

**АО «Медицинский университет Астана»
Кафедра фтизиатрии**

Бактериологическая диагностика туберкулеза . Молекулярно–генетические методы диагностики



Подготовила : Альпейсова Мээрим

Проверила : Бекембаева Г.С

Группа : 664

Нур-Султан 2019

План :

1. Бактериологическая диагностика туберкулеза

- Микроскопия мокроты
- Бак посев мокроты на жидкие и твердые питательные среды



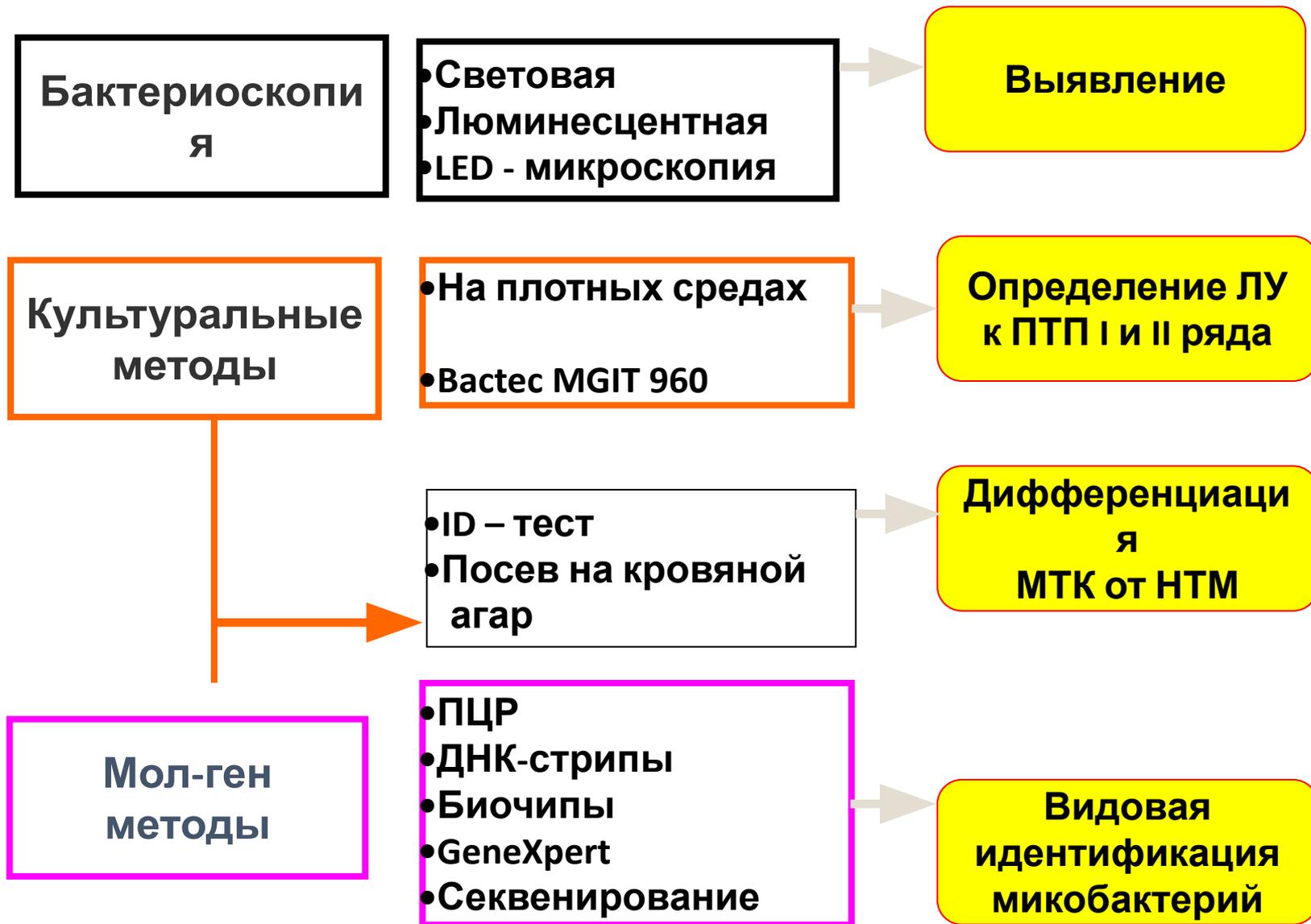
2. Молекулярно – генетические методы диагностики

- Найн-тест , Джэн эксперт



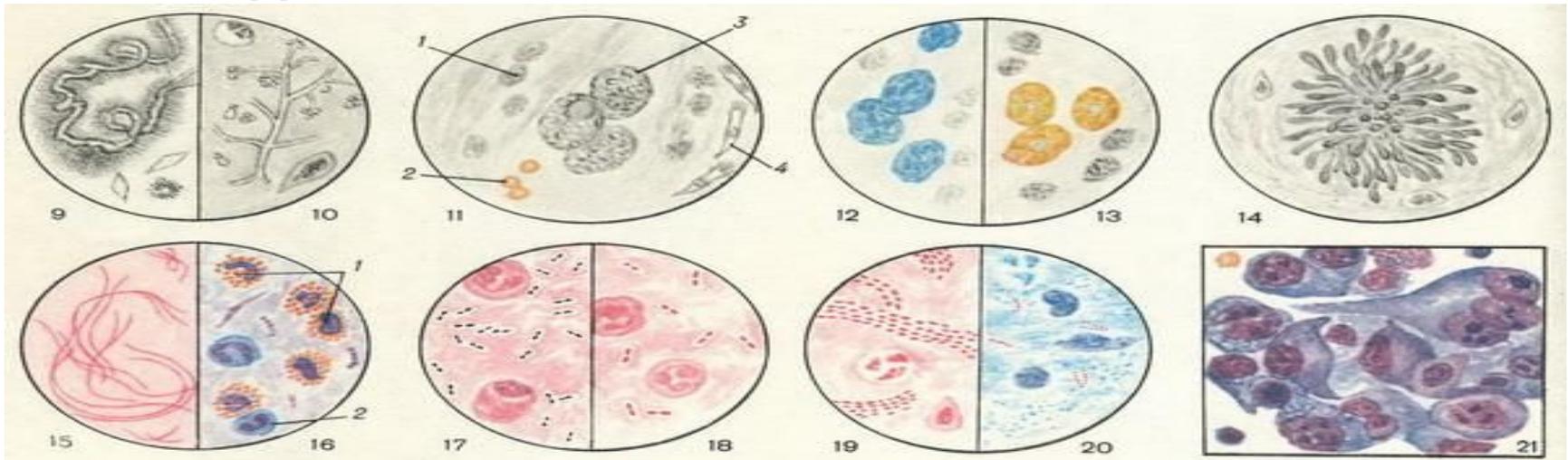
Алгоритм диагностики туберкулеза в лабораториях с комплексом бактериологических и ПЦР исследований

Диагностика туберкулеза



КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ

1. Осмотр.
2. Измерение количества.
3. Определение физических и химических свойств.
4. Микроскопическое, бактериоскопическое, бактериологическое и цитологическое исследование.



Микроскопическое исследование

Микроскопическое исследование мокроты проводят в свежих неокрашенных и фиксированных окрашенных препаратах.

1. Обнаруживаем: элементы крови (нейтрофилы, лимфоциты, эритроциты), цилиндрический, плоский эпителий, волокнистые структуры, кристаллические образования, бактериальную флору, простейших, паразитов
2. При микроскопии судим о причине воспаления, характере, остроте воспалительного процесса. Можем выявить признаки аллергического процесса и деструктивные изменения в легочной ткани.

НА ОСНОВАНИИ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗМОЖНО СДЕЛАТЬ ЗАКЛЮЧЕНИЕ ТОЛЬКО О НАЛИЧИИ ИЛИ ОТСУТСТВИИ В ПРЕПАРАТЕ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ.

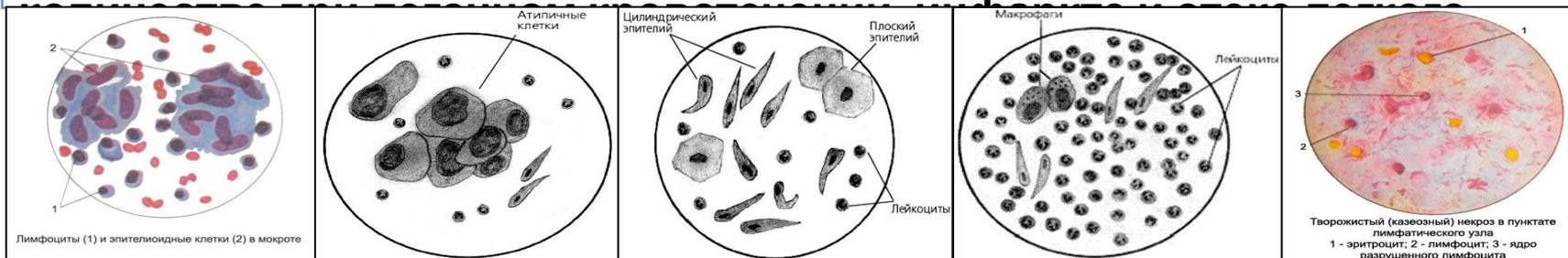
Это объясняется тем, что в природе существует большое число нетуберкулезных кислотоустойчивых микобактерий, вызывающих микобактериозы, а также кислотоустойчивых сапрофитов, не вызывающих заболевания человека.

Микроскопически они неотличимы от *Mycobacterium tuberculosis*.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Клеточные элементы:

- ❖ **Плоский эпителий** (ротовая полость, носоглотка, голосовые связки).
Одиночные клетки встречаются всегда, в большом количестве – при примеси слюны, воспалении в ротовой полости.
- ❖ **Цилиндрический эпителий** (слизистая бронхов и трахеи). В большом количестве при приступе БА, остром бронхите, катаральных поражениях верхних дыхательных путей.
- ❖ **Макрофаги** – воспалительные процессы в бронхах и легочной ткани.
- ❖ **Сидерофаги** – застойные явления в малом круге кровообращения, синдром Гудпасчера, легочный гемосидероз.
- ❖ **Опухолевые клетки** (плоскоклеточный и железистый рак, аденокарцинома).
- ❖ **Лейкоциты:** в слизистой мокроте – единичные, в гнойной – сплошь (иногда эозинофилы – крупные лейкоциты с темной зернистостью)
- ❖ **Эритроциты** : единичные м.б. в любой мокроте, в большом

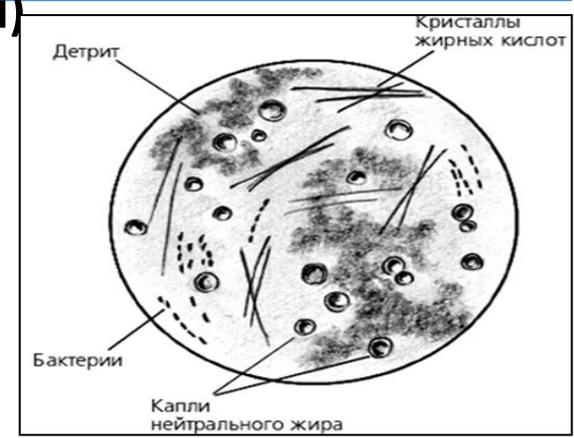
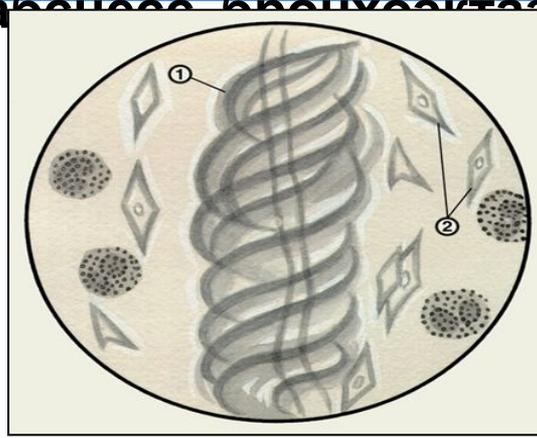
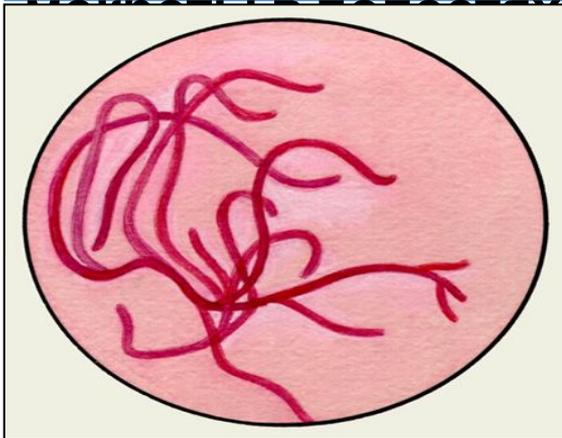


МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Включения:

- ❖ **Эластические волокна** – указывают на распад легочной ткани (туберкулез; абсцесс легкого, новообразования).
- ❖ **Фибринозные волокна** – (фибринозный бронхит; туберкулез, актиномикоз, крупозная пневмония).
- ❖ **Спирали Куршмана** – уплотненные, закрученные в спираль образования из слизи (бронхиальная астма).
- ❖ **Кристаллы Шарко-Лейдена** – возникают при распаде эозинофилов и кристаллизации их белков (БА, глистные поражения легких).
- ❖ **Кристаллы холестерина, жирных кислот** образуются при застое

(абсцесс бронхоэктазы)



Чтобы обнаружить микобактерии туберкулеза методами микроскопии, в 1 мл исследуемого материала должно содержаться не менее 10000 микробных клеток. В мокроте больных с туберкулезом органов дыхания (особенно при наличии у них полостей распада легочной ткани) обычно содержится значительное количество кислотоустойчивых бактерий, что позволяет выявить их при микроскопическом исследовании. Однако бактериовыделение не является регулярным процессом, и это требует определенной тактики сбора материала. Чувствительность этого метода можно повысить, если ввести кратность обследования пациента.



Установлено, что при последовательных исследованиях результативность микроскопической диагностики туберкулеза органов дыхания повышается следующим образом: при однократном исследовании - 80 - 83%, двукратном - на 10 - 14% больше и при исследовании трех проб мокроты - еще на 5 - 8% больше. Таким образом, при подозрении на туберкулез органов дыхания рекомендуется исследовать не менее трех проб мокроты.

ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РЕЗУЛЬТАТ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕ ИСКЛЮЧАЕТ ДИАГНОЗ ТУБЕРКУЛЕЗА, ТАК КАК В МОКРОТЕ ПАЦИЕНТА МОЖЕТ СОДЕРЖАТЬСЯ МЕНЬШЕ МИКОБАКТЕРИЙ, ЧЕМ МОЖЕТ ВЫЯВИТЬ МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.

Эффективность бактериоскопии существенно возрастает, если контролируется качество собираемого материала. Нарушение технологий подготовки мазков может быть причиной отрицательного результата микроскопического исследования.

Метод окраски по Ziehl-Neelsen является наиболее распространенным методом для выявления кислотоустойчивых микобактерий. Он основан на использовании нескольких специальных методических приемов:

- окраска фуксином (с подогреванием) - при одновременном воздействии нагревания и сильного протравливающего действия карболовой кислоты повышается способность красителя проникать в микробную клетку и особенно в структуры ее клеточной стенки, состоящей из липидов, миколовых кислот и восков. Обычные анилиновые красители не проникают в клеточную стенку микобактерий, и последние не окрашиваются;

- обесцвечивание (3 мин.) - последующая обработка мазка 25% раствором серной кислоты или 3% раствором солянокислого спирта приводит к обесцвечиванию красителя, проникшего в структуры, не обладающие достаточной гидрофобностью и стойкостью к разрушению в кислоте (кислотоустойчивостью). Только кислото- и спиртоустойчивые микроорганизмы стойко удерживают краситель и остаются после обесцвечивания окрашенными в малиново-красный цвет;

- контрастирующая окраска (1 мин.) - обесцвеченные элементы мазка докрасивают метиленовым синим для придания контрастности препарату.

Техника микроскопического исследования препарата

Для проведения микроскопического исследования при окраске по методу Ziehl-Neelsen необходимы:

- бинокулярный микроскоп;
- иммерсионное масло;
- капельница для нанесения масла на препарат;
- штатив с окрашенными и высушенными мазками, которые должны быть расположены в порядке номеров регистрации;
- емкость с ксилолом, спирто-эфирной смесью или 70° спиртом;
- фильтровальная бумага для удаления иммерсионного масла с поверхности просмотренного препарата;
- коробки для хранения просмотренных мазков;
- мягкая хлопчатобумажная ткань, бумажные салфетки или марлевые тампоны для протирания линз микроскопа;
- бумага и ручка для записи результатов микроскопического исследования;
- емкость с дезинфицирующим средством.

Для исследования мазков, окрашенных по Ziehl-Neelsen, используют световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом 90x или 100x и окулярами 7x или 10x.

ГРАДАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОСКОПИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОКРАСКЕ ПО МЕТОДУ ZIENL-NEELSEN

Результат исследования	Минимальное число полей зрения (п/з), обязательных для просмотра	Форма записи результата	Интерпретация результата исследования
КУМ не обнаружены в 300 п/з	300	ОТР	Отрицательный
1 - 2 КУМ в 300 п/з	300	Рекомендуется повторить исследование	Результат не оценивается
1 - 9 КУМ в 100 п/з	100	" ____ " КУМ в 100 п/з <*>	Положительный
10 - 99 КУМ в 100 п/з	100	1+ <*>	Положительный
1 - 10 КУМ в 1 п/з	50	2+ <*>	Положительный
Более 10 КУМ в 1 п/з	20	3+ <*>	Положительный

Количество кислотоустойчивых микобактерий (КУМ), обнаруживаемых при микроскопическом исследовании, является очень важным информационным показателем, так как оно характеризует степень эпидемической опасности больного и тяжесть заболевания.

Результаты микроскопического исследования следует передавать в медицинское учреждение или непосредственно врачу, направившему материал на исследование.

Результаты бактериоскопии следует отсылать как можно быстрее - желательно в течение 24 часов с момента получения проб мокроты.

Необходимо еженедельно и ежемесячно обобщать и анализировать полученные данные для ведения статистики исследований.

Бактериоскопическому исследованию подлежат обратившиеся в медицинские учреждения лица:

- ❖ с явными симптомами туберкулеза органов дыхания
- ❖ с наличием продолжительного (более 3 недель) кашля, сопровождающегося выделением мокроты, особенно с кровью, и жалобами на боли в груди
- ❖ контактировавшие с больными, имеющими положительный результат бактериоскопического исследования и соответствующие симптомы заболевания
- ❖ имеющие рентгенологические изменения в легких, подозрительные в отношении туберкулеза

Бактериоскопическому исследованию подвергается самый разнообразный материал: мокрота, промывные воды бронхов, желудка, экссудат, отделяемое ран, свищей, моча, ликвор, менструальная кровь и др. Наиболее часто исследуется мокрота.

+ Бактериоскопический метод диагностики туберкулеза легких – простой и экономичный, быстрый, выполнимый в любом медицинском учреждении, позволяющий при положительном результате мазка мокроты подтвердить диагноз туберкулеза.

■ Недостатком метода можно считать его низкую чувствительность. Для повышения чувствительности метода используют методики обогащения материала (флотация, седиментация) и окраску люминисцентными красителями

Препарат готовят из гнойных частиц мокроты, которые выбирают из нескольких мест. Отобранные частицы тщательно растирают между двумя предметными стеклами до гомогенной массы. Высушивают на воздухе, фиксируют над пламенем. Мазки из жидкого содержимого (БАС, промывные воды, моча, экссудаты и т.д.) готовят из осадка материала, обработанного кислотой, после

центрифугирования

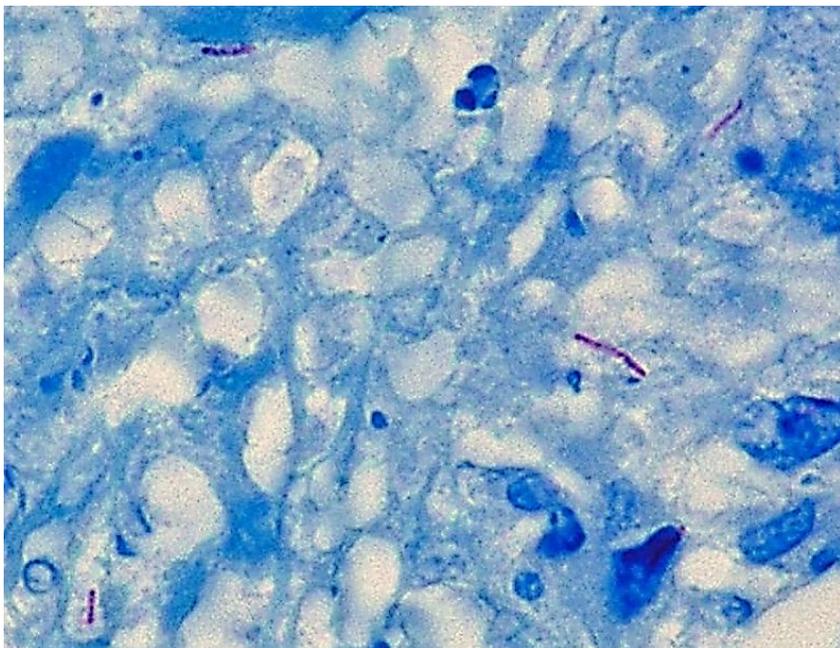
При этом избегают следующих ошибок:

- Изготовление слишком толстых препаратов (трудно искать МБТ)
- - Фиксирование плохо высушенных мазков (получается плохая окраска)
- Недостаточная фиксация (наблюдается сползание препарата)
- Длительная фиксация над пламенем (обугливание мокроты, что сильно отражается на качестве мазка)

Методика окраски: После фиксации мазка в пламени горелки, он обрабатывается карболовым раствором фуксина. Под действием входящего в его состав фенола (карболовая кислота) облегчается проникновение в дальнейшем анилинового красителя в микробную клетку, стенка которой «защищена» от проникновения обычных красителей слоем липидов и миколовых кислот. Затем обесцвечивают некислотоустойчивые микроорганизмы 5% раствором серной кислоты или 3% солянокислым спиртом. Микобактерии стойко удерживают краситель и остаются окрашенными в красный цвет. Обесцвеченные структуры докрасивают мителеновым синим.

Микобактерии обнаруживаются в препарате в виде тонких, прямых или слегка изогнутых палочек, красного или малинового цвета на синем фоне. Иногда они располагаются в препарате в виде римской цифры V, часто скоплениями. Иногда в их структуре определяются более интенсивные зерна (зернистые формы). В связи с приемом противотуберкулезных препаратов, изменяющих морфологию микобактерий, могут обнаруживаться их ветвистые формы, бледноокрашенные палочки (частично утратившие кислотоустойчивость), осколки.

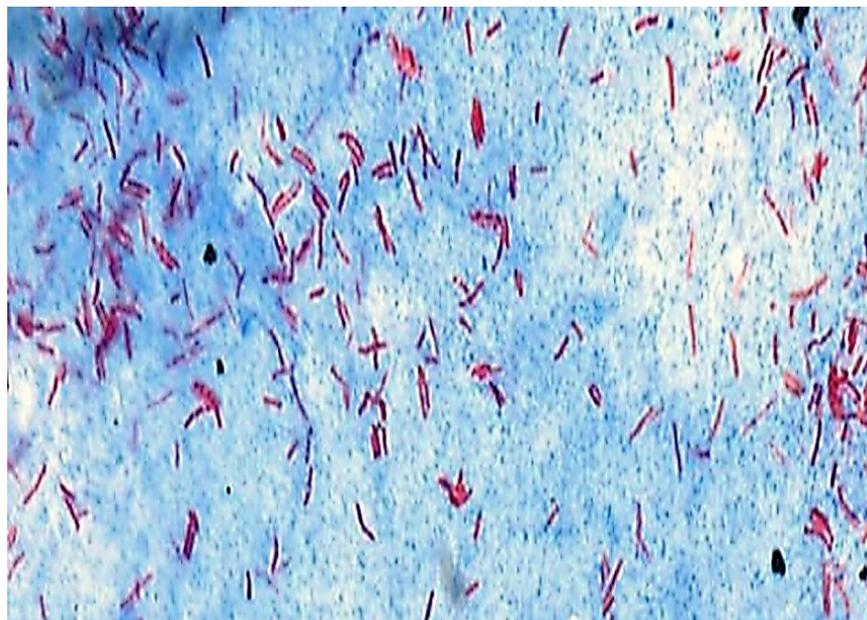
*Прямая окраска
мазка мокроты по Цилю-
Нильсену*



При окраске карболовым
фуксином МБТ выявляются в
виде тонких, слегка изогнутых
палочек малиново-красного
цвета, содержащих различное
количество гранул

*Мазок из флотационного
слоя*

по Цилю-Нильсену



Люминесцентный метод

(окраска родамин-

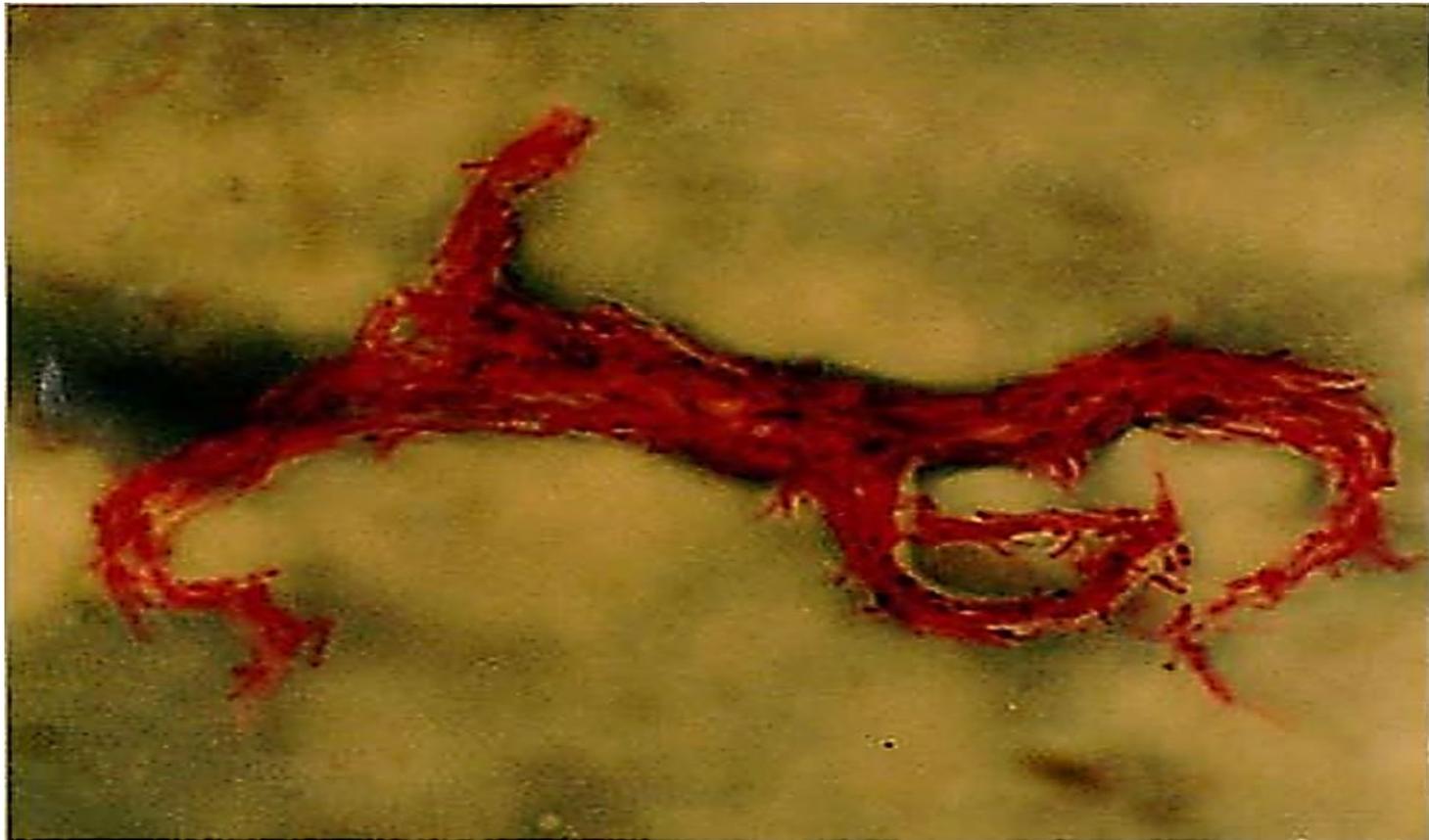
ау

Люминесцентная бактериоскопия основана на различии свечения микропируемого объекта в ультрафиолетовом или коротковолновом спектре света. Окраска производится флюорохромами – органическими красителями (аурин, родамин). МБТ под действием УФ-лучей в темном поле люминесцентного микроскопа светятся в виде золотистого цвета палочек.



Метод микрокультур Прайса

Густой мазок мокроты на стекле обрабатывают кислотой, не фиксируют и помещают в сыворотку; через 5-7 дней окрашивают по Цилю-Нильсену; при наличии **корд-фактора** видны слипшиеся в жгуты



Бактериологический метод

Бактериологический (культуральный) метод имеет ряд преимуществ перед микроскопическим и другими методами. Основное преимущество состоит в возможности обнаружения скудного количества жизнеспособных МБТ в клиническом материале: положительные результаты получают при наличии в исследуемом материале от 20 до 100 жизнеспособных микробных клеток в 1 мл. Однако ему свойственны и недостатки, обусловленные длительностью сроков появления видимых колоний микобактерий туберкулеза. В тоже время возможность получения чистой культуры возбудителя, которая может быть подробно исследована, позволяет решать вопросы изучения ее лекарственной чувствительности, вирулентности и других биологических свойств (типовой принадлежности)

Для нормального развития МБТ требуются специальные питательные среды, содержащие углерод, азот, водород, кислород, фосфор, магний, калий, а также железо, хлор, натрий, серу. Кроме того, для полноценного развития МБТ, как и других микроорганизмов, необходимо наличие факторов роста, которые в минимальных количествах улучшает рост бактерий на средах. Факторы роста не входят в состав ферментных систем клетки, но используются для их построения. Известны факторы роста, родственные по своей природе витаминам группы В, ряд аминокислот, органических кислот и липидов. Все эти факторы содержатся в разных количествах в питательных средах – яичных, кровяных, картофельных.

**По составу среды можно
разделить на 3 группы:**

**1. среды, содержащие
глицерин;**

**2. белковые среды
(сывороточные, яичные);**

**3. синтетические
(безбелковые) среды.**

**4 смешанные среды,
которые являются более
полноценными.**

**По консистенции
среды делят на
твёрдые, полужидкие
и жидкие.**

Питательные среды, используемые для получения культур микобактерий можно разделить на три группы:

- 1) яичные (Левенштейна-Йенсена, Финна, Петраньяни и др.);
- 2) агаровые (Миддлбрука 7Н10, 7Н11 и др.);
- 3) бульонные или жидкие (Миддлбрука 7Н9, 7Н12, Дюбо, Школьниковой и др.).

Для культивирования МБТ используют различные питательные среды: жидкие, полужидкие и плотные. Жидкие и полужидкие среды используются редко, в связи с возможностью возникновения аварийных ситуаций и внутрилабораторного заражения персонала. Стандартной плотной средой, рекомендуемой ВОЗ для выделения возбудителя и определения его лекарственной чувствительности является яично-солевая среда Левенштейна-Йенсена. Она выпускается в виде порошка, который разводится, разливается в пробирки и подогреваясь, приобретает плотную консистенцию, за счет сворачивания яичного белка. Предварительно, перед сворачиванием, среда подкрашивается бриллиантовым зеленым для облегчения в последующем идентификации колоний МБТ.

Существуют другие варианты плотных яичных сред: Финна II (L-аспарагин заменен на глутамат), Аникина (без аспарагина), Гельберга (приготовленная на картофельном отваре). Однако они имеют ряд недостатков: высокая стоимость с учетом широкого распространения бактериологического исследования в противотуберкулезных учреждениях, относительно медленный рост МБТ, 20 особенно при их пониженной жизнеспособности, что особенно часто встречается в условиях химиотерапии.

Бактериологический метод является более чувствительным и достоверным, он позволяет выявить МБТ, если их содержится около 100 в 1 мл. материала. Важным преимуществом этого метода является возможность выделения возбудителя и изучение его видовой принадлежности, вирулентности, лекарственной чувствительности.

Его недостатками можно считать:

- 1. сложность – выполним только в специализированной бактериологической лаборатории.**
- 2. высокую стоимость исследования.**
- 3. длительность исследования может составить 20-90 дней, в зависимости от типа роста микобактерии.**

Техника взятия материала на бактериологическое исследование

Исследуемый материал	Способ сбора материала
Мокрота (утренняя)	Собирают в широкогорлую стерильную баночку.
Экссудат из плевральной полости	Берут стерильным шприцем в стерильную, закрывающуюся посуду.

21

Асцитическая жидкость	То же
Моча	Берут стерильным катетером в стерильную колбу, после тщательного туалета, доставляют в течение 1-2 часов в лабораторию
Цереброспинальная жидкость	3-5 мл из спинномозгового канала берут специальной стерильной иглой, соблюдая правила асептики, в 1-2 стерильные пробирки. Закрывают ватно-марлевыми пробками и ставят в холодильник на 24 часа; на поверхности жидкости образуется пленка, в которой находятся микобактерии туберкулеза. Затем из фибринозной пленки готовят препарат, окрашивают по методу Циля-Нильсена и микроскопируют
Кровь	8-10 мл берут шприцем или системой для взятия материала во флакон с питательным бульоном

ПЦР как метод, обладает высокой чувствительностью, специфичностью и быстротой (в течение 4-5 часов) выявления МБТ. Эти преимущества позволяют диагностировать возбудителя на ранних стадиях заболевания и в различных



Экспресс-метод диагностики туберкулеза с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени Xpert MTB/RIF позволяет обнаруживать микобактерии туберкулеза в образце мокроты и устойчивость к рифампицину в течение 2 часов. Быстрый молекулярно-генетический метод **(Хайн-тест)** **позволяет** обнаруживать микобактерии туберкулеза и определять чувствительность к другим противотуберкулезным лекарствам в течение 2 дней. Эти методы выявляют фрагменты ДНК микобактерии туберкулеза. Опираясь на данные исследования результаты можно уверенно поставить диагноз и подобрать индивидуальное лечение конкретно «под человека».

**ПЦР анализатор GeneXpert имеет
возможность **одновременного**:**

- ✓ выявления МБТ методом ПЦР
(полимеразной цепной реакции молекул
ДНК возбудителя)**
- ✓ определения чувствительности МБТ к
рифампицину.**

**Что позволяет в течение короткого
времени определить есть ли в мокроте
МБТ и с первых дней назначить
адекватную химиотерапию.**

Метод ПЦР основан на **ферментативной амплификации** выбранных специфических участков генома бактерий рода *M. tuberculosis*. *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, их дальнейшей **детекции** и **идентификации**.

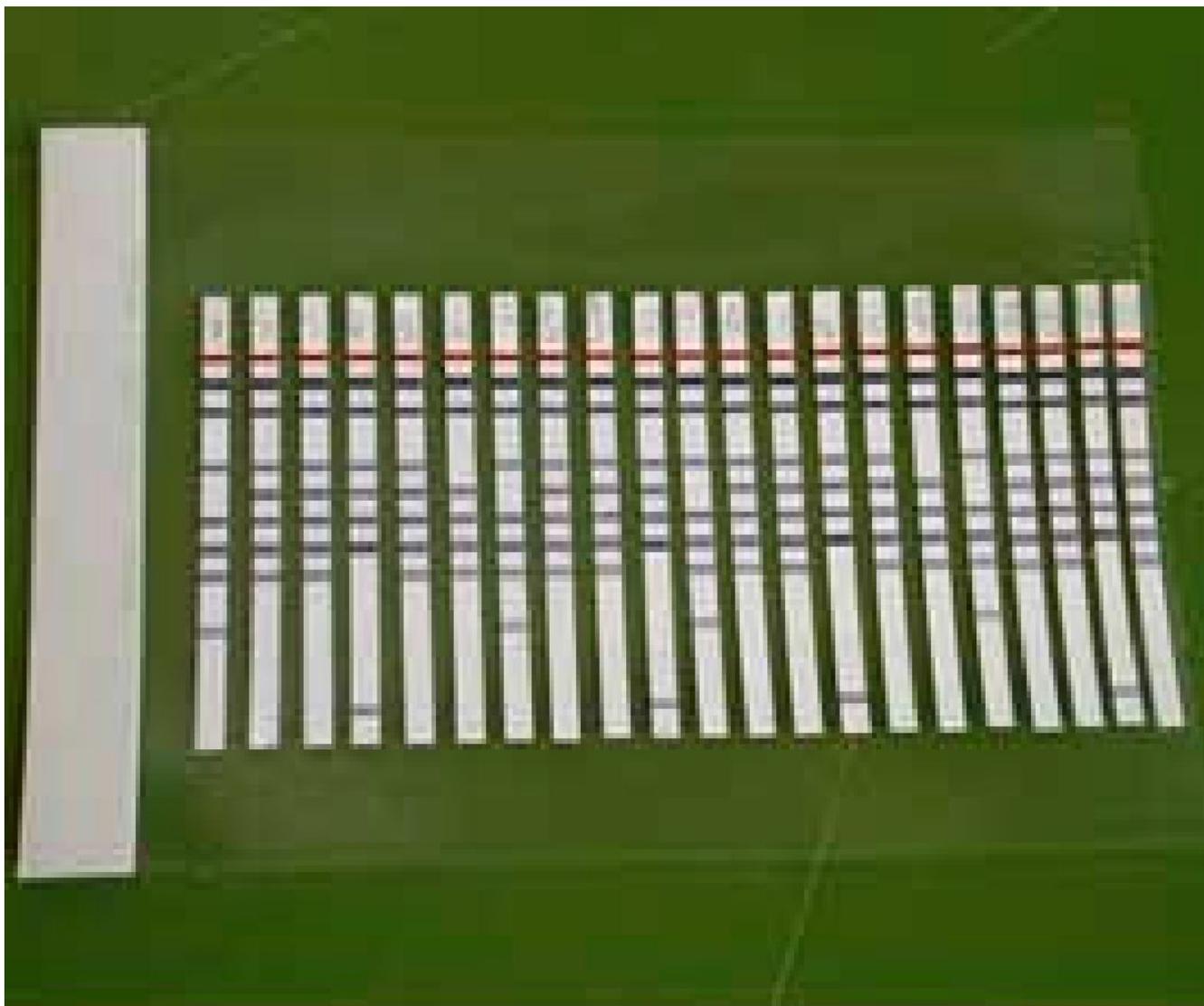
Метод ПЦР позволяет дифференцировать виды микобактерий.

ПЦР Анализатор

GeneXpert



Различные мутации



Система микробиологического мониторинга

Кроме классических культуральных методов, в практике бактериологических лабораторий начали применяться системы микробиологического мониторинга (детекция и определение чувствительности микобактерий к антибактериальным препаратам) ВАСТЕС MGIT. Микобактерии культивируют в жидкой ВАСТЕС среде, где в качестве источника углерода используется меченая ^{14}C пальмитиновая кислота, при положительных данных бактериоскопического исследования рост микобактерий обнаруживаются при помощи флюоресценции на 7-10 – 14-21 день.

■ Однако в практике бактериологических лабораторий за счет высокой себестоимости исследования, необходимости применения специального оборудования, сложности работы с изотопной технологией, необходимостью дополнительного посева на плотную питательную среду при возникновении проблем с идентификацией или интерпретацией результатов, делает данные системы затратными для массового использования в лечебно-профилактических учреждениях, что недоступно большинству практических бактериологических лабораторий.

Система Вастес-960 - жидкие среды

Принцип метода—основан на индикаторе роста в среде.

Средние сроки положительного роста микробактерий 11-13 дней.





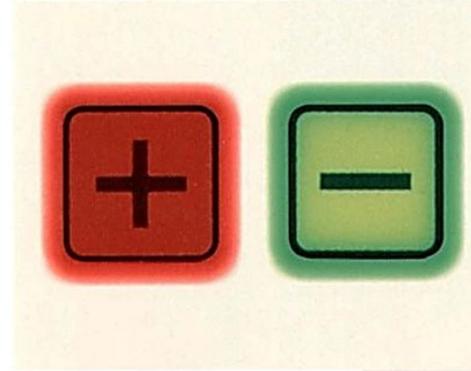
Выбор операции



Сканирование штрих-кода



Загрузка ячейки, выделенной зеленым индикатором



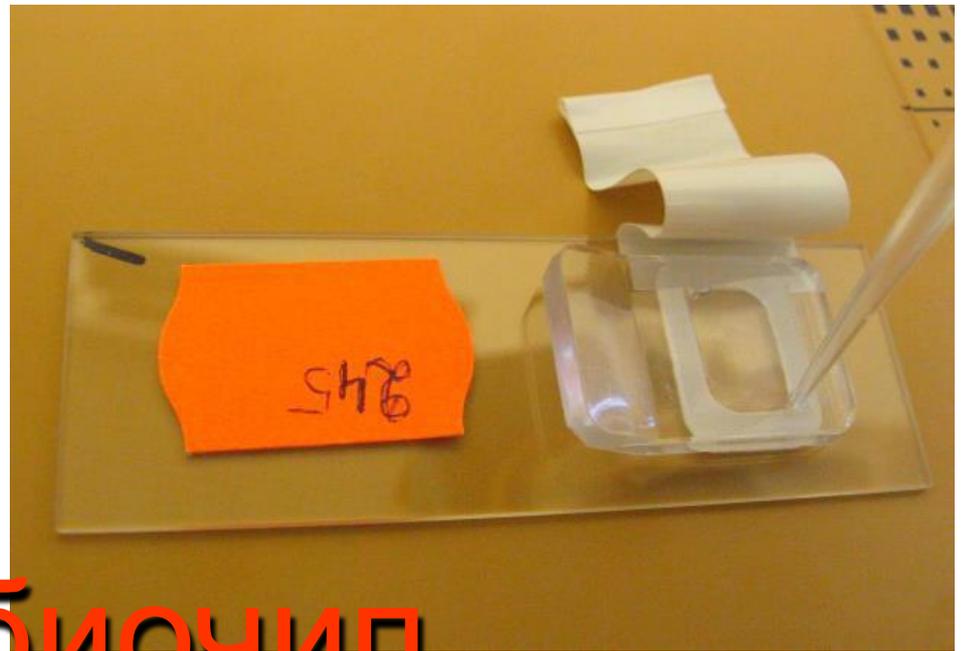
Указатели положительной и отрицательной детекции МБ



Положительный и отрицательный результаты

БИОЧИПЫ

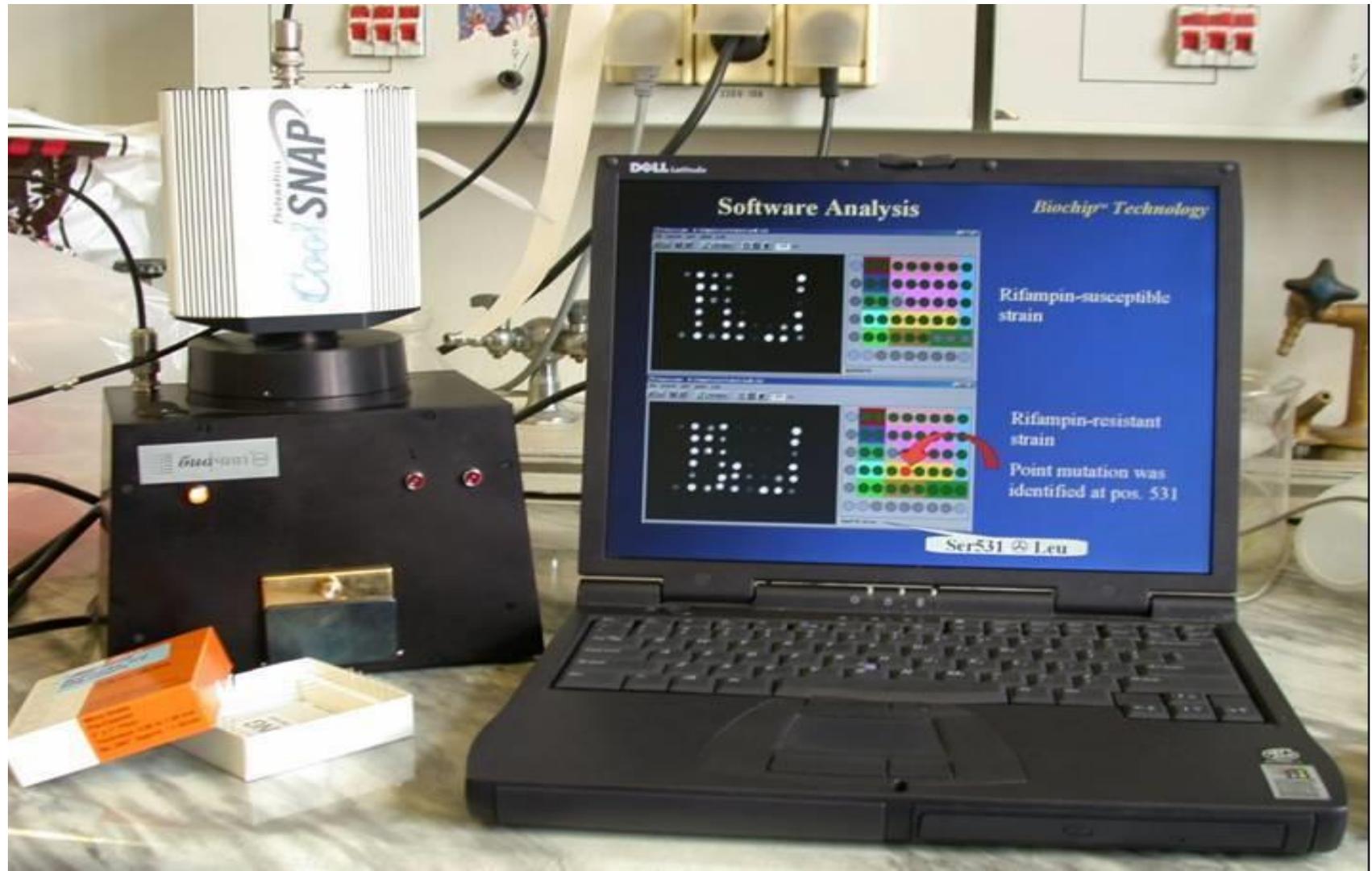
Биочип - едва заметный матовый квадратик на блестящей пластинке размером не больше обычной почтовой марки. Принцип действия биочипа основан на законах не математики, а молекулярной биологии. Наносятся на пластинку микрокапли различных компонентов, молекулы. Эти молекулы - фрагменты ДНК или определенные белки - могут принадлежать бактериям, вирусам, токсинам и т.п. После того как пластинки облучат ультрафиолетом, капли полимеризуются в микроячейки. На чипе их может быть от 100 до 4000. Процесс определения патогена: в каплю крови, плазмы или любой другой анализируемой жидкости добавляют флуоресцентное вещество (крошечный "фонарик" получает каждая молекула, находящаяся в ней). Когда каплю помещают на чип, молекулы ищут "родственников" на биочипе и соединяются с ними. Там, где соберется больше "фонариков", ячейка засветится ярче. Так "опознают" бактерии, вирусы, дефектные гены, а в принципе - любое вещество, имеющее молекулярное строение. "Опознавание" можно провести под микроскопом.



ТБ-биочип



Приборы для изучения мутаций в геноме *M.tuberculosis* на биочипах



Указанная стратегия микробиологической диагностики туберкулеза позволяет при поступлении больного в стационар более короткие сроки определять лекарственную устойчивость микобактерий, выявлять нетуберкулезные микобактерии и адекватный режим химиотерапии назначать интенсивную фазу лечения, что

- сокращает сроки абациллирования**
- повышает эффективность лечения**
- предотвращает распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий**