

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ САХА (ЯКУТИЯ)
ГБОУ СПО РС(Я) «ЯКУТСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ»



Допущен(а) к защите
Зав. Директора по УР

Иванова М.Н. Иванова М.Н.

СПИРИДОНОВА ОЛЬГА ИВАНОВНА
ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОКРОТЫ НА ТУБЕРКУЛЕЗ
НА ПРИМЕРЕ ГБУ РС(Я) НПЦ «ФТИЗИАТРИЯ»

Выпускная квалификационная работа
по специальности 31.02.03 - «Лабораторная диагностика»

Студент отделения «Лабораторная диагностика»

Гр. ФЛ – 31

Руководитель - Заведующая КДЛ ГБУ РС(Я) НПЦ «Фтизиатрия»

Спиридонова О. И.

Ермолаева Е.И.

Содержание

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 3 |
| Глава I. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОКРОТЫ НА ТУБЕРКУЛЕЗ..... | 5 |
| 1.1. Этиология и патогенез туберкулеза..... | 5 |
| 1.2. Методы лабораторной диагностики туберкулеза..... | 8 |
| 1.2.1. Метод простой микроскопии..... | 8 |
| 1.2.2. Бактериологический метод..... | 10 |
| 1.2.3. Избирательная амплификация нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) <i>in vitro</i> методом ПЦР (полимеразной цепной реакции)..... | 15 |
| 1.3. Сбор, хранение и транспортировка мокроты..... | 16 |
| Глава II. МЕТОДИКА ПРЯМОЙ МИКРОСКОПИИ МАЗКА, ОКРАШЕННОГО МЕТОДОМ ЦИЛЯ – НИЛЬСЕНА..... | 21 |
| 2.1. Преаналитический этап: прием и регистрация материала..... | 21 |
| 2.1.1. Оценка объема и качества поступающего материала..... | 22 |
| 2.1.2. Процедура окраски методом Циля-Нильсена..... | 24 |
| 2.2. Аналитический этап: микроскопическое исследование..... | 25 |
| 2.3. Постаналитический этап: регистрация результатов..... | 26 |
| ВЫВОД..... | 28 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 32 |
| Приложение А Статистика исследований..... | 34 |
| Приложение Б Оснащение лаборатории..... | 36 |
| Приложение В МБТ фото..... | 37 |

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез – является широко распространенным инфекционным, социально - обусловленным и эпидемически опасным заболеванием, передающимся, в основном воздушно – капельным путем и способным поражать любые органы и ткани человека¹.

Основной путь распространения туберкулезной инфекции воздушно-капельный.

В настоящее время, когда организационно-методические и научно-исследовательские мероприятия направлены на снижение заболеваемости туберкулезом, роль лабораторных исследований значительно возросла.

Актуальность темы – получаемые результаты оказывающие помощь клиницистам в дифференциальной диагностике процессов различной локализации, способствующие раннему выявлению туберкулеза, учитывающие при выборе тех или иных методов лечения и определения его эффективности; в ряде случаев они имеют прогностическое значение, а так же помогают в оценке эпидемиологической ситуации.

Целью исследования являются рассмотрение методов лабораторной диагностики туберкулеза, весьма разнообразны как по характеру производимых исследований, так и по тому патологическому материалу, который подвергается исследованию. Кроме общепринятых исследований, используемых в практике при различных заболеваниях, в клинике туберкулеза применяются специальные лабораторные методы, связанные со спецификой этого заболевания.

Предмет исследования – метод прямой микроскопии по Цилю - Нильсена.

Объект исследования – мокрота.

¹Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II/Колл. авторов/Под редакцией Лабинской А.С., Костюковой Н.Н., Ивановой С.М. – М.: Издательство БИНОМ, 2012. – 1152 с.:ил.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Изучение этиологии и патогенеза туберкулеза.
- 2) Рассмотрение основных методов диагностики туберкулеза.
- 3) Изучение и исследование мокроты методом прямой микроскопии.

ГЛАВА 1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОКРОТЫ НА ТУБЕРКУЛЕЗ.

1.1. Этиология и патогенез туберкулеза.

В современной бактериологии идентификация микобактерий представляет большие трудности. С одной стороны, в результате интенсивной и длительной химиотерапии туберкулеза изменяется морфология возбудителя туберкулеза, а с другой стороны, участились случаи выделения из патологического материала атипичных микобактерий.

Микобактерии туберкулеза (МБТ) — факультативные внутриклеточные паразиты, относятся к семейству бактерий *Micobacteriaceae*, порядку *Actinomycetales*, роду *Mycobacterium*.

Род *Mycobacterium* насчитывает свыше 100 видов, большинство из которых являются сапрофитными микроорганизмами, широко распространенными в окружающей среде.

Этимологически слово «микобактерия» происходит из греческих слов *myses* — гриб и *bacterium, bacron* — палочка, прутик.

Компонент названия «гриб» обусловлен тенденцией этих микроорганизмов образовывать нитчатые и ветвящиеся формы, похожие на плесень.

С позиций клинической медицины микобактерия туберкулеза, открытая немецким ученым Робертом Кохом в 1882 году, является наиболее важным видом актиномицетов, которые объединены в комплекс, включающий *M. tuberculosis* (МБТ); *M. bovis* и ее вариант БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена); *M. africanum* и *M. microti*.

Эта группа микобактерий отличается выраженным генетическим сходством. *M. microti* считается не патогенной для человека, однако вызывает заболевание у мышей, напоминающее туберкулез.

Культура БЦЖ не является патогенной для человека.

Микобактерия туберкулеза (МБТ) является до 95% случаев причиной заболевания туберкулезом человека в зависимости от территории проживания.

Вместе с тем *M. bovis* и *M. africanum* вызывают заболевание у человека, клинически не отличающееся от классического туберкулеза.

Микобактерии, не входящие в комплекс *M. Tuberculosis*, могут стать причиной микобактериозов. Такие микобактерии объединяют в комплексы, наиболее важными из которых являются: *M. avium*, *M. fortinatum* и *M. terrae*, *M. leprae*, *M. ulcerance*.

Естественный резервуар туберкулезной микобактерии — человек, домашние и дикие животные, птицы.

МБТ внешне представляют собой тонкие изогнутые палочки, стойкие к кислотам, щелочам и высыханию.

Наружная оболочка бактерии содержит сложные воска и гликолипиды. МБТ могут размножаться как в макрофагах, так и вне клеток, размножаются относительно медленно. Размножение происходит в основном путем простого клеточного деления. На обогащенных питательных средах МБТ размножаются с периодом удвоения от 18 до 24 ч.

Для роста в культуре микобактерий туберкулеза, полученных в клинических условиях, необходимо от 4 до 6 недель.

Самостоятельным движением МБТ не обладают. Температурные границы роста находятся между 29 и 42 °С (оптимальная — 37-38 °С).

МБТ обладают устойчивостью к физическим и химическим агентам; они сохраняют жизнеспособность при очень низких температурах, а повышение до 80°С могут выдерживать в течение 5 мин.

Во внешней среде микобактерия туберкулеза достаточно устойчива. В воде она может сохраняться до 150 дней.

Высохшие микобактерии вызывают туберкулез у морских свинок через 1-1,5 года, лиофилизированные и замороженные жизнеспособны до 30 лет.

При интенсивном облучении солнцем и при высокой температуре окружающей среды жизнеспособность МБТ резко снижается; напротив, в темноте и сырости выживаемость их весьма значительна. Вне живого организма они остаются жизнеспособными в течение многих месяцев, в особенности в темных, сырых помещениях.

Морфология и размеры МБТ не постоянны, это зависит от возраста клеток, особенно от условий существования и состава питательной среды.

Липиды поверхностной стенки микобактерий определяют ее вирулентность и способность к образованию в культуре скоплений бактерий в виде кос (корд-фактор).

Первоначально корд-фактор связывали с вирулентностью МБТ.

Одним из важных видов изменчивости МБТ является формирование L-форм. L-формы характеризуются сниженным уровнем метаболизма, ослабленной вирулентностью. Оставаясь жизнеспособными, они могут длительное время находиться в организме и индуцировать противотуберкулезный иммунитет.

L-формы отличаются выраженными функциональными и морфологическими изменениями. Обнаружено, что трансформация МБТ в L-формы усиливается при длительном влиянии антибактериальной терапии и других факторов, которые нарушают их рост и размножение, образование клеточной мембраны.

Установлено, что в мокроте «абациллярных» больных с деструктивными формами туберкулеза могут находиться L-формы МБТ, способные при соответствующих условиях реверсировать (модифицироваться) в палочковидный вариант, вызывая тем самым реактивацию туберкулезного процесса.

Следовательно, абациллирование каверн таких больных еще не означает их стерилизацию в отношении МБТ.

МБТ по своей природе, не чувствительны ко многим антибиотикам. Это свойство в первую очередь связано с тем, что высоко гидрофобная

клеточная поверхность служит своего рода физическим барьером для терапевтических агентов и антибиотиков. Главная причина устойчивости закодирована в структуре генома туберкулезной палочки.

Вместе с тем МБТ могут вырабатывать устойчивость (резистентность) к противотуберкулезным препаратам. Одновременная лекарственная устойчивость МБТ к нескольким препаратам в последние годы значительно снижает эффективность лечения туберкулеза.

В результате современное здравоохранение имеет дело не просто с опасным возбудителем туберкулеза, а с целым набором его штаммов, устойчивых к разным лекарствам. На практике для организации эффективного лечения туберкулеза важно не только обнаружить МБТ, но и параллельно определить их резистентность, причем достаточно быстро — в течение двух-трех дней, чтобы вовремя назначить эффективную химиотерапию.

1.2. Лабораторные методы выявления микобактерий туберкулеза.

1.2.1. Метод простой микроскопии.

Одним из основных направлений в лабораторной диагностике туберкулеза является установление факта бактериовыделения, либо подтверждение его прекращения (абациллирования). Поэтому, методике выявления возбудителя в различном патологическом материале должно уделяться большое внимание.

Правильное суждение о динамике бактериовыделения, стойкости достигнутого в процессе лечения абациллирования важно для правильного планирования организации противотуберкулезной службы и осуществления противотуберкулезных мероприятий, как на стационарном, так и на амбулаторном этапе.

Лабораторная диагностика обеспечивает выполнение главной задачи диагностики и лечения туберкулеза — выявление у больного МБТ. В лабораторную диагностику на современном этапе входят следующие методики:

- микроскопическая идентификация МБТ в выделяемых субстанциях или тканях;
- культивирование; определение резистентности к препаратам; серологические исследования;
- использование новых молекулярно-биологических методов, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР);

Уже более 100 лет существует самый простой и быстрый метод выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) — микроскопия мазка.

КУМ — это микобактерии, способные оставаться окрашенными даже после обработки кислотными растворами. Они могут быть выявлены с помощью микроскопа в окрашенных образцах мокроты.

Микобактерии отличаются от других микроорганизмов характерным составом своей клеточной стенки, состоящей из миколовых кислот.

Кислоты благодаря своим сорбционным свойствам обеспечивают способность окрашиваться по методикам, выявляющим КУМ.

Резистентность к стандартным методам окрашивания и способность МБТ сохранять раннее окрашивание является следствием высокого содержания липидов во внешней оболочке клетки.

Грамположительные бактерии в своем составе имеют приблизительно 5% липидов или воска, грамотрицательные организмы — около 20% и МБТ — примерно 60%.

Бактериоскопия мокроты или другого отделяемого проводится «простым» методом и методом флотации.

При простом методе мазки готовят из комочков мокроты или капель жидкого вещества (экссудата, промывных вод и др.).

Мазок делают на двух предметных стеклах. Один из мазков окрашивают по Граму на общую флору, другой — на туберкулезные микобактерии.

Основным методом окрашивания является карбол-фуксиновый (метод Циля-Нильсена). Главный принцип этого метода — в способности наружной оболочки МБТ адсорбировать карбол-фуксин.

Поглощая красный карбол-фуксин, наружная мембрана МБТ настолько прочно связывает краску, что ее нельзя удалить обработкой серной кислотой или солянокислым спиртом. Затем, образец, обрабатывается метиленовым синим.

При иммерсионной микроскопии МБТ появляются в виде красных палочек на синем фоне.

Начиная с 1989 г., в современных лабораториях флюоресцентная микроскопия в значительной степени вытеснила старые методы, основанные на кислотоустойчивости микобактерий.

Этот метод базируется на тех же свойствах МБТ, связанных со способностью наружной мембраны МБТ, богатой липидами, удерживать соответствующий краситель, в данном случае — аурамин – родамин.

МБТ, поглощая это вещество, одновременно, устойчивы к обесцвечиванию солянокислым спиртом. При этом МБТ, окрашенные аурамин – родамином, флюоресцируют под воздействием ультрафиолета или других световых спектров, выделенных соответствующими фильтрами.

Под воздействием ультрафиолета МБТ проявляются как ярко-желтые палочки на черном фоне.

1.2.2. Бактериологический метод

В клинике туберкулеза представляет интерес изучение различных свойств выделенных культур, их лекарственная чувствительность, ферментативная активность, вирулентность, типовая принадлежность. Это

имеет значение для выбора наиболее рационального метода лечения и для прогноза заболевания.

Для обнаружения возбудителя туберкулеза в патологическом материале пользуются как бактериоскопическим так и бактериологическим методами.

Так как первый наиболее прост и доступен, его преимущественно и используют, несмотря на недостаточную чувствительность.

Культуральные исследования материала позволяют подтвердить наличие МБТ при низком уровне концентрации МБТ (100 МБТ/мл), определить вид микобактерии и чувствительность МБТ к противотуберкулезным препаратам.

Однако, посев исследуемого материала необходимо проводить в центральной лаборатории и период получения результатов длительный — от 2 до 8 недель.

Выявление больных с положительными результатами культурального исследования материала при отрицательных результатах бактериоскопии имеет меньшее эпидемиологическое значение. У таких больных прогноз весьма благоприятный, а их роль в распространении инфекции крайне незначительна.

Например, при отсутствии кашля больные практически не распространяют туберкулезную инфекцию.

К бактериологическому исследованию обычно прибегают в случаях, когда бактериоскопический метод, включая и накопление микробов с помощью флотации, дает отрицательные результаты.

Бактериологический способ исследования патологического материала распадается на следующие этапы:

- выделение чистой культуры микобактерий туберкулеза;
- дифференциация ее от кислотоупорных сапрофитов;
- Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза.

Выделение чистой культуры микобактерий туберкулеза осуществляют посевом исследуемого материала на питательные среды. Следует при этом иметь в виду, что мокрота, кал и т. п., наряду с туберкулезными микобактериями, содержат множество других микробов, способных быстро размножаться и подавлять рост возбудителя туберкулеза.

Поэтому туберкулезный материал до бактериологического исследования следует освободить от сопутствующей микрофлоры.

Для этого пользуются двумя приемами. С одной стороны, нестерильный патологический материал предварительно (до посева) обрабатывают 3-15% раствором серной кислоты с целью уничтожения посторонних микробов, а с другой — делают посевы на яичные среды (Петраньяни, Любенау-Гона, Левенштейна), содержащие краски, задерживающие рост посторонних микроорганизмов, но не препятствующие размножению туберкулезных микобактерий.

Выделенная на яичной среде культура в дальнейшем может сохраняться на других средах.

Посевы держат в термостате при 37-38° и наблюдают за появлением роста в течение 2-3 месяцев, отмечая время появления первых признаков роста.

Из выросших колоний делают окрашенные мазки и проверяют кислото- и спиртоустойчивость микробов.

Атипичные колонии (пигментные, гладкие, быстро растущие, легко образующие суспензию) отвивают на среды для дальнейшего изучения. При отсутствии роста в течение 8-10 недель берут соскоб с поверхности среды и микроскопией устанавливают наличие или отсутствие микророста.

В положительных случаях готовят взвесь из соскоба и инфицируют ее морским свинкам для определения вирулентности.

Выделение чистой культуры из того или иного патологического материала имеет свои особенности главным образом в части

предварительной обработки с целью подавления жизнедеятельности сопутствующей микрофлоры.

Мокрота. Наиболее распространенным методом обработки материала на туберкулез является метод Гона.

При этом методе мокроту собирают в стерильные баночки в утренние часы или в течение суток. Выбирают из нее гнойные частицы.

Последние исследуют в окрашенных по Цилю и Граму мазках. Затем берут около 3 мл мокроты (с гнойными комочками), добавляют 6 мл 6-10% раствора серной кислоты, энергично в течение 10 минут встряхивают до полной гомогенизации, потом центрифугируют в стерильной центрифужной пробирке, жидкость сливают, а осадок сеют на яичные среды. Действие серной кислоты (с момента добавления до момента посева, включая и время центрифугирования) должно длиться 20 минут.

Метод Прайса. Изготавливают мазки из патологического материала на нескольких хорошо обезжиренных и простерилизованных обжиганием предметных стеклах. Готовые мазки сначала погружают на 5 минут в 6% раствор серной кислоты, а затем промывают погружением в стерильный физиологический раствор. Промытые препараты вносят в жидкую питательную среду (1 часть цитратной крови и 3 части дистиллированной воды). Через 7-10 дней на мазках появляется рост в виде микроколоний, которые хорошо видны под микроскопом на мазках, окрашенных по Циль-Нильсену.

В патологических продуктах иногда вместе с бактериями туберкулеза встречаются кислотоустойчивые сапрофиты.

Некоторые виды сапрофитов отличаются от туберкулезных микобактерий тем, что легче обесцвечиваются смесью спирта с кислотой. Однако ряд сапрофитов (например, *M. smegmae*) не только кислотоустойчив, но и спиртоустойчив.

Их можно отличить от микобактерий туберкулеза только по культуральным и патогенным свойствам.

При инкубации в термостате рост проявляется через несколько дней, а не через 10-20 дней, как у туберкулезных микобактерий; инокуляция кислотоустойчивых сапрофитов морским свинкам не вызывает у них патологических изменений.

Определение спектра и степени чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам имеет существенное значение для тактики химиотерапии и для контроля за эффективностью лечения и определения прогноза заболевания.

Выделяют первичную лекарственную устойчивость (при развитии заболевания в результате инфицирования лекарственно-устойчивым штаммом МБТ), и вторичную (индуцированную, развившуюся в процессе лечения).

Причиной развития вторичной лекарственной устойчивости может послужить отказ больного от лечения и невыполнение предписаний врача, нерегулярный прием препаратов, прием препаратов в заниженных дозах, выбор неадекватной комбинации препаратов, монотерапия, сопутствующая соматическая патология, ограничивающая возможности применения комбинации противотуберкулезных препаратов.

В зависимости от спектра противотуберкулезных препаратов к которым выявляется устойчивость различают:

□ Монорезистентность – устойчивость к одному любому противотуберкулезному препарату.

□ Полирезистентность – устойчивость к двум и более противотуберкулезным препаратам, за исключением сочетания устойчивости к изониазиду и рифампицину.

□ Мультирезистентность - устойчивость к двум и более противотуберкулезным препаратам, при этом обязательно сочетание устойчивости к изониазиду и рифампицину.

Для определения чувствительности используют среды с добавлением различных концентраций противотуберкулезного препарата, на которые делается рассев МБТ, выросших при первичном посеве.

Параллельно засеваается контрольная пробирка, без добавления препаратов. Результаты исследования, с учетом сроков выделения МБТ на питательной среде, могут составить 2-2,5 месяца.

Учет лекарственной чувствительности производится через три недели после посева.

Чувствительными, к противотуберкулезным препаратам, считаются те МБТ, на которые препарат в концентрации, достигаемой в очаге инфекции, оказывает бактериостатическое или бактерицидное действие, независимо от внеклеточного или внутриклеточного их расположения.

При обнаружении МБТ хотя бы в одном анализе исследуемого материала и наличие рентгенологических изменений, подозрительных на туберкулез, врач выдает направление пациенту в противотуберкулезный диспансер для дальнейшего обследования с целью подтверждения или исключения диагноза туберкулеза.

1.2.3. Избирательная амплификация нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) *in vitro* метод ПЦР (полимеразной цепной реакции).

Является одним из наиболее быстрых и информативных методов выявления МБТ.

Принцип метода состоит в увеличении в $10^6 - 10^8$ раз числа копий специфического участка ДНК МБТ, катализируемого *in vitro* РНК – полимеразой в автоматическом режиме.

В искусственных условиях воспроизведение процесса репликации специфического или определенного вида или рода возбудителей участка генома возможно при условии знания его нуклеотидной последовательности.

Применение методов детекции продуктов репликации таких участков (ампликоны) позволяет констатировать наличие возбудителя в исследуемой пробе.

К достоинствам метода ПЦР относятся:

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

Вместе с тем, высокая разрешающая способность метода в ряде случаев может приводить к ложноположительным результатам, что ограничивает достоверность исследования.

1.3. Сбор, хранение и транспортировка мокроты.

Возбудитель туберкулеза относится к III группе учета патогенности, согласно Санитарным правилам СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности и гельминтами»², а так же по классификации ВОЗ 1983 года, к которым относятся инфекции, передающиеся воздушно – капельным или аэрозольным путем.

Исследование мокроты помогает установить характер патологического процесса в органах дыхания, а в ряде случаев определить его этиологию.

Мокрота - это выделения из дыхательных путей, которые образуются при воспалительных процессах в дыхательной системе, и выделяются при достаточном кашлевом толчке, всегда патологический материал, всегда заразный материал.

²Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2008 №4 «Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 (вместе с «санитарно-эпидемиологическими правилами «безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08»)»

Мокроту³ для исследования лучше брать утреннюю, свежую, по возможности до еды и после туалета полости рта (чистка зубов и полоскание кипяченой водой).

Собирают в чистую, с пробками посуду, доставляют в лабораторию и исследуют в тот же день.

Для сбора мокроты используются специальные контейнеры⁴, которые:

- Должны быть изготовлены из ударостойкого материала;
- Иметь плотно завинчивающиеся или герметически закрывающиеся крышки, не допускающие просачивания жидкости.
- Объем контейнера не должен превышать 20-50 мл.
- Иметь широкое отверстие (не менее 35 мм в диаметре).
- Из прозрачного материала, чтобы можно было оценить качество и количество собранной пробы.
- Легко подвергаться маркировке и надежно сохранять его на всем протяжении хранения, транспортировки и проведения исследования.

При отсутствии использования одноразовых контейнеров применяются стеклянные флаконы, которые используются многократно после дезинфекции, мытья и стерилизации.

Сбор мокроты весьма ответственный этап диагностической процедуры, от четкости которого во многом зависит результат исследования.

Необходимо помнить, что в момент откашливания больным мокроты создается очень высокий риск воздушно – капельного распространения инфекции.

³ Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».

⁴Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории.:МУ4.2.2039 – 05.Разработаны: МОНКИ им.М.Ф.Владимирского (К.И.Савицкая, Е.Е.Круглов);Главным бактериологом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (В.В.Кутырев);Центральным научно-исследовательским институтом эпидемиологии(Н.А.Семина, В.В.Галкин);ФГУЗ «Федеральным центром гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Е.Н.Беляев, И.В.Брагина, Н.С.Кривопалова); Научно-исследовательским институтом антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (Л.С.Страчунский, Р.С.Козлов);Научно-исследовательским институтом вирусологии им.Д.И.Ивановского (Д.Л.Урываев); Институтом медицинской паразитологии и тропической медицины им.Е.И.Марциновского ММА им. И.М.Сеченова (В.П.Сергиев, М.Н.Лебедева);Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (З.С.Серeda)

Поэтому сбор мокроты производится в специально выделенном помещении (кабинке), оснащенные бактерицидными лампами, средствами дезинфекции и вытяжной вентиляцией. На видном месте должны быть вывешены четкие и понятные инструкции, как правильно собрать мокроту.

Лица ответственные за сбор мокроты должны:

1. Объяснить больному, причины исследования и необходимость откашливать не слюну и носоглоточную слизь, а содержимое глубоких отделов дыхательных путей, что достигается в результате продуктивного кашля, возникающего после нескольких глубоких вдохов.

2. Участвующий в сборе мокроты, медицинский работник, помимо средств индивидуальной защиты, в помещении, должен находиться за спиной больного, чтобы направление движения воздуха было от него к больному. Медицинский работник должен открыть крышку контейнера и передать больному. В случае, когда сбор мокроты производится в специальной изолированной кабинке, работник может передать контейнер больному и наблюдать за процессом сбора мокроты через стекло.

3. По завершении процесса сбора мокроты медицинский работник должен закрыть контейнер крышкой, либо, проверить на сколько плотно его закрыл пациент.

4. Оценить количество и качество собранной мокроты. При достаточном количестве контейнер маркируют и помещают в специальный бикс для транспортировки в лабораторию.

Собранный материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию на исследование.

Срок хранения материала в нативном виде при комнатной температуре не должен превышать 24 часов.

Доставка в централизованную лабораторию должна осуществляться 1 – 2 раза в неделю при условии обязательного сохранения материала в холодильнике при 4°C в промежутках между доставками.

Для исследования достаточно 3-5 мл мокроты, но анализ можно проводить и при меньших объёмах. Анализ мокроты необходимо проводить не позднее, чем через 2 часа после сбора.

Рекомендуется до момента отправки в лабораторию хранить герметично закрытые контейнеры с мокротой в вертикальном положении в специально отведенном для этих целей холодильнике, срок хранения материала без добавления консервирующих средств не должен превышать 72 часов.

Для транспортировки материала рекомендуется пользоваться биксами или специальными транспортировочными ящиками с мягкими, легко стерилизующимися прокладками на дне и с гнездами или прокладками для контейнеров.

Прокладки, предохраняющие контейнер от повреждений должны обладать высокой адсорбционной способностью, с тем, чтобы в случае протечки они могли адсорбировать жидкость и ограничить участок загрязнения в пределах транспортировочного контейнера.

Во избежание протечки жидких материалов и нарушения целостности контейнеров последние должны быть закреплены в транспортировочных ящиках в вертикальном положении.

При транспортировке каждый бикс с контейнерами для сбора мокроты оформляется сопроводительный список, в который из регистрационного журнала медицинского учреждения переносятся данные о пациентах.

Сопроводительный лист составляется в 2 экземплярах: один экземпляр остается в лаборатории, другой – с подписью сотрудника принявшего материал для исследования, - возвращается с результатом в учреждение, направившее материал в лабораторию.

Перед отправкой собранного материала медицинский работник должен проверить:

1. Соответствует ли количество контейнеров с мокротой их количеству, указанному в сопроводительном списке.

2. Соответствует ли номер каждого контейнера номеру, указанному в списке.

3. Имеются ли в списке все необходимые данные о каждом пациенте.

После проверки в сопроводительном списке медработник:

1. Указывает дату отправки материала на исследование и ставит свою подпись.

2. Вкладывает в чистый конверт сопроводительный список и заполненные бланки направлений на каждую пробу материала и прикрепляет конверт к биксу снаружи.

3. Тщательно закрепляет бикс.

В соответствии с Приказом МЗ РФ № 380 клиническо – диагностические лаборатории лечебно – профилактических учреждений должны быть оборудованы вытяжными шкафами, подключенными к вытяжной локальной вентиляции.

Иметь отдельный вытяжной шкаф, предназначенный исключительно для проведения процедур приготовления, фиксации и окраски мазков из нативного материала методом Циля – Нильсена.

Должны быть средства индивидуальной защиты – маска, перчатки, халат, шапочка.

В каждой лаборатории работа должна быть организована в соответствии с требованиями органов Госсанэпиднадзора, инструкции по технике безопасности. Строгим соблюдением правил личной гигиены.

Все поверхности в лаборатории должны подвергаться регулярной дезинфекции с использованием соответствующих средств.

Дезинфекция воздуха и поверхностей помещения с помощью ультрафиолетового излучения должна проводиться ежедневно согласно графика.

Генеральная уборка помещений лаборатории производится регулярно в соответствии с утвержденным графиком.

Рабочая поверхность столов следует обрабатывать после каждой манипуляции.

Помещение лаборатории должно быть разделено на две зоны.

- Чистая зона.
- Заразная зона.

Вход в лабораторию посторонних лиц строго воспрещен.

Глава II. МЕТОДИКА ПРЯМОЙ МИКРОСКОПИИ МАЗКА, ОКРАШЕННОГО МЕТОДОМ ЦИЛЯ – НИЛЬСЕНА.

2.1. Преаналитический этап: прием и регистрация материала.

В зоне приема биоматериала должен находиться рабочий стол для приема, осмотра и последующей регистрации поступающих образцов, а также полка для хранения бланков с результатами анализов.

Наилучший способ подачи образцов в лабораторию через специальное окно для приема образцов.

Ящики с контейнерами должны открываться в вытяжном шкафу, шкафу биологической безопасности или на специально выделенном столе с соблюдением следующих требований:

1. Надеть средства индивидуальной защиты.
2. Произвести внешний осмотр ящика или бикса для транспортировки материала. В случае если обнаруживается загрязнение контейнера, то весь контейнер подлежит автоклавированию или утилизации.
3. Провести наружную обработку контейнера дезинфицирующим раствором.
4. Осторожно открыть ящик (бикс) проверить целостность контейнеров. Битые контейнеры помещаются в дезинфицирующий раствор или автоклавируются.

5. Материал выбраковывается, необходимо сообщить в отделение направивший материал и запросить повтор.
6. Извлечь контейнеры.
7. Проверить соответствие номеров в сопроводительном списке и направлениях номерам, обозначенным на контейнерах.
8. Продезинфицировать внутреннюю часть ящика (бикса), снять перчатки и поместить в контейнер с дезинфицирующим раствором, затем вымыть руки или обработать антисептиком.

Далее присвоить каждому образцу лабораторный номер.

В случае если поступивший образец от данного больного, присвойте ему первый свободный номер по журналу 04-ТБ/у.

Пометить соответствующим номером контейнер (на боковой спинке) и внести номер в бланк ответа 05-ТБ/у.

2.1.1. Оценка объема и качества поступающего материала.

Удовлетворительное качество материала подразумевает наличие в материале слизистой или слизисто-гноющей мокроты. Объем собранного материала должен быть в пределах 3-5 мл, можно и меньшее количество.

Отметить качество поступившего материала в журнале 04-ТБ/у и в бланке 05-ТБ/у.

Комната для приготовления, фиксации и окраски мазков, где должны находиться:

1. Вытяжной шкаф для приготовления, сушки и окраски мазков;
2. Контейнер для отработанных инфекционных материалов;
3. Вспомогательный рабочий стол;
4. Лабораторная раковина;
5. Раковина для мытья рук;
6. УФ-облучатель.

Кроме того, в данном помещении могут находиться:

1. Сухожаровой шкаф (для фиксации мазков);
2. Холодильник (для хранения проб мокроты).

Процедура для приготовления мазков начинается с подготовки предметных стекол. Стекла должны быть новые, отмытые и обеззараженные в спирте или смеси Никифорова (96° этиловый спирт + эфир, соотношение 1:1) стекла без царапин и сколов.

Перед началом приготовления мазков необходимо подготовить рабочее место, предназначенное для проведения этой процедуры.

Приготовление мазков производят в вытяжном шкафу.

Мазки готовят в количестве, с которым удобно и безопасно работать (максимум до 12 мазков).

Маркировка стекол должна осуществляться карандашом.

Наибольшая вероятность найти кислотоустойчивые микобактерии в не концентрированном материале представляется при исследовании плотных и твердых комочков в мокроте, и результат прямого микроскопического исследования в большей степени зависит от выбора именно этих комочков.

Методика приготовления мазка.

- 1) Промаркировать предметное стекло с одного края тем же номером, что и контейнер с мокротой.
- 2) Выбрать в мокроте комочки рядом с кровяными прожилками, непрозрачные, сероватого или желтого оттенка.
- 3) Переносим требуемое количество материала на предметное стекло, используя деревянную палочку или бактериологическую петлю.
- 4) Материал надо распределить по предметному стеклу на площади примерно 2x1; толщина мазка должна позволять читать газетный текст.
- 5) Сбросить аппликаторные палочки в дезинфицирующий раствор, использовать новые каждый раз. При использовании бактериальной петли каждый раз обжигать на пламени горелки.
- 6) Оставить мазки на воздухе для высыхания.

7) Фиксация проводится над пламенем горелки, надо 3 раза провести.

В отличие от других бактерий микобактерии способны удерживать красители даже после обработки обесцвечивающим раствором кислого спирта или 25% кислоты.

Поэтому окраска проводится по методу Циля-Нильсена. Для проникновения красителя в бактериальную клетку ее клеточную стенку повреждают фенолом и производят подогрев мазка.

2.1.2. Процедура окраски методом Циля-Нильсена.

1) Маркированные фиксированные мазки помещают на специальный штатив так, чтобы они не касались друг друга, а их маркировка была направлена в одну сторону.

2) На фиксированный материал накладывают полоску фильтровальной бумаги, размером чуть меньше предметного стекла. Для того чтобы краска не разливалась по стеклу.

3) На бумагу наливают раствор карболового фуксина и нагревают препарат над пламенем горелки до появления легкого облачка паров, не допуская закипания краски и подсыхания бумаги.

4) Мазок оставляют на 5 минут с красителем. Чтобы он проник в клеточную стенку микобактерий и окрасил её.

5) Осторожно снимают фильтровальную бумагу и помещают её в емкость с дезинфицирующим раствором.

6) Осторожно смываем остатки краски слабой струей проточной воды или водой из резервуара.

7) После каждой процедуры промывки во избежание разбавления реактивов каждое стекло с мазком, пинцетом аккуратно ставим на ребро, чтобы стекли остатки воды.

8) Мазок обесцвечиваем 25% раствором серной кислоты или 3% солянокислым спиртом. Продолжительность процедуры обесцвечивания – 3 минуты.

9) Мазок промываем водой.

10) Докрашиваем 0,3% раствором метиленового синего в течении 60 секунд.

11) Мазок промываем водой.

12) Высушиваем при комнатной температуре в вертикальном положении.

В результате микобактерии туберкулеза окрашиваются в малиново – красный цвет, а другие микроорганизмы и клеточные элементы – голубой.

Препарат микрокопируют с масляной иммерсией в световом микроскопе.

2.2. Аналитический этап: микроскопическое исследование.

Микроскопная комната, в которой должны находиться:

- 1) Стол для микроскопии;
- 2) Стол для учета и регистрации результатов исследования;
- 3) Шкафчик для хранения исследованных препаратов;
- 4) Раковина для мытья рук.

Для исследования мазков, окрашенных по Цилю – Нильсену, используют световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом (x100) и окуляром x 7 – 10.

Исследование 100 полей зрения достаточно для выявления в мазке единичных кислотоустойчивых бактерий при их концентрации в мокроте около 5 - 10 тыс. в мл мокроты.

В мазке площадью 2 x 1,5 см количество микроскопических полей зрения от края до края будет примерно соответствовать 100.

При значительном количестве кислотоустойчивых микобактерий в каждом из полей зрения (от 1 до 10 КУМ⁵) допустимо исследовать 50 полей зрения.

При обнаружении более 10 кислотоустойчивых бактерий в 1 поле зрения в каждом из просматриваемых полей достаточно просмотреть 20 полей зрения.

При микроскопическом исследовании мазка, необходимо дать количественную оценку препарату.

По окончании микроскопического исследования стекла очищают от иммерсионного масла, накрыв фильтровальной бумагой и нанесением 1 – 2 каплями ксилола, спирта или спиртоэфирной смеси;

2.3. Постаналитический этап: регистрация результатов.

Микроскопическое исследование должно выявить в мазке кислотоустойчивые палочковидные формы микобактерий и определить их количество в поле зрения. Оценка мазка производится после просмотра 100 полей зрения. Ответ заполняется в бланке 05-ТБ/у.

Градация результатов микроскопического исследования.

| Число палочек | Поля | Результат |
|---------------|---------------|---|
| Нет | На 300 полей | Отрицательный, КУМ не обнаружены |
| 1 – 2 | На 300 полей | Результат не оценивается |
| 3 – 9 | На 100 полей | Положительный, указать точное количество |
| 10 – 99 | На 100 полей | Положительный, 1+ (от 10 до 99 КУМ) |
| 1 – 10 | В поле зрения | Положительный, 2+ (1 -10 КУМ в 1 поле зрения) |
| Более 10 | В поле зрения | Положительный, 3+ (более 10 КУМ в 20 п/з) |

⁵ Кислотоустойчивые микобактерии

Отрицательный результат: для всех препаратов, в которых в 300 полях зрения не были найдены кислотоустойчивые бактерии, выделяется результат «КУМ не обнаружены».

Результат не оценивается: «1 – 3 КУМ на 300 полей зрения» не подтверждается методом посева. Этот результат трактуется как «сомнительный», по решению лечащего врача такой анализ должен быть повторен.

Положительный результат: вписывается красными чернилами в лабораторный журнал и в бланк ответа.

Число КУМ, найденных в мазке указывает степень контагиозности больного, а также форму туберкулезного процесса.

Различают 4 уровня положительного ответа:

- 1) Единичные – указывается количество КУМ на 100 полей зрения;
- 2) 1+;
- 3) 2+;
- 4) 3+;

При заполнении ответа в бланках вносятся лабораторный номер исследования так же должны содержаться:

1. Дата проведения исследования;
2. Результаты микроскопических исследований;
3. Дата выдачи результата;
4. Подпись лаборанта;

Результат выдается как можно скорее, но не позднее 24 часов с момента поступлений порции материала в лабораторию.

Положительный результат исследования необходимо немедленно сообщить лечащему врачу, направившего пациента на обследование.

Результаты выдаются строго среднему медперсоналу отделений, курьеру.

При отрицательном результате анализа мокроты ответ выдается после проведения всех трех проб мокроты.

ВЫВОД.

Микобактерия туберкулеза (МБТ) - факультативные внутриклеточные паразиты.

Заболевание, вызываемое *M. tuberculosis* (МБТ), - бактерии Коха (БК), *typushumanus*.

Факультативные внутриклеточные паразиты.

Семейство: *Micobacteriaceae*, порядку *Actinomycetales*,

Род *Mycobacterium*

Открытый, немецким ученым Робертом Кохом в 1882г.

Представляют собой тонкие изогнутые палочки, стойкие к кислотам, щелочам и высыханию.

Наружная оболочка бактерии содержит сложные воска и гликолипиды.

Естественный резервуар туберкулезной микобактерии — человек, домашние и дикие животные, птицы.

МБТ внешне представляют собой тонкие изогнутые палочки, стойкие к кислотам, щелочам и высыханию.

Размножение происходит в основном путем простого клеточного деления.

Обладают устойчивостью к физическим, химическим агентам и факторам внешней среды.

Липиды поверхностной стенки микобактерий определяют ее вирулентность и способность к образованию в культуре скоплений бактерий в виде кос (корд-фактор).

Является широко распространенным инфекционным, социально - обусловленным и эпидемически опасным заболеванием, передающимся, в основном воздушно - капельным путем и способным поражать любые органы и ткани человека.

Одним из основных направлений в лабораторной диагностике туберкулеза является установление факта бактериовыделения, либо

подтверждение его прекращения (абациллирования). Поэтому, методике выявления возбудителя в различном патологическом материале должно уделяться большое внимание.

Правильное суждение о динамике бактериовыделения, стойкости достигнутого в процессе лечения абациллирования важно для правильного планирования организации противотуберкулезной службы и осуществления противотуберкулезных мероприятий как на стационарном, так и на амбулаторном этапе.

Методами выявления туберкулеза:

Бактериоскопия: Метод окраски по Циль-Нельсену.

Основным красителем является карбол – фуксиновый.

Главный принцип этого метода — в способности наружной оболочки МБТ адсорбировать карбол-фуксин.

Поглощая красный карбол-фуксин, наружная мембрана МБТ настолько прочно связывает краску, что ее нельзя удалить обработкой серной кислотой или солянокислым спиртом. Затем образец обрабатывается метиленовым синим.

На основании микроскопического исследования можно сделать заключение только о наличии или отсутствии в препарате КУМ.

Люминесцентная микроскопия: Увеличивает разрешающую способность микроскопии по сравнению с окраской по Циль-Нельсену на 14—30%. Для окраски используют флюорохромы — органические красители, флюоресцирующие при освещении ультрафиолетовыми, фиолетовыми или синими лучами. Такими красителями являются аурамин 00 и родамин С. Препарат исследуют с помощью люминесцентного микроскопа: микобактерии светятся золотисто-желтым цветом на темном фоне.

Бактериологическая: Культуральные исследования материала позволяют подтвердить наличие МБТ при низком уровне концентрации (100 МБТ/мл), определить вид микобактерии и чувствительность к

противотуберкулезным препаратам. Период получения результатов длительный — от 2 до 8 недель.

ПЦР: Развитие и совершенствование молекулярно-диагностических методов открыло новые перспективы для быстрого выявления микобактерий в клинических образцах. Наибольшее распространение получил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод основан на амплификации особых фрагментов бациллярной ДНК, которая обнаруживается в диагностических образцах.

Реакция ПЦР позволяет проводить идентификацию МБТ в диагностическом материале за 5-6 ч (включая обработку материала) и обладает высокой специфичностью и чувствительностью (в диапазоне от 1-10 клеток в образце).

Таким образом, снижение распространения, эффективного лечения данного заболевания напрямую зависит не только от ежегодного прохождения ФЛГ. Но и от правильно поставленного диагноза.

В результате изучения этиологии и патогенеза микобактерий, методов исследования и выделения микобактерий туберкулеза пришли к выводу:

Основным является метод прямой микроскопии окрашенных мазков по Цилю – Нильсена. Как доступный, экономически не требующий больших затрат, простой. Имеем возможность получения результата в течении 1 часа.

В современных условиях проведения противотуберкулезной пропаганды, популяризация среди населения знаний по профилактике, выявлению и организации борьбы с туберкулезом является одним из главных разделов работы каждого медработника.

Для этого необходимо, не только медицинскому персоналу но и работникам лабораторной службы, вести разъяснительную работу по правильному сбору и сдаче анализов на различные виды лабораторных исследований не только больным людям, ухаживающим, но и здоровым.

Информировать о правилах гигиенического поведения в процессе лечения и после выписки из больницы больным туберкулезом, убедить их в необходимости выполнять рекомендации врача во внебольничных условиях.

Вести беседу по различным вопросам здорового образа жизни, об ограничении и отказа от вредных привычек: курении, употребления алкоголя, рациональном питании, по вопросам профилактики различных заболеваний внутренних органов, СПИДе, венерических болезней.

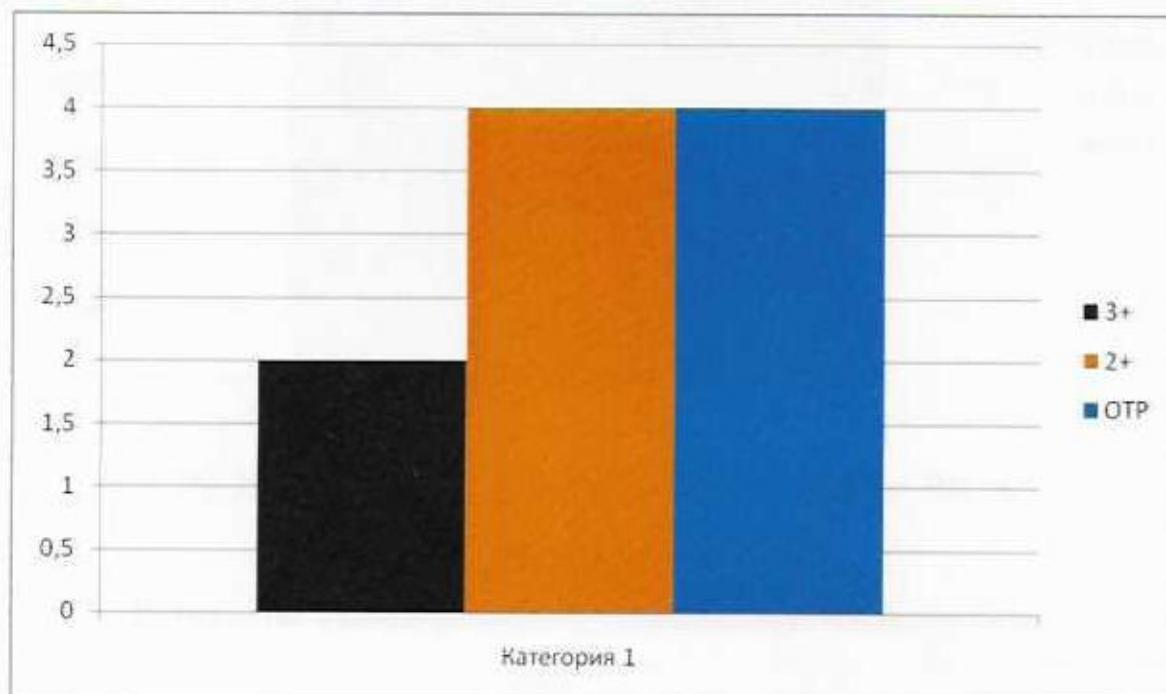
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борьба с туберкулезом на Крайнем Севере (итоги, проблемы, перспективы). Якутск. 2002г.
2. Вопросы формирования здоровья и патологии человека на Севере: факты, проблемы и перспективы. Якутск. 2002г.
3. Граймер М.С., Фрейши М.И. Раннее выявление туберкулеза легких. 1986г.
4. Г.Ф. Оттен, А.В. Васильев Микобактериоз 2005г
5. Долгов В.В, Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика-национальное руководство 2012г.
6. Ж. Проблемы туберкулеза. №5, №2. 2010г.
7. Ж. Якутский медицинский журнал. №1, 2005г.
8. Корякин В.А., Пирельман М.И., Протопопова Н.М. Туберкулез. 1990г.
9. Лебединский А.С. Руководство по медицинской микробиологии 2008г.
10. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. Меньшикова В.В. Москва. 1999г.
11. Приказ МЗ РФ от 21 марта 2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
12. Приказ МЗ РФ №380 от 25.12.1997 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения РФ».
13. Проблемы туберкулеза в Якутии (эпидемиология, организация, лечение). Якутск. 2002г., гл. ред. Тырылгын М.А.
14. Применение биохимических методов исследования в противотуберкулезных учреждениях. Методические рекомендации. Москва. 1997 г.

15. Социально-экономические проблемы туберкулеза на территориях Крайнего Севера. (Тезисы межрегиональной научно-практической конференции), 1992г.

16. Хомченко А.Г. Туберкулез органов дыхания. 1998г.

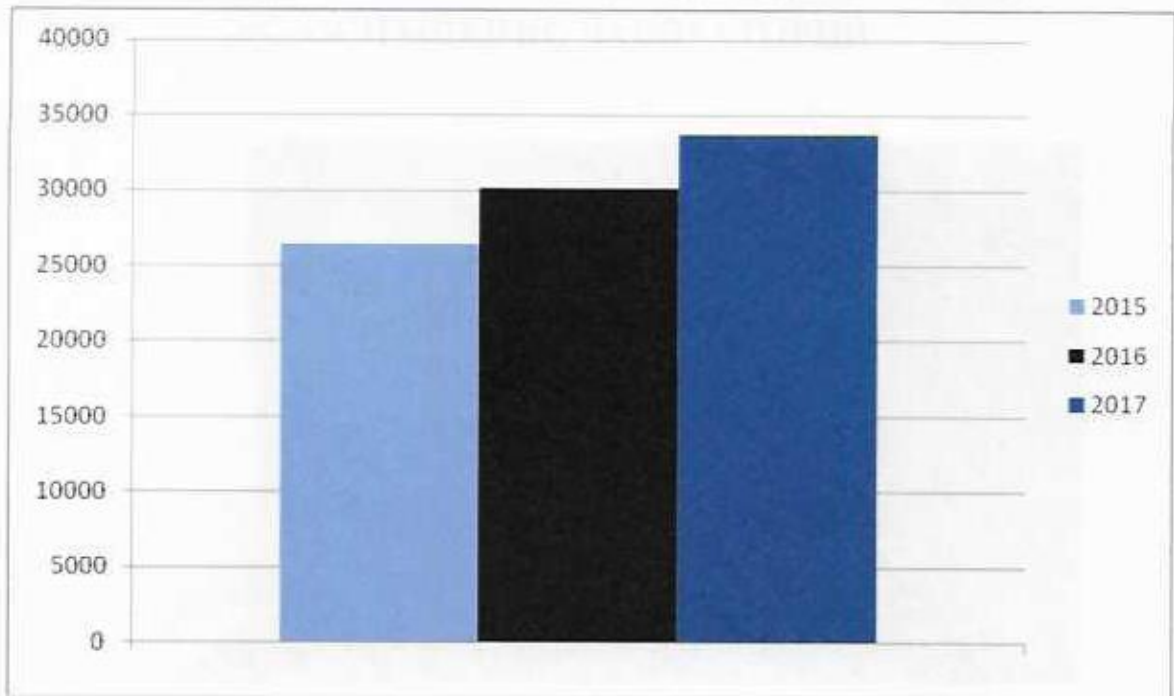
Приложение А.
СТАТИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЙ.



АНАЛИТИКА

Из 10 поступивших биоматериалов выполнено
2 результата 3+; 4 результата 2+; 4 результата «ОТР» из них:
1– состоит на диспансерном учете; 2– контакт.

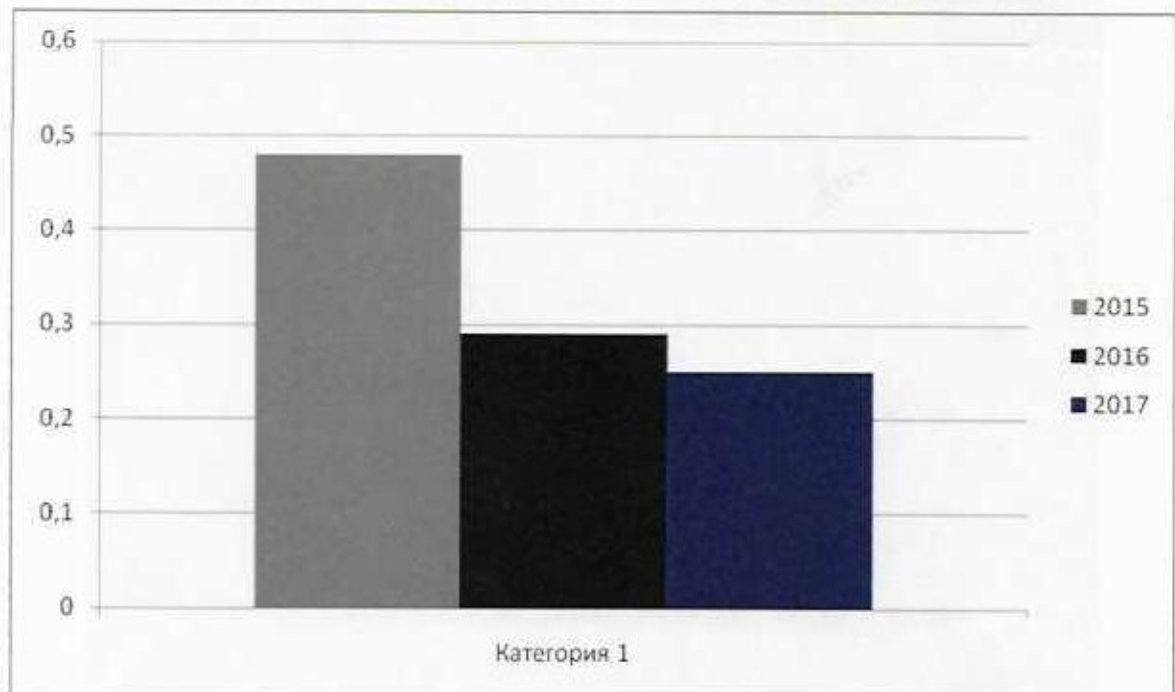
Обследовано лиц по РС(Я) за период 2015 – 2017гг.



2015г обследовано 26444. 2016г обследовано 30174.

2017г обследовано 33764.

Выявлено туберкулеза методом прямой микроскопии.



2015г выявлено 127 (0,48%), 2016г выявлено 88 (0,29%),

2017г выявлено 85 (0,25%).

Приложение Б.
ОСНАЩЕНИЕ ЛАБОРАТОРИИ.



Ламинарный шкаф для фиксации и подготовки мазка к окраске по Циль-Нильсену.

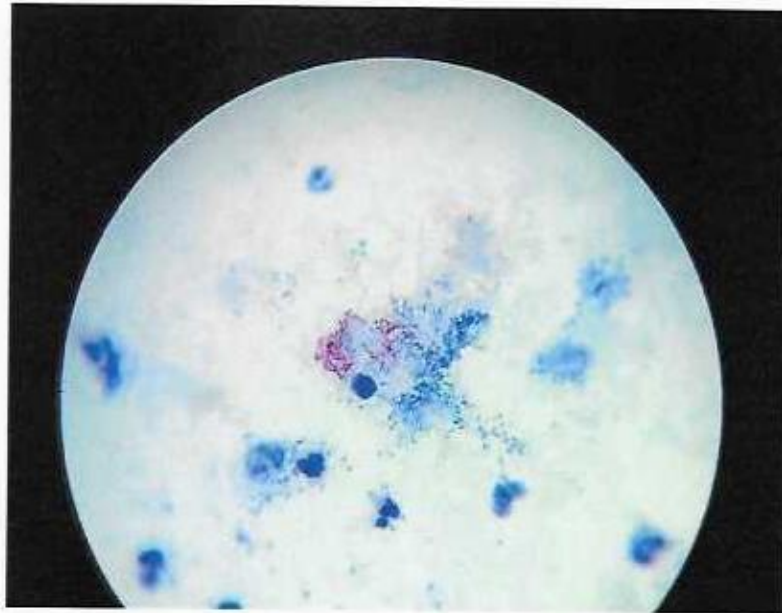


Вытяжной шкаф для окраски по Циль-Нильсену.

Микобактерии туберкулеза

Простая микроскопия

Окраска по Циль – Нильсену.



Микобактерии туберкулеза — тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1 -10 (чаще 1-4) мкм, шириной 0,2-0,6 мкм, гомогенные или зернистые с незначительно закругленными концами. Они неподвижны, не образуют эндоспор, конидий и капсул. Морфология и размеры бактериальных клеток подвержены значительным колебаниям и во многом зависят от возраста микроорганизма и особенно от условий его существования и состава питательной среды.