туберкулин Коха, содержащий туберкулопротеины) используют преимущественно для постановки внутрикожной пробы Манту. С помощью этой пробы проводят отбор лиц, подлежащих ревакцинации. Положительный результат пробы Манту нельзя рассматривать как обязательный признак активного процесса (это на самом деле показатель ГЗТ), а отрицательный - не всегда свидетельствует об его отсутствии (анергия, иммунодефициты). **Иммунопрофилактика** включает внутрикожное введение аттенуированного штамма Mycobacterium bovis, известного как бацилла Кальметта - Жерена (БЦЖ). В России вакцинацию проводят новорожденным (на 5-7 дни жизни), ревакцинацию - в 7- 12-17-22 лет и более старших возрастах при отрицательной пробе Манту (т.е. отсутствии клеточного нестерильного = вакцинального или инфекционного иммунитета - ГЗТ). **Лабораторная диагностика.** Применяют микроскопические, бактериологические, биологические, аллергологические, серологические и молекулярно - генетические методы. Микроскопическая диагностика включает микроскопию нативного материала, использование методов накопления, люминесцентную диагностику. Микроскопия нативного патологического материала (мокрота, отделяемое свищей, промывные воды из бронхов, моча) в мазках, окрашенных по Цилю - Нильсену, позволяет выявлять красные кислотоустойчивые палочки при концентрации микобактерий не менее нескольких сот тысяч / мл. Методы накопления (например, флотации) повышают чувствительность микроскопии до нескольких тысяч микробных тел / мл. **Люминесцентная микроскопия с использованием акридинового оранжевого или аурамина - родамина - наиболее чувствительный и эффективный метод бактериоскопии, чувствительность - 500-1000 микобактерий / мл.** Позволяет выявлять микобактерии с измененными культуральными и тинкториальными свойствами. **Бактериологический метод (посев на питательные среды) позволяет обнаружить микобактерии при концентрации 200-300 / мл.** Наиболее эффективен до или в начале лечения, в конце лечения уступает по эффективности люминесцентному методу. Недостаток - длительность получения результатов - от 2 до 12 недель. Достоинство - возможность оценки вирулентности культуры, определение чувствительности к лекарственным препаратам. Разработаны ускоренные методы выделения. По методу Прайса материал помещают на предметное стекло, обрабатывают серной кислотой, отмывают физиологическим раствором и вносят в питательную среду с цитратной кровью. Стекло вынимают через 3-4 суток и окрашивают по Цилю - Нильсену. **Золотой стандарт - биологическая проба на морских свинках, позволяет определять до 10 микобактерий в мл.** Распространение резистентных и измененных микобактерий снизило чувствительность метода. Метод требует соблюдения режимных условий и применяется в крупных специализированных лабораториях. **Аллергологические методы - это широко используемые кожные пробы с туберкулином и методы аллергодиагностики in vitro (РТМЛ, ППН - показатель повреждения нейтрофилов и др.).** Серологические методы многочисленны (РСК, РА, РПГА), однако в связи с недостаточной специфичностью используют мало. Наиболее совершенны генетические методы, в практических лабораториях их используют пока недостаточно. Среди методов идентификации микобактерий наибольшую практическую ценность имеют два подхода: - методы дифференциации M.tuberculosis и M.bovis от прочих микобактерий; - методы дифференциации M.tuberculosis и M.bovis. Существует ряд методов дифференциации микобактерий двух основных видов от остальных. Из них наиболее простым и доступным является оценка роста на яичной среде, содержащей салициловый натрий в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/мл. На этих средах, в отличии от других микобактерий, M.tuberculosis и M.bovis не растут. Для дифференциации M.tuberculosis от всех других видов микобактерий , в том числе от M.bovis, используют ниациновый тест (определение синтезируемой M.tuberculosis в больших количествах никотиновой кислоты, выявляемой с помощью цианистых или роданистых соединений по ярко- желтому окрашиванию). У микобактерий туберкулеза также отмечается положительный тест восстановления нитратов. Учитывают скорость роста и характер пигментообразования. Используют цитохимические методы, позволяющие выявлять корд - фактор (вирулентность) по прочности связи красителей - нейтрального красного или нильского голубого при обработке щелочью.

**Домашнее задание:** конспект, прочитать стр.179-189 учебник Основы микробиологии и иммунологии под редакцией В.В. Зверева