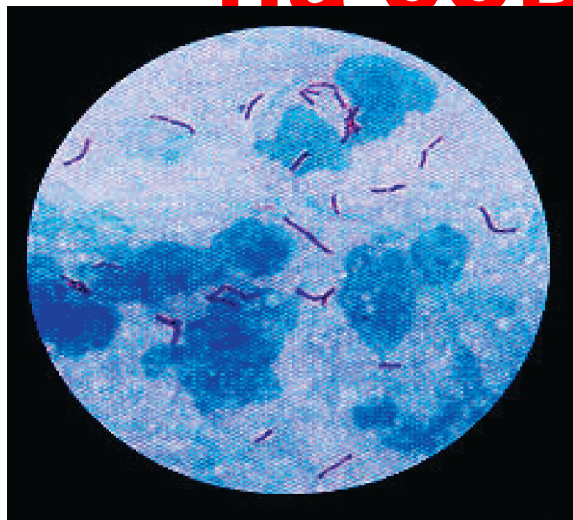


Лабораторная диагностика туберкулеза на современном этапе



Лекция 8



История...

- **Первые письменные свидетельства о «чахотке» - в древнеиндийских «Ведах» (3 тысячелетие до н.э.)**
- **В европейской античности основоположником учения о чахотке является Гиппократ (450-377 гг до н.э.) – описал симптомы заболевания и способы лечения**
- **С учениями о туберкулезе связаны имена Абу-Али-Ибн-Сины, Дж. Фракастро, анатома Сильвия и др.**
- **Анатом и клиницист (1809 г) – описал «легочный бугорок», величиной с просо зерно (millium - просо), отсюда – миллиарный туберкулез.**
- **патогенез туберкулеза на конец 19 века – божья кара, плохой воздух, рак, микробы? – отсюда различные методы лечения.**
- **24 марта 1882 года на заседании Берлинского физиологического общества – доклад Роберта Коха «Этиология туберкулеза» - обнаружил и выделил возбудителя туберкулеза, определил постулаты, доказывающие это (постулаты Коха):**

Мечников И.И.

–

«...сообщение
Р.Коха – это
открытие 19

Постулаты Коха

Для доказательства того, что причиной туберкулеза является заражение бациллами, а также рост и размножение и в организме, необходимо следующее:

- Выделить бациллы из организма
- Вырастить их в виде чистой культуры
- Путем введения выделенных бацилл животным воспроизвести заболевание.

Кох Роберт (**Koch Robert**), немецкий бактериолог (**1843–1910**);

- автор многочисленных прикладных методов выделения и культивирования бактерий;
- первым из бактериологов начал манипулировать с чистыми культурами патогенных бактерий (***Bacillus anthracis*, 1876**);
- открыл возбудителей туберкулёза (**1882**), египетского конъюнктивита (**1883**) и холеры (**1883**);
 - автор эпохального труда по посттравматическим инфекциям (**1878**); разработал основные правила идентификации патогенных микроорганизмов как этиологических агентов (постулаты Коха); лауреат Нобелевской премии **1905** г. за открытие возбудителя туберкулёза.

Передача инфекции

- Наиболее часто ТБ передается от человека к человеку воздушно-капельным путем. Когда бациллярный больной легочным ТБ, не получающий лечения, кашляет или чихает, он выделяет мельчайшие частицы мокроты, содержащие *M. tuberculosis*.
- Эти частицы, диаметром 1–5 мкм, образуют капельную взвесь, которая, в зависимости от окружающих условий, может несколько часов сохраняться в воздухе.
- Передача заболевания происходит, когда больной выделяет зараженную мокроту, которая в виде капельной взвеси переносится воздушным потоком, поэтому в значительной степени распространению инфекции способствуют больные с туберкулезом органов дыхания.
- Проветривание удаляет капельную взвесь, а прямые солнечные лучи быстро убивают *M. tuberculosis*.

Патогенез

- Капельные частицы (содержащие *M. tuberculosis*) настолько малы, что при вдыхании они оседают в альвеолах (воздушных пузырьках), минуя защитный слой слизи и ресничек бронхов.
- Инфекционный процесс начинается с размножения бактерий в легких. По кровотоку бактерии могут дойти до любого органа тела.
- Чаще всего ТБ инфекция развивается в верхних отделах легких, а также в почках, мозговом веществе и костях.
- В 80-85% случаев ТБ поражает легкие, а в остальных 15-20% случаев заболевание развивается в других органах.

Инфицирование *M. tuberculosis*

- Когда здоровый человек с нормальным иммунитетом инфицирован *M. tuberculosis*, его иммунная система обычно быстро реагирует на возбудителя, стимулируя выработку лимфоцитов, которые останавливают размножение и распространение бактерий.
- У таких инфицированных людей, не имеющих симптомов заболевания, единственным показателем инфицирования может быть положительная туберкулиновая проба Манту (особенно это касается тех лиц, кому БЦЖ не была привита, или тех, кому БЦЖ была привита несколько лет назад).

Риск инфицирования возрастает при:

- **увеличении** времени пребывания в зоне контакта;
- **уменьшении** размеров зоны контакта;
- **плохой** вентиляции/недостатке солнечного света в зоне контакта;
- **увеличении степени заразности** контактного больного ТБ, которая определяется:
- **количеством бактерий** – по результатам микроскопии мокроты (чем выше число КУБ в препарате, тем больше бактерий выделяет больной с частицами мокроты, тем выше степень его заразности),
- **недостаточным лечением** и
- **распространенностью процесса.**

БИОЛОГИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

- Микобактерии туберкулеза имеют обычно форму тонкой палочки, иногда прямой, но чаще слегка изогнутой, со слегка округлыми концами; длина палочки колеблется от 0,8 до 3—5 мкм (ширина - от 0,2 до 0,5 мкм), однако морфология палочек может варьировать в довольно широких пределах.

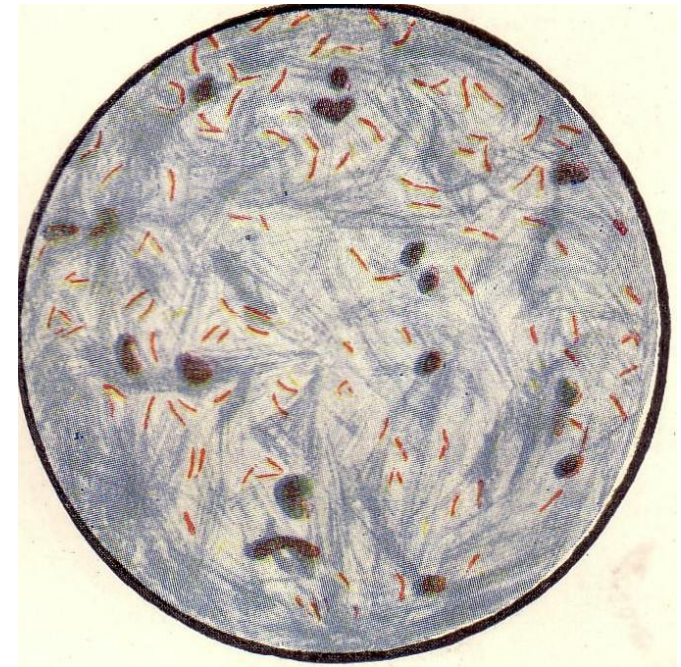
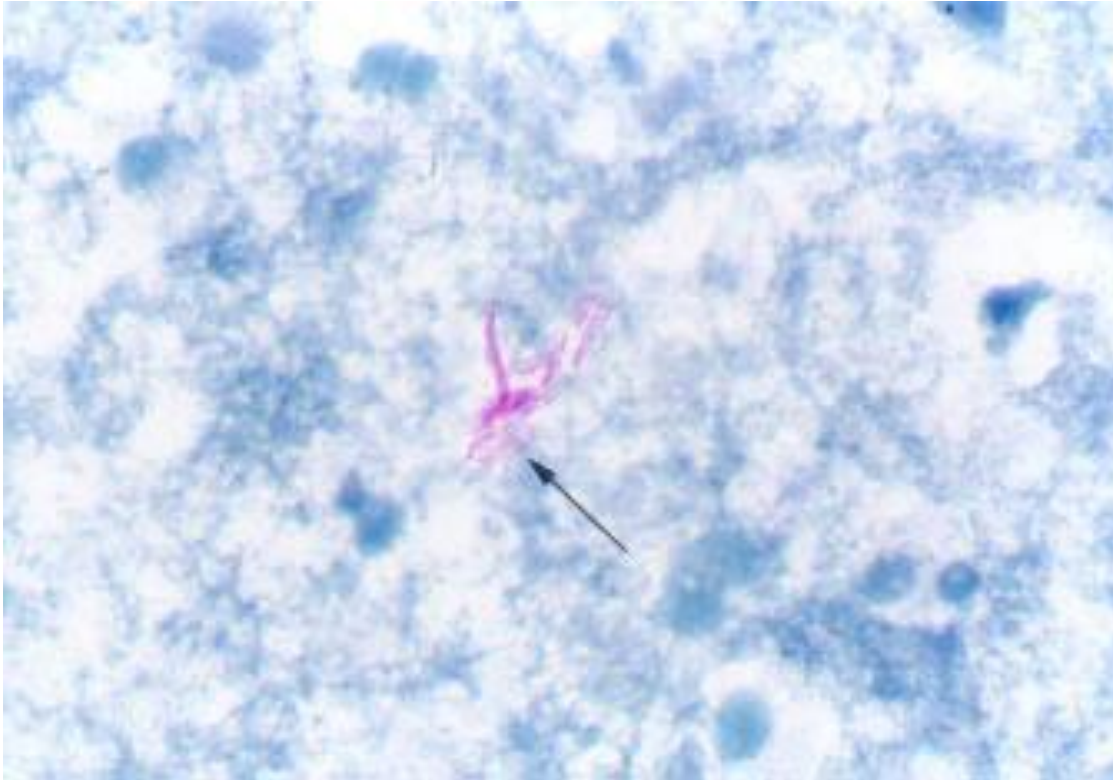
Существуют три типа микобактерий туберкулеза теплокровных:

- тип человеческий (*typus humanus* или *Mycobacterium tuberculosis*)
- тип бычий (*typus bovinus*)
- тип птичий (*typus avium* или *gallinaceus* — куриный);

Для человека эпидемиологическое значение имеют два типа микобактерий туберкулеза — **человеческий и бычий**.

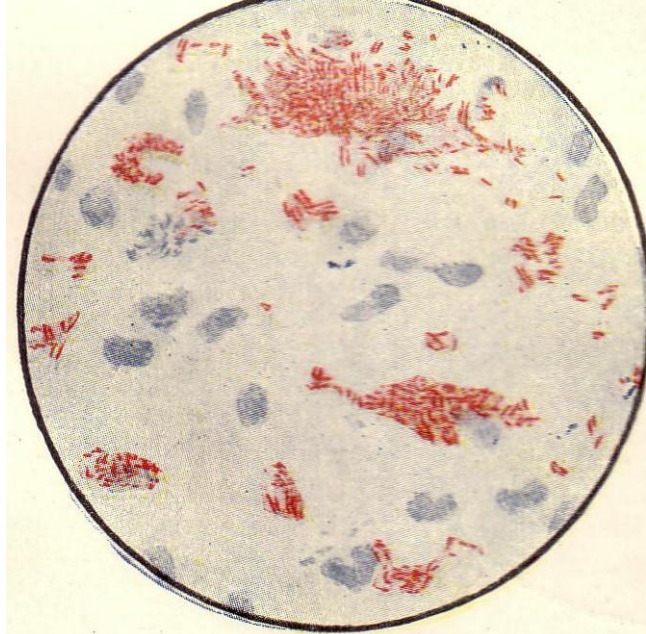
Случаи заболевания человека туберкулезом птичьего типа очень редки.

- Полиморфизм является характерным свойством микобактерий. Кислотоупорные МБТ обладают свойством медленно воспринимать анилиновые красители. Поэтому их окраска производится с применением протравы (карболовая кислота).
- При подогревании наиболее распространенный способ окраски - **способ Циля-Нильсена;**

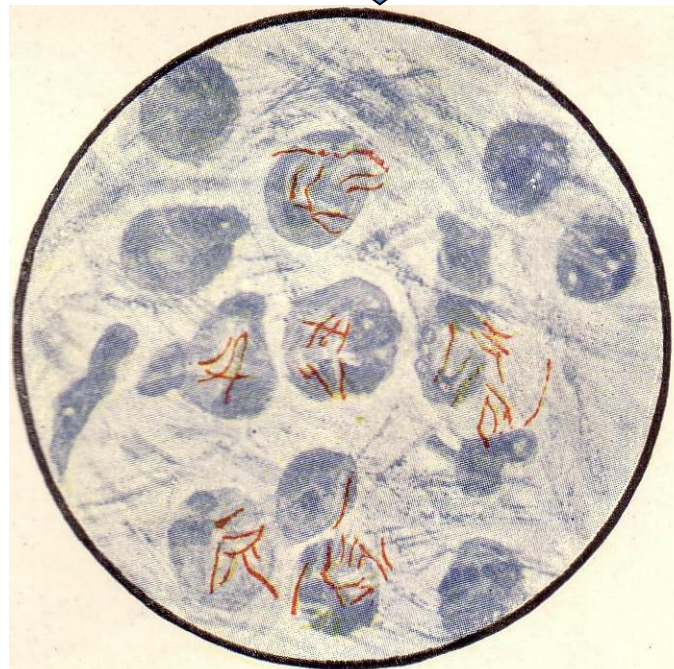




Туберкулезные
бациллы
фагоцитированные
нейтрофилами



Туберкулезные
бациллы в
мокроте



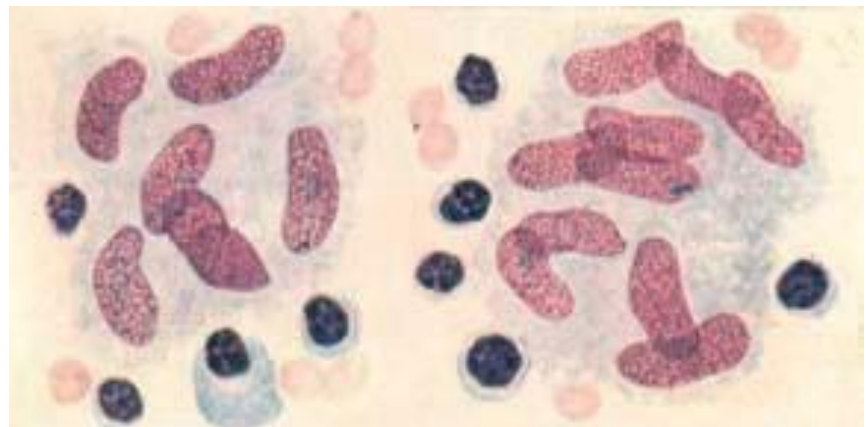
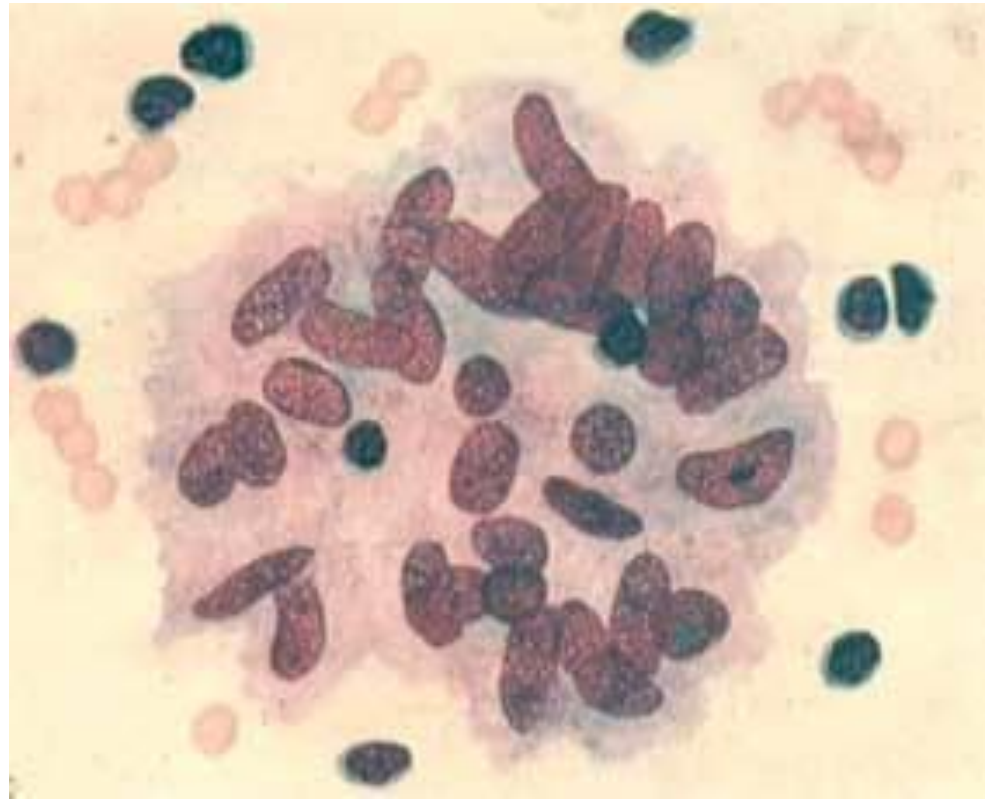
Туберкулезные
бациллы в
мокроте из каверн
(гнездами)


- **Наличие в цитогамме гигантских клеток Пирогова-Лангханса** с

несомненностью решает диагноз туберкулёза.

- Эти клетки имеют очень большие размеры (80 - 90 мкм и более в диаметре).

Цитоплазма окрашена в серо-голубой цвет. По её периферии расположено в ряд большое количество ядер (до 20), расположенных в форме кольца.





Лабораторная
Диагностика
туберкулеза

Регламентирующие документы:

- **Приказ МЗРФ №380** от 25.12.1997 г - микроскопическое исследование мокроты для выявления кислотоустойчивых микобактерий включено в перечень обязательных исследований в КДЛ
- **Приказ МЗ и СР №109** от 21.03.2003 г - «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации»
(основные правила микроскопической диагностики материала от больных туберкулезом)
- **Приказ МЗ и СР** Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 2 октября 2006 г. N 690
"Об утверждении учетной документации по выявлению туберкулеза методом микроскопии»

Этапы выявления туберкулезной инфекции

Первичное обследование
(в учреждениях здравоохранения и в противотуберкулезных учреждениях)

Двух- трехкратно проводимая прямая бактериоскопия мазка нативной мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсону)

Верификация результатов
первичного обследования – дифференциальная диагностика и постановка на диспансерный учет

Виды и правила сбора диагностических материалов

- Наиболее ценным материалом является **мокрота** (спонтанная, индуцированная), а также другие биожидкости и ткани
- Жидкий материал подлежит центрифугированию с последующей микроскопией осадка
- Следует использовать ц\ф с антиаэрозольной защитой и силой 3000g
- При транспортировке диагностический материал должен предохраняться от прямых солнечных лучей и тепла, от повторного замораживания (снижение жизнеспособности микобактерий)
- Мазки транспортируются в специальных планшетах, не соприкасаясь друг с другом (контаминация)
- Каждая проба должна быть промаркирована и иметь индивидуальное направление, а вся партия - иметь сопроводительный лист
- Контейнер с материалом маркируют знаком «Биологическая опасность» (СТТ 1.2.036-95)

Методы диагностики туберкулеза

исследование мокроты на КУБ методом микроскопии по Цилю-Нильсену

культуральное исследование (мокрота, гной, спинномозговая или плевральная жидкость)

Быстро и дешево

помогает выявить наиболее заразных больных, то есть выделяющих большое количество микобактерий туберкулеза

Чем выше число КУБ в препарате, тем больше количество *M. tuberculosis* в легких этого больного и, следовательно, выделяемых в окружающую среду

Учет и отчетность при проведении микроскопических исследований

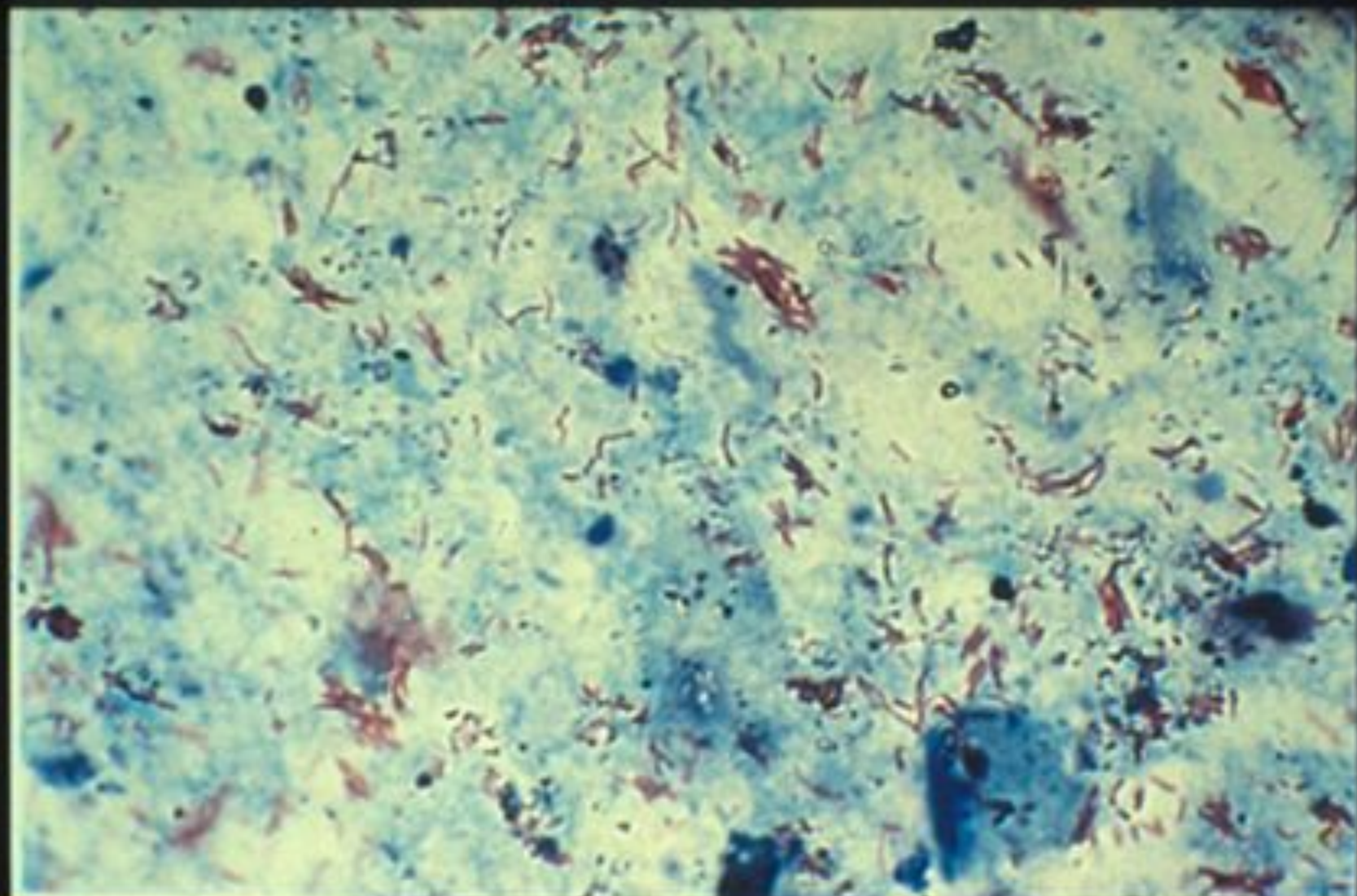
- Количество КУМ – важный информационный показатель, т.к. оно отражает степень эпидемиологической опасности больного и тяжесть заболевания
- Поэтому микроскопическое исследование должно быть не только качественным, но и количественным
- При использовании объектива 90x или 100x и окуляра 7-10x (общее увеличение 630-1000) используется градация результатов световой иммерсионной микроскопии, результаты которой отражают в лабораторном регистрационном журнале учета микроскопических исследований и на бланках-направлениях:

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	Рекомендовано повторить исследование	Результат не оценивается
1-9 КУМ в 100 п\з	100	«N» 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

* - указать точное число КУМ
точное число – единичные КУМ в препарате
2+ - умеренное количество КУМ

** - соответствие градаций:
1+ - единичные КУМ в п\з
3+ - значительное количество КУМ

**Кислотоустойчивые микобактерии,
результат 3 «+», в мазке мокроты**



Техника окраски по Цилю-Нильсону

- На фиксированный препарат мокроты накладывают полоску фильтровальной бумаги, наливают сверху карболовый фуксин и препарат нагревают над пламенем горелки до трехкратного отхождения паров паров. Не допускать высыхания фуксина (можно подливать по мере необходимости на стекло)
- После нагревания препарат с краской оставляют на 3–5 мин для остывания, затем сбрасывают пинцетом фильтровальную бумагу и сливают избыток краски.
- Препарат опускают на 10–15 с в 3% солянокислый спирт для обесцвечивания
- промывают водой и докрашивают метиленовым синим в течение 20–30 с.
- Снова промывают водой и высушивают на воздухе.

Ускоренные методы выявления возбудителя

Культуральные

Культивирование на жидких питательных средах с автоматической регистрацией роста культуры

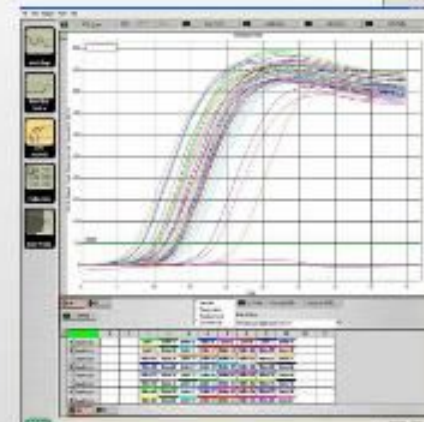
Вастек MGIT 960 7-14 дней



Молекулярно-генетические

Выявление ДНК возбудителя в диагностическом материале

ПЦР 1-2 дня



ПЦР-диагностика туберкулеза, как правило, строится на использовании последовательностей ДНК, специфичных для всех 4 видов группы туберкулеза.

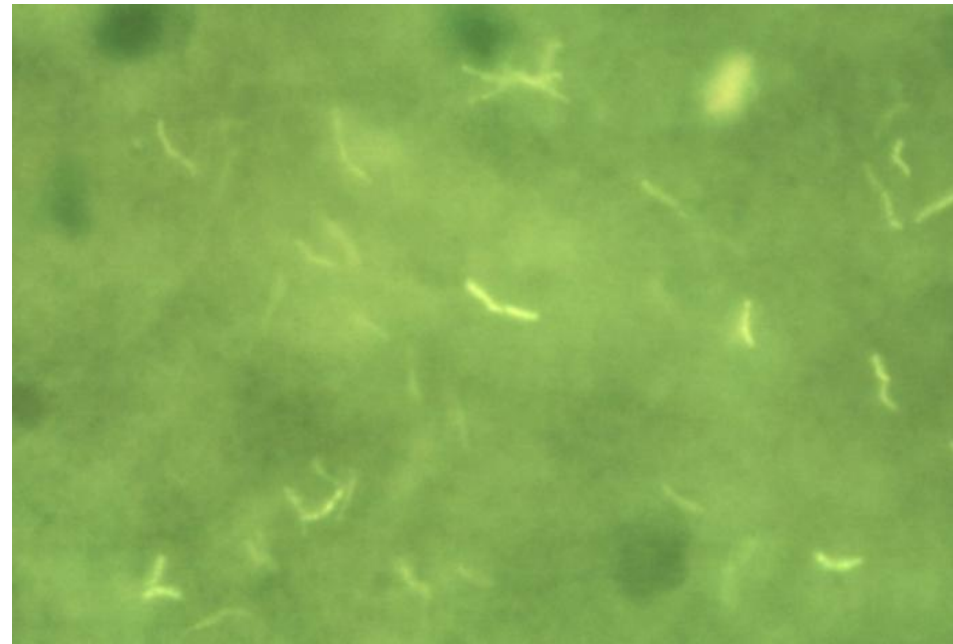
Часто для этих целей используют праймеры для выявления последовательностей IS-элементов, например, IS-986 или IS-6110, т.к. данные мигрирующие элементы характерны только для видов микобактерий туберкулеза и присутствуют в геноме микобактерий в числе нескольких копий.



Флюоресцентная микроскопия

Этот метод базируется на способности наружной мембраны МБТ, богатой липидами, удерживать соответствующий краситель, в данном случае - **аурамин-родамин**.

При этом МБТ, окрашенные аурамин-родамином, флюоресцируют под воздействием ультрафиолета и проявляются как ярко-желтые палочки на черном фоне.



Микобактерии туберкулеза в препарате мокроты;
люминесцентная микрофотограмма;
окраска родамином и аурамином.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

серологический

- Выявления специфических АТ и АГ — важный инструмент в диагностике инфекционных заболеваний. Особую ценность они имеют в тех случаях, когда выделить возбудитель не представляется возможным.



Симптомы подскажут

Острое течение

Напоминает воспаление легких или грипп

Скрытое течение

Обнаруживается при реакции Манту

Обычное течение

Встречается чаще всего



1.

Повышение температуры тела, преимущественно по вечерам.

2.

Потливость по ночам, плохой сон.

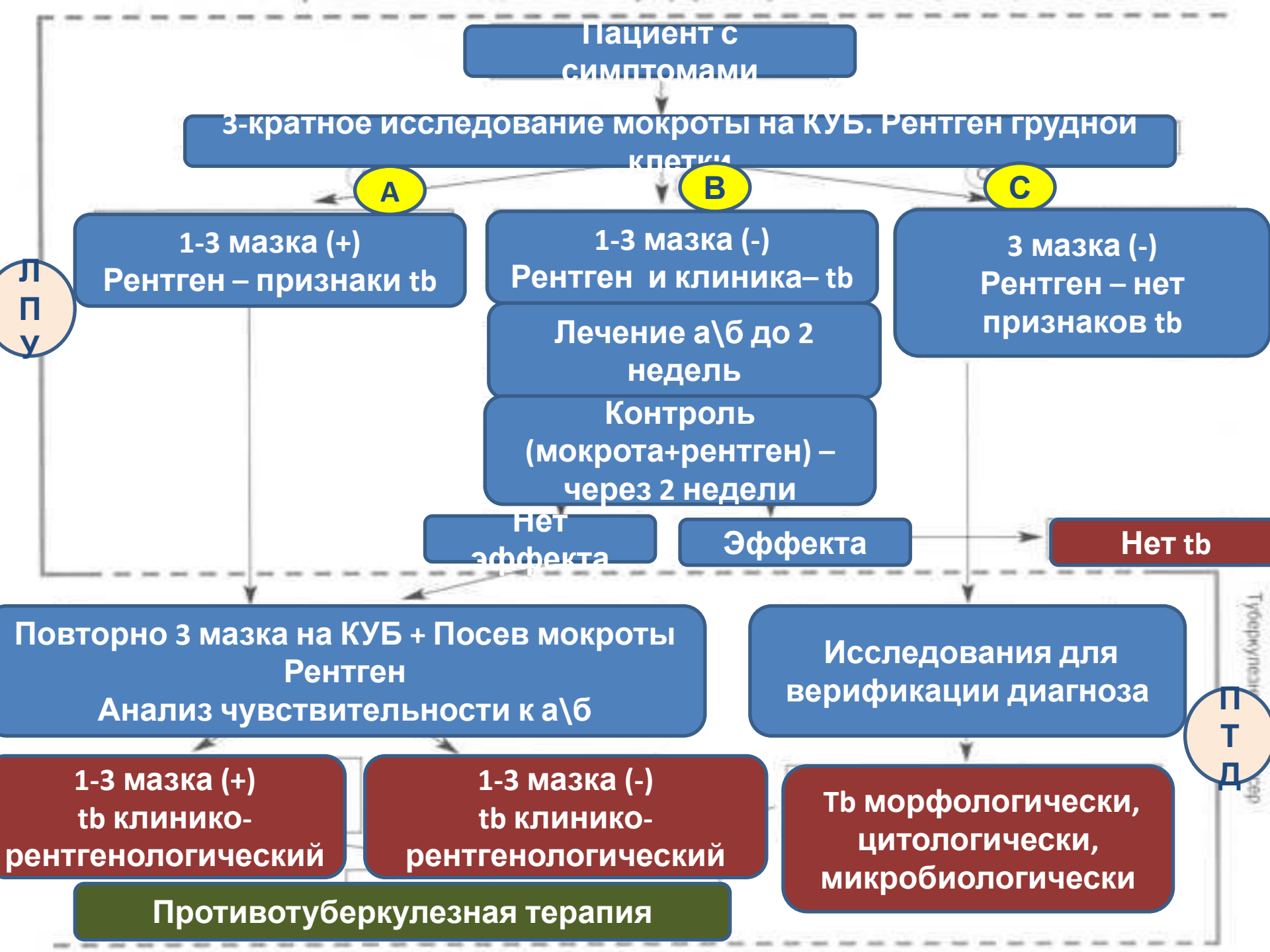
3.

Снижение аппетита и массы тела.

4.

Отставание в учебе от сверстников, потеря интереса к окружающему.

Туберкулез может проходить без характерных симптомов, напоминая обычную простуду.



Пациент с симптомами

3-кратное исследование мокроты на КУБ. Рентген грудной клетки

A

B

C

1-3 мазка (+)
Рентген – признаки tb

1-3 мазка (-)
Рентген и клиника – tb

3 мазка (-)
Рентген – нет признаков tb

Лечение а\б до 2 недель

Контроль (мокрота+рентген) –
через 2 недели

Нет эффекта

Эффекта

Нет tb

Повторно 3 мазка на КУБ + Посев мокроты
Рентген
Анализ чувствительности к а\б

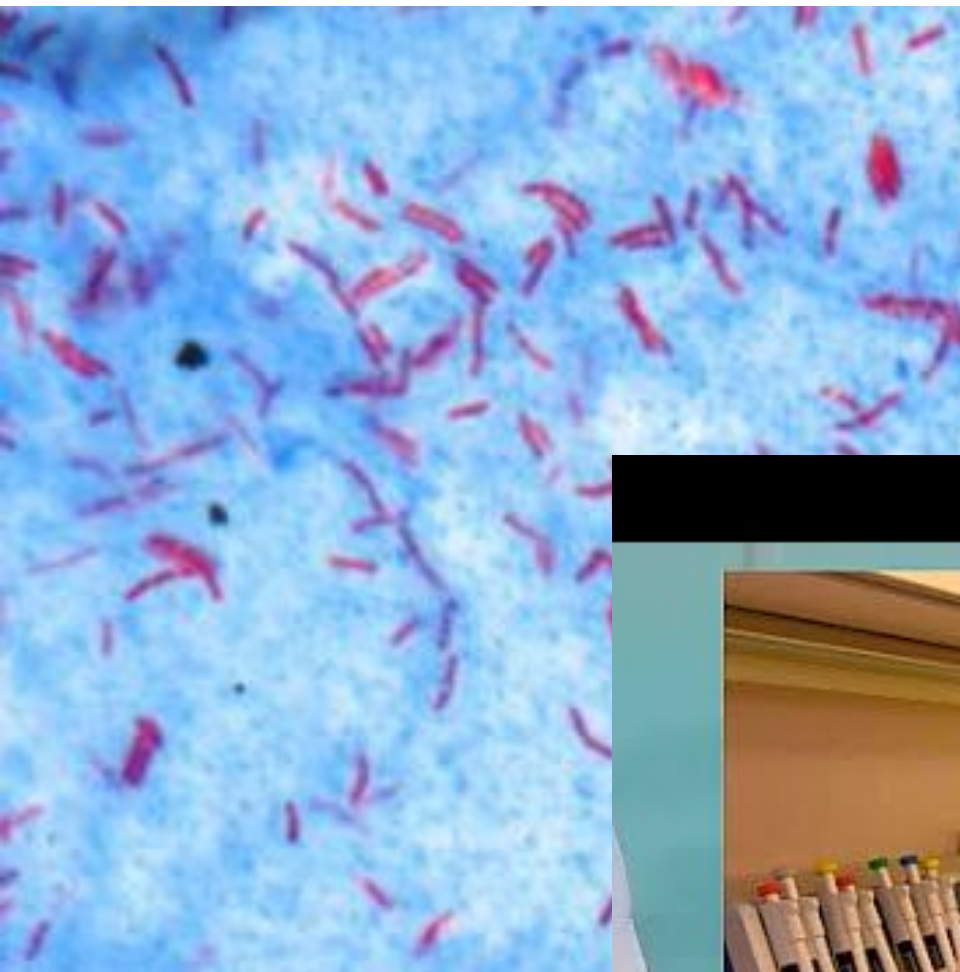
Исследования для верификации диагноза

1-3 мазка (+) tb клинико-
рентгенологический

1-3 мазка (-) tb клинико-
рентгенологический

Тб морфологически,
цитологически,
микробиологически

Противотуберкулезная терапия



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

