

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
( Н И У « Б е л Г У » )**

МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ  
МЕДИЦИНСКИЙ КОЛЛЕДЖ

**ЦМК Терапевтических дисциплин**

**ОСОБЕННОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ  
ТУБЕРКУЛЕЗА**

**Дипломная работа**

**студента очной формы обучения  
специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика  
4 курса группы 03051542  
Лопина Романа Сергеевича**

Научный руководитель  
преподаватель Луханина Е.М.

Рецензент  
Врач клинической лабораторной  
диагностики НУЗ «Отделенческая  
больница на станции Белгород ОАО  
«РЖД», поликлиника № 1  
Крошкина Т.С.

**БЕЛГОРОД 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА.....	6
1.1. Этиология, классификация и эпидемиология туберкулеза .....	6
1.2. Характеристика лабораторных методов диагностики туберкулеза.....	10
1.3. Феномен антибиотикорезистентности микобактерий.....	17
1.4. Критерии оценки качества препаратов при диагностике полирезистентного туберкулеза методом микроскопии.....	21
ГЛАВА 2. АНАЛИЗ КАЧЕСТВА ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ОКРАСКИ МАЗКОВ МОКРОТЫ .....	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	34
Рекомендации .....	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ .....	36

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования** обусловлена тем, что по данным Всемирной организации здравоохранения туберкулез все еще остается одной из самых опасных и смертоносных болезней на планете, которая встречается во всех ее регионах. А эффективность своевременной диагностики туберкулеза зависит от качества проведенных лабораторных исследований.

Туберкулез считается социально-значимым и социально-зависимым заболеванием. Еще в 18 веке в медицине было выделено отдельное направление, полностью посвященное диагностике, лечению и профилактике туберкулеза – фтизиатрия. Несмотря на способность микобактерий поражать практически любые органы и ткани, наиболее распространен туберкулез легких. Опасность заболевания обусловлена тем, что *Mycobacterium tuberculosis* передаются воздушно-капельным способом: при кашле, чихании, даже при разговоре. На протяжении большей части своей истории, туберкулез не был излечим, вплоть до эпохи микробиологических открытий двадцатого столетия.

Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения о глобальной борьбе с туберкулезом 2017 года, туберкулез занимает девятое место среди десяти ведущих причин смертности в мире и опережает любые другие инфекционные заболевания по смертности от единственного возбудителя.

Так же в данном докладе отдельно акцентируется внимание на проблеме распространения штаммов микобактерий, как с устойчивостью к рифампицину, являющемуся самым эффективным препаратом первой линии, так и со множественной лекарственной устойчивостью. Почти половина случаев заражения антибиотикоустойчивыми штаммами – 47%, приходится на три страны, в число которых включена и Российская Федерация. И это несмотря на практически двукратное снижение заболеваемости туберкулезом в РФ со 130,7 тысяч человек в 2000 году, до 70,9 тысяч в 2017.

Общепринятыми критериями эффективности лечения туберкулёза лёгких являются прекращение бактериовыделения и закрытие полостей при

деструктивных процессах. Однако результаты посевов мокроты становятся доступными только через 2-3 месяца, а рентгенологическая динамика, как правило, отстаёт от темпов абациллирования мокроты, поэтому крайне необходимы методы, позволяющие оценить эффективность схемы химиотерапии на более ранних сроках.

Ведущим способом диагностики туберкулеза легких, благодаря своей неприхотливости в оборудовании и простоте выполнения, является микроскопия мокроты. Преимущества диагностики туберкулеза легких бактериоскопическим методом: простота, достаточная эффективность, экономическая выгода, быстрота получения результата.

Залог эффективности программы по борьбе с туберкулезом – обеспечение высокого качества лабораторных исследований, в частности, качества микроскопических исследований мокроты с целью выявления кислотоустойчивых микроорганизмов.

**Цель исследования:** применение критериев контроля качества микроскопического материала на домикроскопическом этапе для повышения эффективности выявления антибиотикоустойчивых форм туберкулеза легких методом микроскопии.

**Задачи исследования:**

1. Изучить медицинскую литературу, посвященную диагностике антибиотикоустойчивых форм туберкулеза.
2. Провести мониторинг диагностической значимости лабораторных исследований для выявления микобактерий туберкулеза.
3. Определить особенности лабораторной диагностики антибиотикоустойчивых форм туберкулеза легких.
4. Руководствуясь критериями оценки качества приготовления и окраски мазков мокроты для микроскопии, провести анализ качества приготовления и окраски мазков мокроты в клинико-диагностических лабораториях города Белгорода и Белгородской области.

5. Разработать практические рекомендации для специалистов клинической лабораторной диагностики общей лечебной сети, направленные на повышение эффективности микроскопических методов выявления антибиотикоустойчивых форм туберкулеза легких.

**Объект исследования:** мазки мокроты, приготовленные и окрашенные по методу Циля-Нильсена.

**Предмет исследования:** микроскопический метод исследования препаратов мокроты.

**Методы исследования:**

1. Изучение научной литературы;
2. Статистические;
3. Лабораторно-диагностические.

# ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

## 1.1. Этиология, классификация и эпидемиология туберкулеза

Туберкулезом признается заболевание, вызванное *M. tuberculosis* и *M. bovis*. *Mycobacterium tuberculosis* (палочка Коха, туберкулезная бацилла) – вид микобактерий, вызывающий туберкулез у человека. Резервуар возбудителя – люди, больные активным туберкулезом с поражением легких. Передача происходит при вдыхании возбудителя из воздуха в составе аэрозоли, образующейся при отхаркивании или чихании, или путем контакта с зараженными секретами больного. Особенно заразны пациенты с туберкулезом гортани, бронхов и деструктивными формами легочного туберкулеза. Возможен перкутанный (через кожу) путь заражения. Вертикальное заражение наблюдают крайне редко, при милиарном туберкулезе у матери с бактериемией.

Микобактерии туберкулеза являются облигатными аэробами, неспорообразующими и неподвижными, их медленный рост тормозится при снижении рН меньше 6.5 и наличии жирных кислот с длинными цепями. Восковая капсула обеспечивает устойчивость возбудителя к кислотам и воспринимает красный карболовый фуксин Циля. Бактерии трудно обнаружить в центре очагов казеозного некроза, где нет кислорода, низкое рН и увеличено количество жирных кислот. У взрослых лиц, впервые заболевших туберкулезом, можно обнаружить не только классические формы палочки Коха, но и измененные варианты в виде L-форм и ультрамелких микрококковых форм [9].

Существует несколько путей инфицирования.

Основной – непосредственная передача возбудителя с каплями инфицированной слюны от человека к человеку, от больного – предрасположенному. В большинстве случаев появляется фокус асимптоматической инфекции в легком, но у некоторых больных первичный

туберкулез проявляется лихорадкой или вовлечением плевры. Как правило, единственным свидетельством первичной инфекции остается кальцинированный лимфатический узел. В таких фокусах жизнеспособный возбудитель может сохраняться десятилетиями, возможно всю жизнь. Такие люди инфицированы, но у них нет собственно заболевания, они не могут инфицировать других людей. Однако при снижении защитных сил организма инфекция может активизироваться, и возникнет заболевание, иногда опасное для жизни (рис. 1).

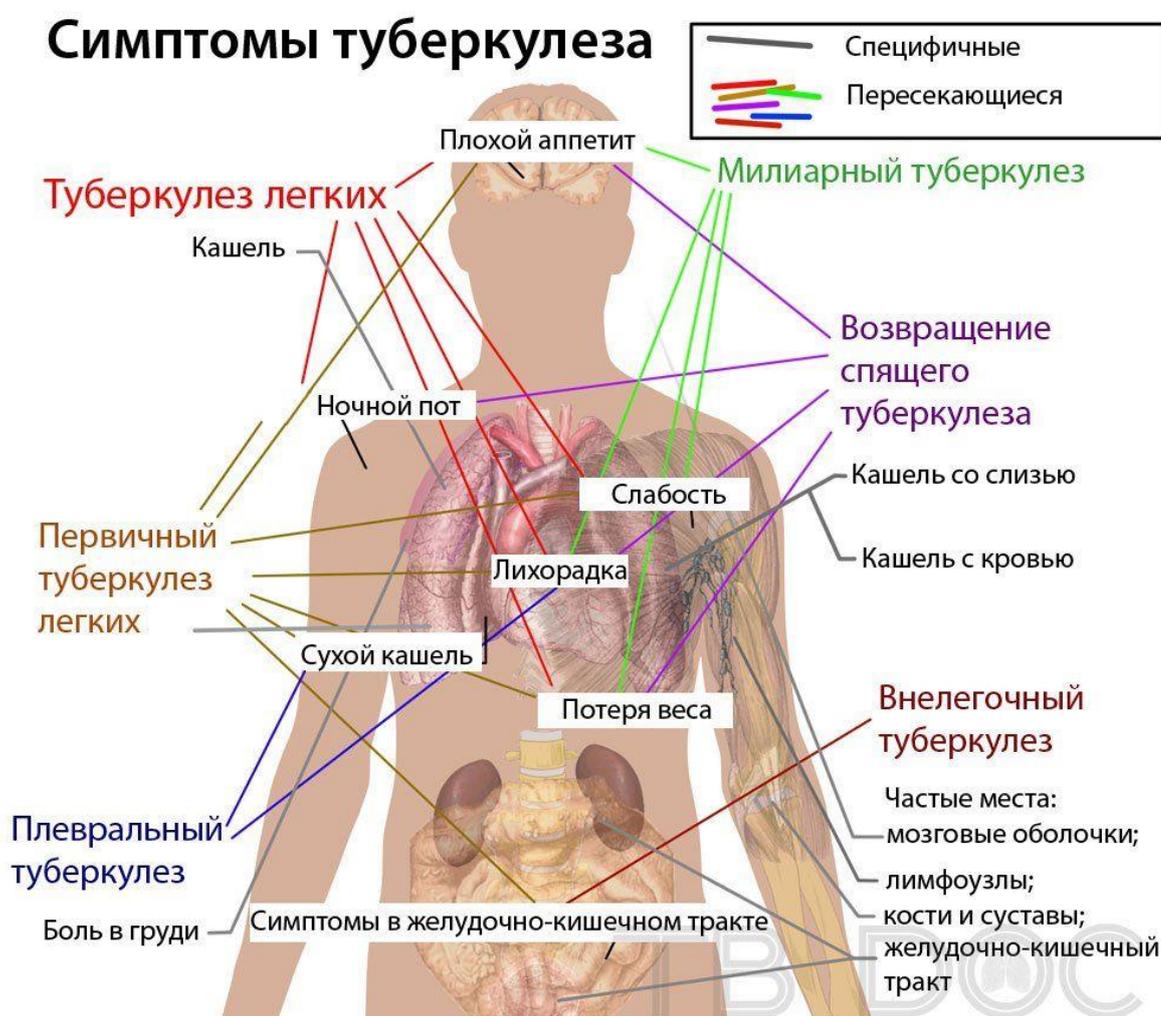


Рис. 1. Виды и симптомы туберкулеза

Инфицирование *M.tuberculosis* приводит к развитию гиперчувствительности замедленного типа, что можно обнаружить при пробе с

туберкулином (реакция Манту). Вместо туберкулина, представляющего собой концентрированную водно-глицериновую вытяжку культуры микобактерий, в настоящее время применяют очищенный белковый дериват *M. tuberculosis*.

В патогенезе туберкулеза есть три важнейших аспекта: поддержание вирулентности возбудителя, взаимосвязь между гиперчувствительностью и противотуберкулезным иммунитетом, патогенез специфического повреждения тканей и развитие творожистого (казеозного) некроза [4, с. 46].

Клиническая классификация туберкулеза была разработана и утверждена на съезде фтизиатров в 1990г.

1 группа. Туберкулезная интоксикация у детей и подростков.

2 группа. Туберкулез органов дыхания.

3 группа. Туберкулез других органов.

По прогнозам ВОЗ в ближайшие 10 лет туберкулез останется одной из 10-ти ведущих причин заболеваемости и смертности в мире. С 90-х годов XX века туберкулез унес жизни более 200 миллионов человек и ежегодно этот список продолжает пополняться. Ежедневно в мире погибает от туберкулеза около 5000 человек. Смертельное сочетание туберкулеза и ВИЧ-инфекции, а также распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) грозят еще более серьезными последствиями. Показатели заболеваемости туберкулезом снижаются или стабилизируются в регионах мира, кроме стран Африки и Восточной Европы. За последние пять лет в Российской Федерации заболеваемость туберкулезом стабилизировалась на высоком уровне, не имеет тенденции к снижению смертность от туберкулеза.

В настоящее время, по определению Всемирной организации здравоохранения, туберкулез представляет собой глобальную угрозу. Около трети населения нашей планеты инфицированы микобактериями туберкулеза [10].

Микобактерии способны поражать любой орган, однако чаще всего заболевание имеет легочную локализацию. Туберкулез легких чаще других форм туберкулеза приводит к смерти пациента. Проводимый комплекс

профилактических и противоэпидемических мероприятий в Белгородской области позволил снизить и стабилизировать уровень заболеваемости туберкулезом населения области (рис. 2).

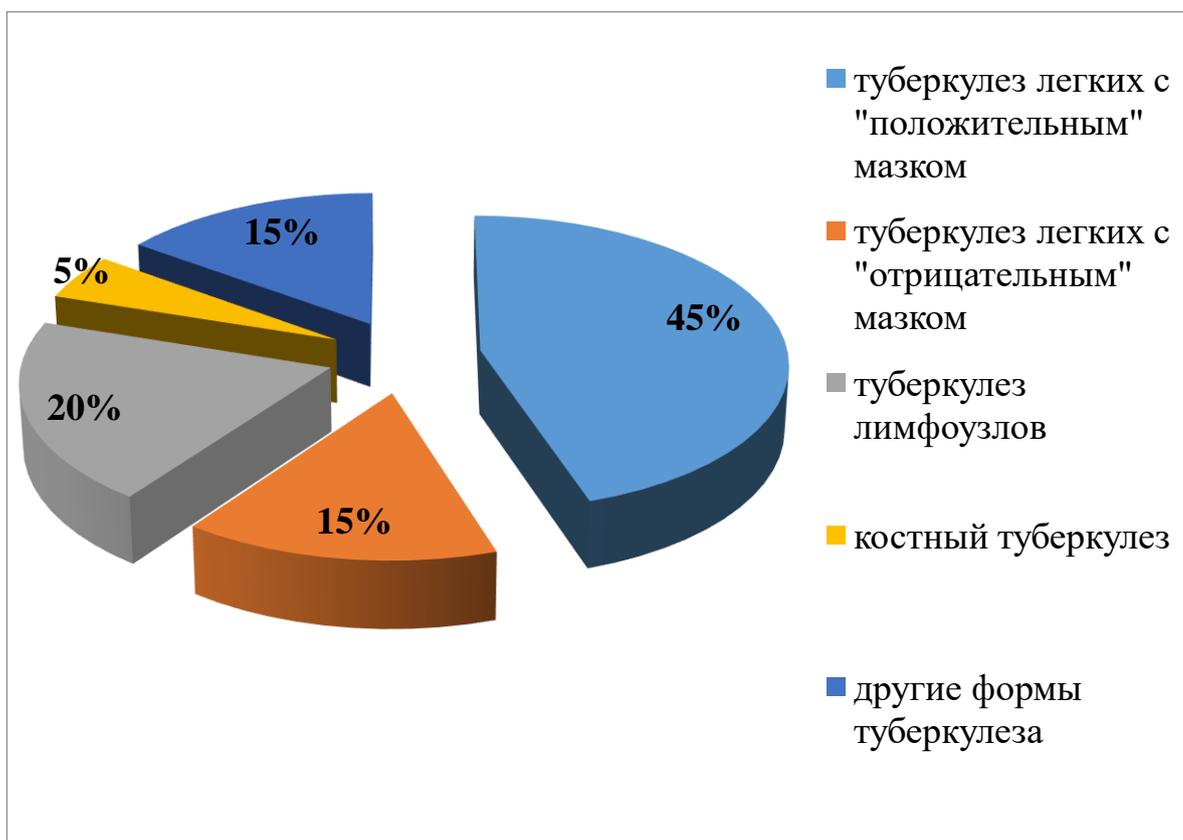


Рис. 2. Формы туберкулеза

В 2015 году зарегистрировано 362 случая впервые выявленного туберкулеза среди местного населения. Показатель заболеваемости составил 23,4 на 100 тыс. населения, что ниже среднего показателя по Российской Федерации на 49%. Несмотря на снижение показателя заболеваемости, эпидемическая ситуация по туберкулезу в области остается неустойчивой. Ежегодно регистрируются случаи заболевания активным туберкулезом среди детей и подростков. В 2015 году выявлено 4 случая заболевания туберкулезом среди детей и 3 случая среди подростков. Кроме того ежегодно в области регистрируются летальные случаи от туберкулеза.

## **1.2. Характеристика лабораторных методов диагностики туберкулеза.**

Все методы диагностики заболеваний можно разделить на прямые, позволяющие выявить непосредственно этиологический агент заболевания, и косвенные, которые выявляют последствия воздействия этиологического агента на организм больного. При туберкулезе к прямым методам относятся традиционные методы микробиологической диагностики (микроскопия и посев на питательные среды) и молекулярно-генетические технологии, позволяющие определить наличие дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) возбудителя в диагностическом материале. Так же лабораторные исследования можно разделить на предварительные, служащие для постановки диагноза, и контрольные, отражающие динамику течения заболевания, успешность лечения [6]. Для описания эффективности и целесообразности лабораторных методов исследования используют следующие критерии: диагностическая чувствительность - доля правильно определенных пациентов, страдающих данным заболеванием, от всех обследованных пациентов с заболеванием; диагностическая специфичность - доля правильно определенных здоровых пациентов среди всех обследованных здоровых пациентов.

Национальная ассоциация фтизиатров России рекомендует в процессе обследования при подозрении на туберкулез провести исследование «клинического минимума», включающего в себя общие анализы крови и мочи, биохимическое исследование крови, тестирование на ВИЧ-инфекцию, на антитела к гепатитам В и С. Далее следует провести микробиологические и микроскопические исследования, иммунологические исследования и исследования молекулярно-генетическими методами [12, с. 25].

Картину крови пациентов, инфицированных микобактериями туберкулеза нельзя назвать специфичной. Напрямую воздействия на кровь микобактерии не оказывают, следовательно, при интерпретации общего анализа крови мы можем

получить лишь косвенные данные, которые во многом будут зависеть от стадии развития процесса и специфичных данному организму свойств.

– Лейкоциты чаще всего находятся в пределах нормы, это  $5-12 \times 10^9/\text{л}$ . Если мы ведем речь о тяжелом случае фиброзно-кавернозного туберкулеза, то можно наблюдать лейкоцитоз в диапазоне  $12-15 \times 10^9/\text{л}$ .

– Так же особое внимание следует уделить наличию ядерного сдвига, если он есть, то чаще всего обусловлен палочкоядерными нейтрофилами без появления более молодых форм. Появление метамиелоцитов и промиелоцитов, а так же сдвиги более чем 20-30% говорит об обострении казеозной пневмонии с распадом, распространении инфильтративного процесса или же, хронического фиброзно-кавернозной формы туберкулеза. Так же определенные пределы сдвигов отмечают при инфильтративной или очаговой формах при отсутствии распада – 7-10% молодых форм; если мы говорим о деструкции легочной ткани – 10-20%.

– В случаях тяжелого течения заболевания встречается патологическая зернистость – грубые крупные гранулы в цитоплазме. Следует обратить внимание на повышение данного показателя выше 6%.

– Патологическая зернистость и ядерный сдвиг не коррелируют между собой, и связывать эти два фактора не рекомендуется: ядерный сдвиг позволяет судить об усиленной, но при этом нормальной работе костного мозга, в то время как появление патологической зернистости говорит о нарушении процессов нормального созревания белых клеток крови.

– Эозинофилы чаще всего находятся в норме. Очень часто благоприятные случаи течения туберкулеза сопровождаются неярко выраженной гиперэозинофилией, без нейтрофильного сдвига влево, на фоне лимфоцитоза. Гипоэозинофилия (2-4%) позволяет судить об обострении процесса. Аэозинофилия говорит о тяжелом состоянии пациента. Нередко эозинофилы понижаются из-за аллергических побочных реакция на химиотерапию, особенно лекарственными средствами из групп

аминогликозидов и пара-аминосалициловая кислоты; изониазид, рифампицин и циклосерин подобный эффект вызывают статистически реже.

– Лимфоцитоз можно наблюдать на ранней стадии развития заболевания, а так же при угасании вспышки.

– Лимфоцитопения вплоть до 10% говорит о тяжелом течении процесса. В целом лимфопения свойственна отсрым прогрессирующим формам туберкулеза казеозной пневмонии.

– Изменения количества моноцитов носят многофакторный характер. Моноцитоз часто сопровождает распространение возбудителя из первичного очага болезни по кровеносным сосудам. Тяжелое течение отражается в виде моноцитопении.

– Эритроциты практически всегда в пределах нормы. Анемия может наблюдаться при применении циклосерина, а так же при казеозной пневмонии и формах туберкулеза, затрагивающих кроветворные органы. СОЭ используют в качестве чуткого маркера перехода заболевания в острую форму.

Из биохимических исследований стоит уделить внимание концентрациям фракций белков крови,  $\alpha$ -антитрипсина, С-реактивного белка (С-РБ), гаптоглобина и церулоплазмينا. Средние молекулы сыворотки могут послужить для выявления глубины интоксикационного процесса. Не будет лишним определение гликемического профиля пациента, для исключения сопутствующего сахарного диабета. Так же следует тщательно следить за реакцией печени на проводимую химиотерапию – необходимо измерять концентрации щелочной фосфотазы (ЩФ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), провести тимоловую пробу. Помимо печени врачу необходимо пристально следить за работоспособностью почек, а так же системой гемостаза [4, с. 86].

«Золотой стандарт» диагностики туберкулеза – посев биологического материала. Культуральный метод диагностики на данный момент является самым чувствительным, хотя ученое сообщество не исключает и того, что в

будущем его может потеснить метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Но у данной методики есть и свои значительные минусы: дороговизна выполнения исследования, длительность проведения, вплоть до нескольких месяцев, необходимость высококомпетентных работников, способных выполнять данное исследование. Данный метод исследования туберкулеза самый старый из ныне существующих (рис. 3).



Рис.3. Посев биологического материала на среду Левенштейна-Йенсена

Культивируется материал в среднем 1-2 месяца, так же данная группа микроорганизмов очень чувствительна к составу и качеству питательной среды. Из-за долгого роста искомым колоний среда очень часто «загрязняется» не имеющими отношения к микобактериям туберкулеза микроорганизмами. Для предотвращения роста посторонней флоры материал для посева необходимо подвергать деконтаминации, в результате чего погибает и часть искомым микобактерий. Эффективность исследования на прямую зависит от качества проведенной деконтаминации. На данный момент в РФ принято использовать следующие твердые среды для культивирования микобактерий: среда Левенштейна-Йенсена, Финн-2, Огавы. Из жидких сред применяют Миддлбрук

7Н9. Все среды, основанные на желатине, в частности Миддлбрук 7Н9 позволяют получить колонию микобактерий за 10-14 дней, в том числе благодаря более мягкой антимицробной обработке. Но работа с жидкими средами требует большей квалификации персонала лаборатории и более жесткой системы биологической безопасности лабораторной службы, так же важный фактор невысокой популярности жидких питательных сред в системе государственного здравоохранения – более высокая стоимость по сравнению с плотными аналогами. Наиболее популярное применение жидких питательных сред в настоящее время – вкпе с автоматическими анализаторами с флуоресцентной детекцией роста, что еще больше ускоряет процесс выделения возбудителя (рис. 4).



Рис.4. Автоматизированная система ВАСТЕС 960

Автоматизация процесса также уменьшает количество возможных ошибок в работе персонала и увеличивает коэффициенты достоверности и эффективности исследований. Так же плюсом метода посева является возможность применения любого исходного материала больного без потери в чувствительности или эффективности.

Старейший на данный момент диагностический метод подтверждения диагноза туберкулез – микроскопия. Из-за особенностей стенки микобактерий, способной связываться с акрилметановыми красителями (фуксин и флуоресцентный краситель аурамин), были разработаны специальные методы окрашивания, названные «кислоустойчивыми».

При возникающие связи между данными веществами и клеточной стенкой – микобактерии приобретают красный цвет, при окраске флуоресцентным аурамином – зеленое свечение. Данные исследования обладают высокой специфичностью (более 95%), при низкой же чувствительности (вероятность обнаружить микобактерий при прямой микроскопии материала примерно 50%, при содержании более 5000 микробных клеток во взятом материале). Проблему низкой чувствительности решают при помощи концентрации – центрифугировании материала и приготовлением мазка из концентрированного осадка либо путем взятия большего количества проб от одного пациента. А повышение специфичности возможно при применении щадящих методов деконтаминации материала – для исключения кислостойчивых микроорганизмов нетуберкулезной этиологии [8, с. 17].

Получение отрицательного результата при данном микроскопическом исследовании не может являться решающим фактором в постановке диагноза, т.к. материал изначально мог содержать малое количество микобактерий. Это может быть связано как с объективными причинами, так и с субъективными. В данном случае к объективным относятся стадия, локализация и форма течения инфекции; к субъективным – неправильное взятие материала у больного, некачественная подготовка мазка к микроскопии. Далее подробно будут

рассмотрены техники флюоресцентной микроскопии и световой микроскопии с окраской по Цилю-Нильсену.

При окраске мазка по Цилю-Нильсену необходимо зафиксировать мазок над пламенем горелки, окрасить карболовым фуксином, одновременно нагревая мазок и протравливая фенолом. Далее при обработке 3% солянокислым спиртом либо 25% раствором серной кислоты объекты, не обладающие кислотоустойчивостью, докрашивают 0,3% раствором метиленового синего.

В результате кислотоустойчивые микобактерии туберкулеза приобретают яркий красно-малиновый цвет, на фоне нежно-голубого цвета других элементов поля зрения. Готовые мазки микроскопируют на световом микроскопе с применением иммерсионных систем (объектив x90, x100; окуляр x7, x10). При исследовании данного мазка необходимо просмотреть не менее 100 полей зрения, если при этом не были обнаружены кислотоустойчивые микобактерии – просматривают еще 200 полей зрения [8, с. 5]. Данным методом можно обнаружить до 50 000 микробных клеток в 1 мл материала (рис. 5).

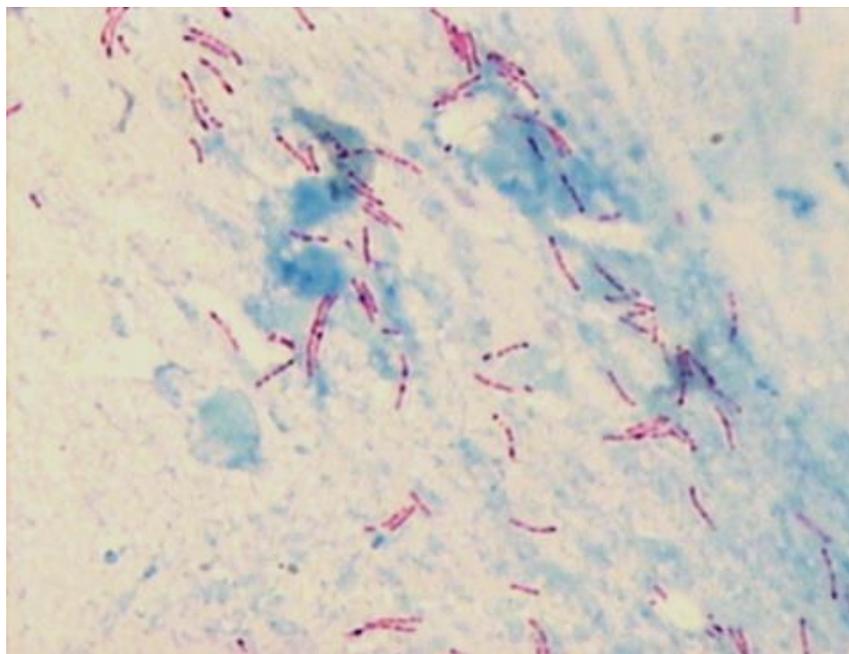


Рис.5. Окраска микобактерий по Цилю-Нильсену

В некоторых случаях следует прибегнуть к окраске флюорохромными красителями, в частности аурамино, что повысит эффективность исследования на 15%. При окраске аурамино необходимо качественно подготовить материал. Необходимо освободить микобактерии от окружающей их слизи, для этого материал обрабатывают детергентом и центрифугируют при 3000 об/мин. Благодаря контрастности и яркости полученного мазка можно увеличить поле зрения, что сократит время микроскопии (рис 6).

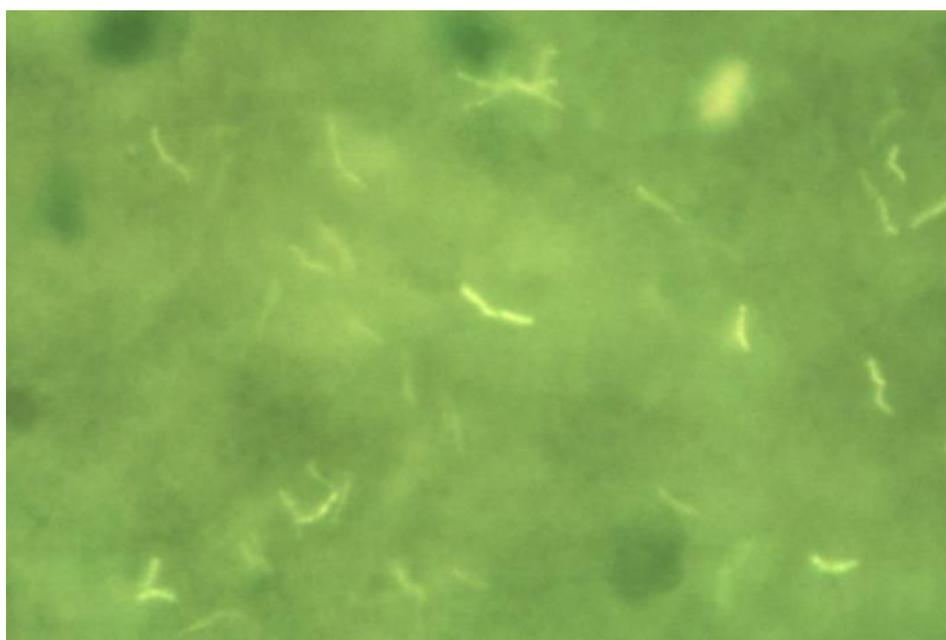


Рис.6. Окраска флюоресцентным аурамином препарата мокроты

Микроскопические методы исследования используют для обнаружения бактериовыделителей – эпидемически опасных пациентов. Это возможно благодаря высокой специфичности, скорости исследования (в течение 1-2 рабочих дней) и малой стоимости исследования. Однако данное исследование не позволяет провести точную идентификацию возбудителя, что может затруднить дальнейшее лечение заболевания.

### **1.3. Феномен антибиотикорезистентности микобактерий**

Антибиотикоустойчивость (антибиотикорезистентность) – явление невосприимчивости микроорганизма к применению одного или нескольких

антибактериальных препаратов, понижение восприимчивости культуры к данным веществам. Способы возникновения устойчивости разнообразны, они могут быть природной этиологии (изначальная невосприимчивость микроорганизма к данному препарату), генетической (мутация кольцевой ДНК бактерий), приобретенной (обмен плазмидами) [1] (рис. 7).

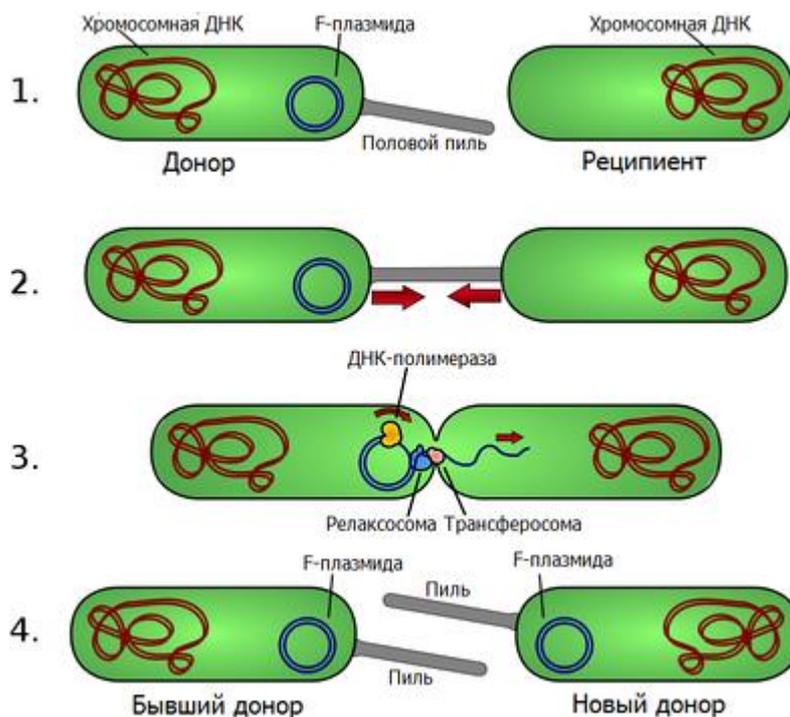


Рис.7. Передача информации об антибиотикорезистентности путем обмена плазмидами

Туберкулез являлся страшным неизлечимым заболеванием, пока Зельман Ваксман в 1943 г. не открыл стрептомицин. Но вскоре микобактерии приобрели устойчивость к данному препарату. Дальнейшие исследования показали, что микобактерии вырабатывают лекарственную устойчивость путем случайных мутаций кольцевой ДНК, у данных микроорганизмов не были обнаружены плазмиды, что исключает горизонтальный перенос антибиотикорезистентности.

Далее была предложена первая многокомпонентная схема лечение туберкулеза, ее принято называть трехкомпонентной, включала она в себя стрептомицин, изониазид и пара-аминосалициловая кислоту (ПАСК). Данная

схема пользовалась огромной популярностью, но к сегодняшнему дню признана полностью неэффективной. Из-за распространения резистентности к применяемым ранее препаратам была разработана т.н. четырехкомпонентная схема лечения (рифампицин или рифабутин; стрептомицин или канамицин; изониазид или фтивазид; пиразинамид или этионамид), распространена была на западе, так же ее называли DOTS – стратегией. В то же время в СССР применяли государственную систему противотуберкулезных диспансеров, включающую в себя более обширных комплекс мероприятий. Сегодня применяют пятикомпонентную систему, ее сущность заключается в добавлении к составляющим четырехкомпонентной системы производные фторхинолона (ципрофлоксацин), но все больше и больше стран, в том числе и Россия, отказываются от существующей номенклатуры систем лечения, чаще отдавая предпочтение индивидуальному подбору препаратов и курса лечения в целом [5].

Из доклада ВОЗ о глобальной борьбе с туберкулезом 2017 года: «В 2016 г. тестированием на устойчивость к рифампицину были охвачены 33% новых больных ТБ [Прим., ТБ – туберкулез] и 60% ранее пролеченных больных, при общем охвате в 41% (рост по сравнению с 31% в 2015 г.). ... Не менее 35 стран ввели короткие схемы лечения МЛУ/РУ-ТБ [Прим., МЛУ-ТБ – туберкулез со множественной лекарственной устойчивостью; РУ-ТБ – рифампицин-устойчивый туберкулез]. В рамках усилий по улучшению результатов лечения МЛУ/ШЛУ-ТБ [Прим., ШЛУ-ТБ – туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью] 89 стран и территорий к июню 2017 г. начали использовать бедаквилин, а 54 страны и территории применяли деламаид.» [2, с. 3].

Согласно национальному руководству по фтизиатрии: «целью лечения туберкулеза является ликвидация клинических проявлений болезни, достижение стойкого прекращения бактериовыделения, регресс рентгенологических проявлений заболевания (рассасывание очаговых, инфильтративных и ликвидация деструктивных изменений), а также восстановление трудоспособности и социального статуса больного» [12, с. 27].

Такое лечение возможно при комплексном подходе, включающем в себя, в первую очередь, многокомпонентную (поликомпонентную) химиотерапию, а также лечение проявлений заболевания, профилактика нежелательных побочных реакций, применение хирургии и т.д. В медицинской практике средства химиотерапии, оказывающие бактерицидное/бактериостатическое действие делят на:

- препараты первого ряда, являющиеся наиболее эффективными при отсутствии резистентности (изониазид, рифампицин, рифабутин, пиразинамид, этамбутол, стрептомицин);

- препараты второго ряда, применяемы при наличии резистентности к препаратам первого ряда, так же их называют резервными (инъекционные аминогликозиды – канамицин, амикацин и капреомицин, фторхинолоны II поколения – офлоксацин, III поколения – левофлоксацин, спарфлоксацин, IV поколения – моксифлоксацин, протионамид, этионамид, циклосерин/теризидон, аминосалициловая кислота, бедаквилин и тиоуреидоиминометилпиридиния перхлорат).

Так же Всемирной организацией здравоохранения и министерством здравоохранения Российской Федерации, в случаях широкой или тотальной лекарственной устойчивости штамма микобактерий и по решению врачебной комиссии также возможно применение препаратов, включенных в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, это т.н. препараты третьего ряда, не имеющие клинических испытаний в области лечения туберкулеза, но оказывающие на микобактерии бактериостатическое, либо бактерицидное действие *in vitro* [5].

Устойчивость микобактерий туберкулеза к какому-либо одному препарату первого ряда - уже стандартная ситуация в фтизиатрии, поэтому в лечение принимают участие несколько препаратов из первой и второй линий лечения.

Так же, национальные клинические рекомендации по фтизиатрии делят туберкулез по степени устойчивости на:

- туберкулез с сохраненной лекарственной чувствительностью;
- туберкулез с монорезистентностью к противотуберкулезным препаратам;
- туберкулез с полирезистентностью к противотуберкулезным препаратам;
- туберкулез со множественной лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам;
- туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам;
- туберкулез с тотальной лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам; [рук-во по фтизиатрии]

По способу выработки устойчивости туберкулез делят на:

- туберкулез с первичной лекарственной устойчивостью, если микобактерии проявляют резистентность в период до месяца от начала первой химиотерапии (данную группу используют как показатель эпидемиологического состояния популяции микобактерий туберкулеза);
- туберкулез с приобретенной лекарственной устойчивостью, если невосприимчивость проявилась спустя месяц от начала курса первой химиотерапии, считается фактором неудачного курса лечения [12, с. 22].

#### **1.4. Критерии оценки качества препаратов при диагностике полирезистентного туберкулеза методом микроскопии.**

Только качественно выполненный и исследованный мазок мокроты может иметь диагностическую ценность. Возможные, с первого взгляда незначительные, ошибки и неточности в технике приготовления мазка для окаршивания по Цилю-Нильсену могут повлечь тяжелые последствия для пациента. Туберкулез легких в достаточной степени поддается лечению при условии своевременного обнаружения микобактерий. Как было сказано выше,

культуральное исследование на обнаружение микобактерий может занять несколько месяцев усложняет положение пациента.

Несмотря на то, что положительный результат микроскопии говорит лишь о наличии в биологическом материале кислостойчивых микроорганизмов, которыми могут являться и не микобактерии туберкулеза, если мы говорим о высоком уровне заболеваемости туберкулезом (который наблюдается в Российской Федерации на данный момент), то с вероятностью от 95% до 98% обнаруженные кислостойчивые микроорганизмы это микобактерии туберкулеза. Данная вероятность так же зависит от исследуемого материала, способа его получения, доставки в лабораторию и правильности подготовки для исследования [8, с. 4].

Очевидно, что для обеспечения высокой продуктивности исследования необходим контроль качества работы специалистов на всех этапах проведения исследования. Осуществление такого контроля гарантирует точность и воспроизводимость проводимого исследования. Внутрилабораторный контроль качества обязан проводиться регулярно и ответственность за результаты должны нести все сотрудники микробиологической лаборатории.

Внутрилабораторный контроль качества должен включать в себя следующие компоненты:

- планировка местонахождения зон лаборатории вместе с оборудованием;
- контроль качества доставленного в лабораторию биологического материала;
- контроль обработки материала;
- применение стандартных методик;
- применение эффективных реактивов;
- безошибочная выдача результатов без задержек.

Основу гарантирования высокого качества исследований составляют:

- высококвалифицированный персонал лаборатории, мотивированный на высокое качество работы;

- использование только методик исследования с доказанной эффективностью;
- готовность персонала исправлять ошибки и самосовершенствоваться.

Критерии оценки качества приготовленных и окрашенных препаратов мокроты состоит из нескольких этапов.

1. Проверка качества мазков мокроты путем микроскопического исследования по наличию лейкоцитов (наличие более чем 25 лейкоцитов в поле зрения (при  $\times 100$ ), а также присутствие других клеток (макрофагов) является признаком мазков мокроты хорошего качества) (рис. 8)

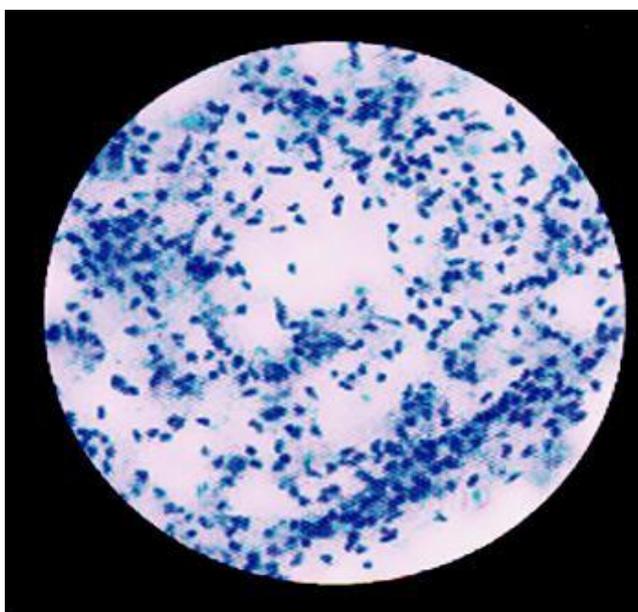


Рис.8. Наличие лейкоцитов в мазке мокроты

2. Площадь нанесения мазка (размер).

Оптимальный размер мазка считается около 1x2 см или 2x3 см, при этом – одна горизонтальная черта на таком мазке содержит в среднем 100-150 полей зрения (рис. 9).

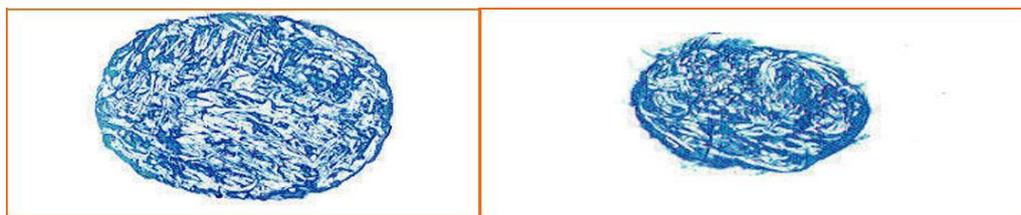


Рис.9. Оптимальный размер мазка мокроты

3. Равномерность распределения мазка (мокрота должна быть равномерно распределена по предметному стеклу) (рис. 10).



Рис.10. Равномерность распределения мазка мокроты

4. Густота мазка.

- а) Проверка густоты мазка с помощью печатного текста: перед окрашиванием нужно поместить предметное стекло с мазком в 4-5 см от печатного текста. Если текст нельзя прочитать, значит, мокрота слишком густая (рис. 11).

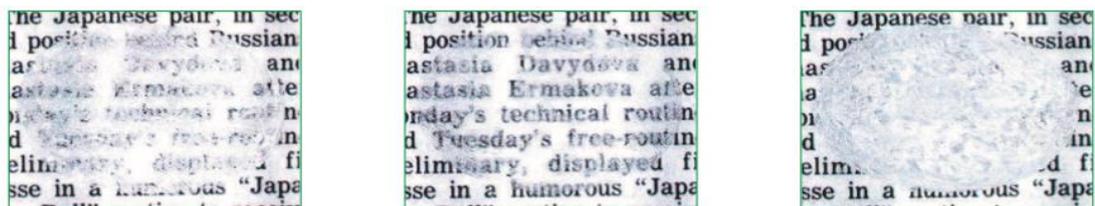


Рис.11. Проверка густоты мазка с помощью печатного текста. Слева направо: мазок хорошего качества, слишком тонкий мазок, слишком густой мазок

б) Проверка густоты мазка при микроскопическом исследовании: если можно навести резкость на полную глубину в каждом поле зрения, то густота мазка считается приемлемой (рис. 12).

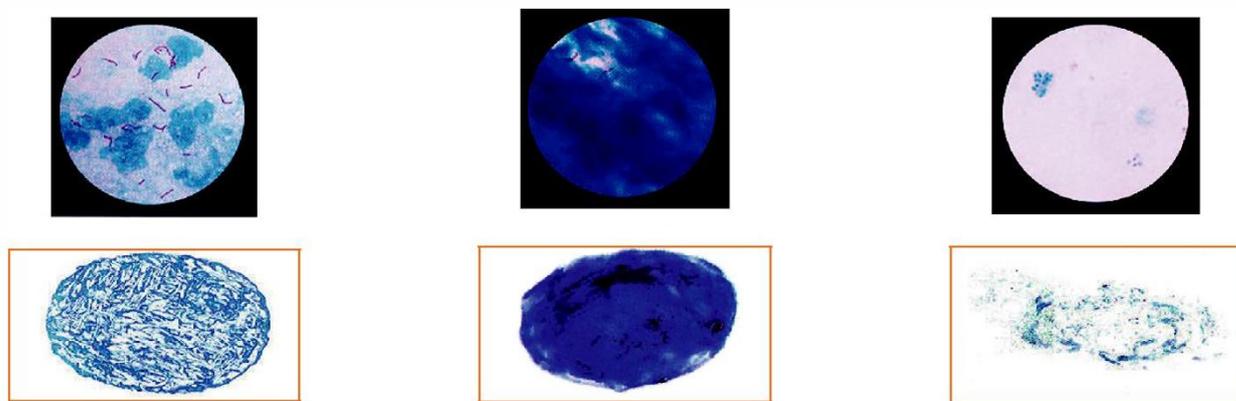


Рис.12. Проверка густоты мазка при помощи микроскопии. Слева направо: мазок хорошего качества, слишком густой мазок, слишком тонкий мазок

5. Оценка качества выполнения процедуры обесцвечивания мазка, проводимой после окраски мазка карболовым фуксином (рис. 13).

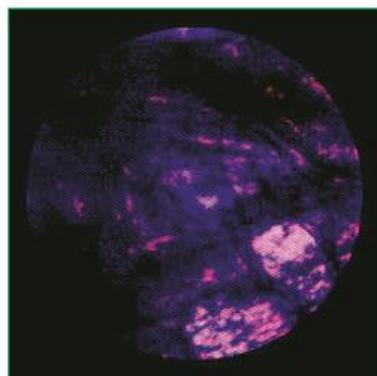
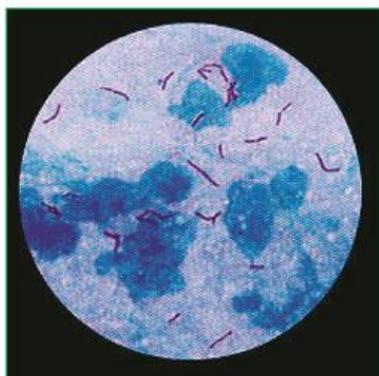


Рис.13. Качество обесцвечивания мазка мокроты

- б. Оценка чистоты мазка мокроты: в окрашенном мазке мокроты не должно быть никаких артефактов, грязи, частиц или кристаллов, появляющихся в результате перегрева в процессе окраски (рис. 14).

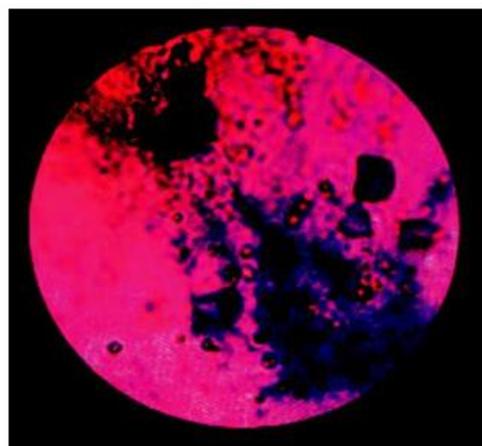
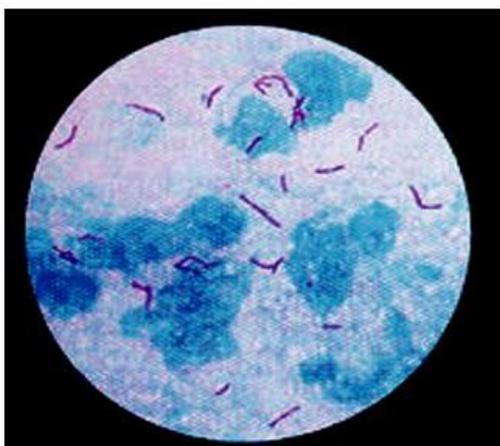


Рис.14. Чистота мазка мокроты

## ГЛАВА 2. АНАЛИЗ КАЧЕСТВА ПРИГОТОВЛЕНИЯ И ОКРАСКИ МАЗКОВ МОКРОТЫ

В связи с приобретением свойств резистентности к антимикробным препаратам, микобактерии туберкулеза часто изменяют свои тинкториальные свойства. Так, например, штамм микобактерий может не выявиться при использовании флюоресцентной микроскопии с окраской аурамином. В таких случаях на первый план выходит окраска по Цилю-Нильсену, как менее чувствительный, но более простой и дешевый метод микроскопической диагностики. Именно поэтому важно следить за качеством приготовляемых данным методом мазков мокроты.

Исследование проводилось в микробиологической лаборатории ОГКУЗ «Противотуберкулезный диспансер». В данное лечебное учреждение каждые 6 месяцев все лаборатории белгородской области, выполняющие микроскопическое исследование мазков мокроты, окрашенных по Цилю-Нильсену, обязаны предоставить 10% случайно отобранных мазков для контроля качества. Объектами исследования являлись присланные лабораториями мазки мокроты, окрашенные по Цилю-Нильсену. Всего было исследовано 150 мазков мокроты. Чтобы исключить субъективизм в оценке мазков разных лабораторий, было принято решение не сообщать исследователю о принадлежности мазков определенным лабораториям. Полученные данные были обработаны и соотнесены по лабораториям уже после проведения непосредственно исследования.

В процессе исследования анализировались следующие критерии качества мазков:

- площадь нанесения мазка;
- равномерность нанесения мазка;
- густота мазка;
- качество обесцвечивания мазка;

- наличие в мазке мокроты артефактов.

На завершающем этапе проводился контроль качества приготовленных мазков мокроты по наличию лейкоцитов.

При исследовании каждого описанного выше критерия мазку присваивался статус соответствия, либо не соответствия необходимому уровню качества. Качественно приготовленным мог считаться только мазок, получивший положительный результат на всех этапах проводимого контроля.

Сначала мазки оценивались визуально. Норме площади нанесенного мазка на стекло соответствуют 149 исследуемых нами мазков из 150 – лишь один (0,67%) имел площадь менее 1x2 см (рис. 15).

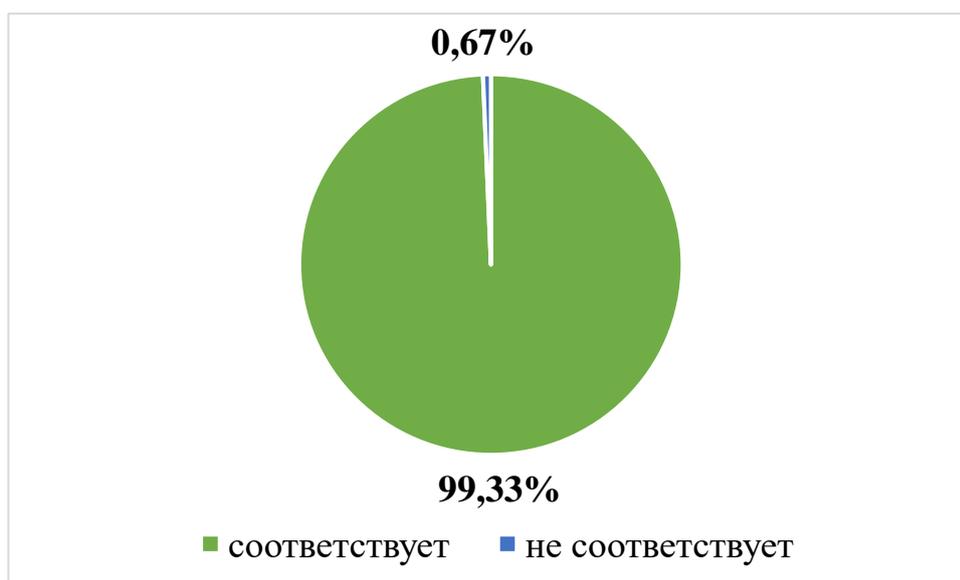


Рис.15. Площадь нанесения мазка

Затем была оценена равномерность распределения мокроты на предметном стекле (рис. 16). На данном этапе несоответствующее качество было выявлено уже у четырех мазков (2,67%). Так как говорить о случайности в контексте высокой важности правильного приготовления мазка мы не можем, то следует вывод – на местах периодически оказывается недостаточное внимание такому критерию мазков, как равномерность распределения, несмотря на то, что равномерно распределенная мокрота обеспечивает наилучшую просматриваемость полей зрения на этапе непосредственно микроскопии.

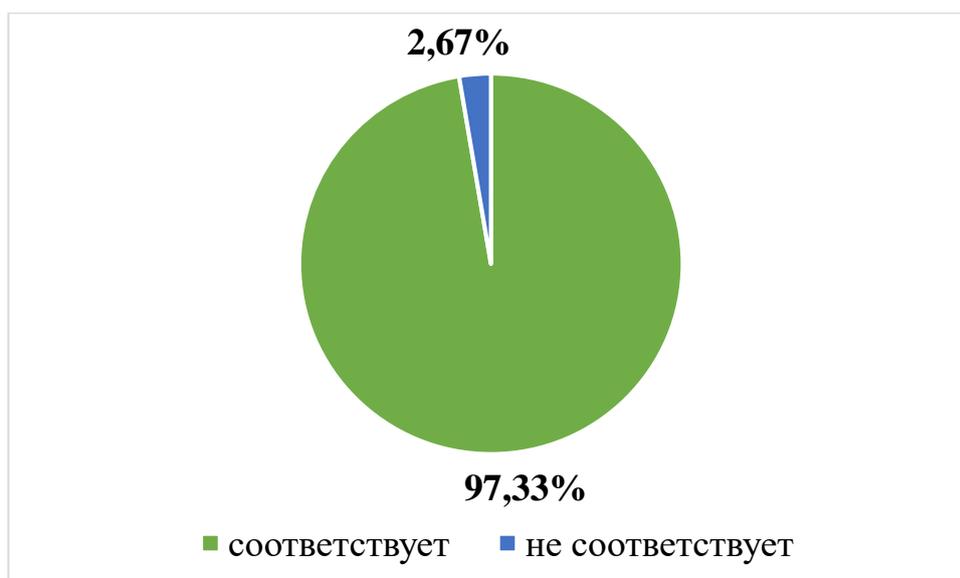


Рис.16. Равномерность нанесения мазка

Далее была проверена густота мазков (рис. 17). Проверка проходила в два этапа – сперва макроскопическая оценка при помощи газетного текста, затем микроскопия. На макроскопическом этапе было выявлено несоответствие уровню качества лишь у одного мазка (0,67%), при микроскопии же – к нему добавилось еще два (в сумме 2%). Недостаточная густота приготавливаемых мазков может послужить причиной недостаточного для обнаружения количества микобактерий. Избыточная же густота препятствует качественной микроскопии материала, что опять же может привести к ложноотрицательному результату исследования.

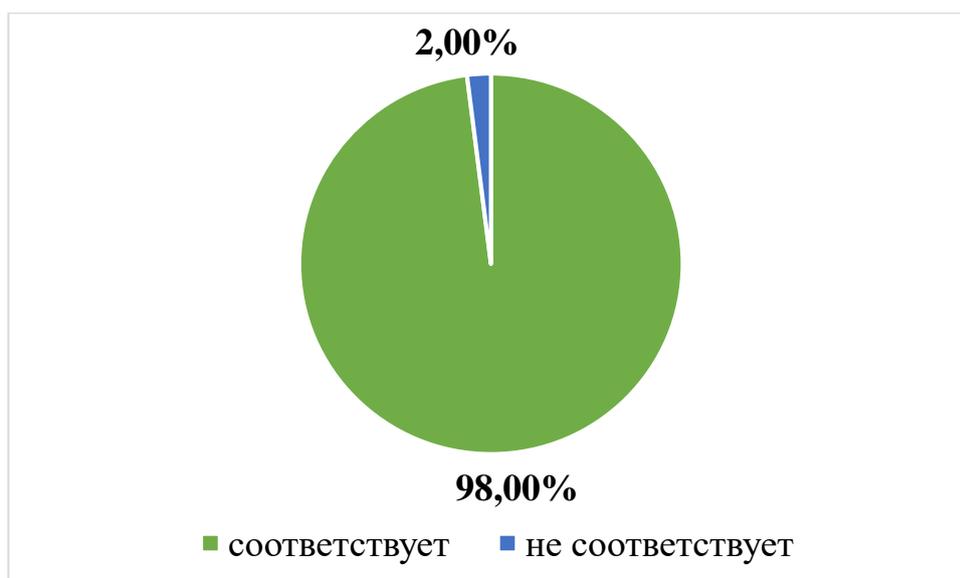


Рис.17. Густота мазков

Следующий критерий – качество обесцвечивания мазка (рис. 18). По данному критерию выявлен один недостаточно обесцвеченный мазок и один обесцвеченный слишком сильно. Обесцвечивание после нанесения карболового фуксина напрямую влияет на качество последующей микроскопии. Нарушения данной процедуры могут стать причиной негодности мазка для микроскопии.

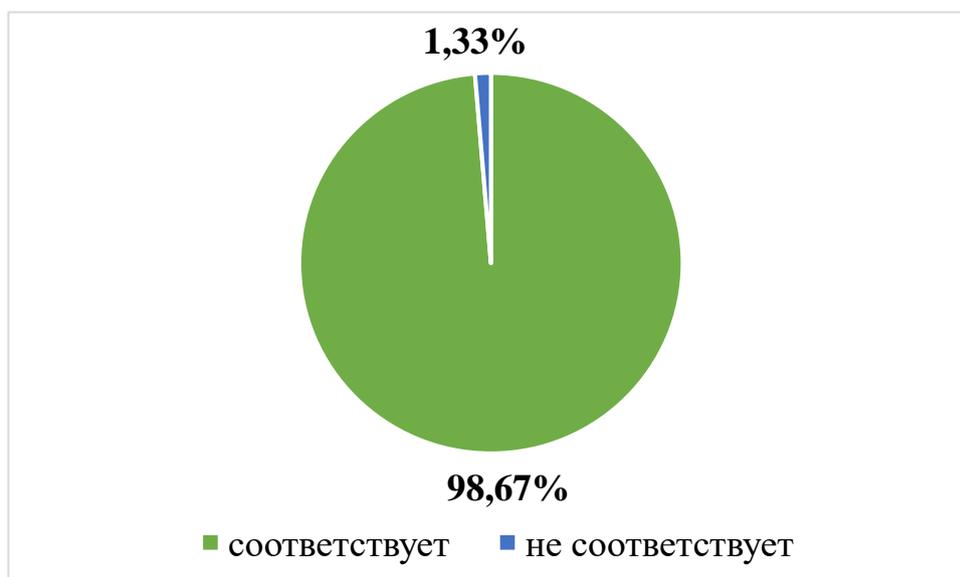


Рис.18. Обесцвечивание мазков

Как было сказано в главе 1, присутствие в мазке артефактов (рис. 19) свидетельствует об нарушении процесса приготовления мазка, или же использовании некачественных реактивов. Данные обстоятельства, помимо затруднения микроскопии самими артефактами, могут являться причиной более серьезных и малозаметных проблем, что особенно важно контролировать для обеспечения необходимого уровня качества диагностики. В двух исследуемых мазках были обнаружены единичные артефакты, что должно послужить причиной проверки качества реактивов и всего процесса приготовления мазков мокроты.

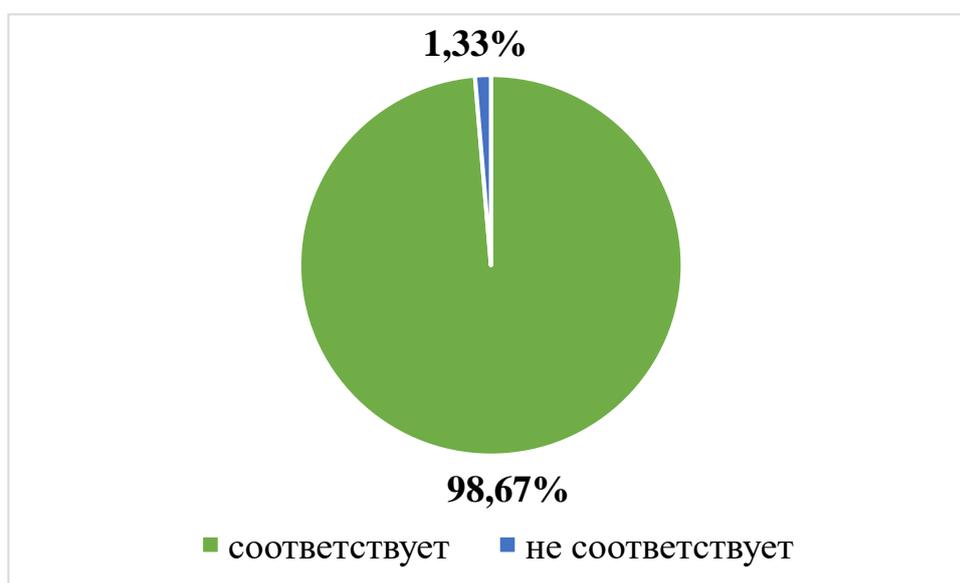


Рис.19. Наличие в мазке мокроты артефактов

Последнее исследование включало в себя микроскопию мазков для обнаружения лейкоцитов (рис. 20). Данный этап является заключительным и по его результатам можно судить об общей пригодности исследуемых мазков для диагностики микобактерий туберкулеза, по результатам исследования у пяти мазков лейкоциты были недостаточно различимы. Некоторые мазки с обнаруженными ранее проблемами прошли данное испытание и были признаны по его завершению годными, но это не может отменять факта наличия недостатков у данных мазков. В связи с важностью качественного проведения данного исследования, мазки имеющие недостатки, но получившие

положительный результат на данном этапе, продолжают считаться недостаточно качественными.



Рис.20. Контроль качества по наличию лейкоцитов

Сводная диаграмма (рис. 21) показывает процентное соотношение качественных мазков и некачественных. Малый процент некачественных мазков (10,67%) позволяет говорить нам об общем высоком уровне компетенции сотрудников лабораторий, выполняющих приготовление мазков, что в конечном итоге положительно сказывается на скорости диагностики заболевания и благоприятном прогнозе лечения.



Рис.21. Процентное соотношение качественных мазков к некачественным

Детальное соотношение качественных и некачественных мазков мокроты по оцениваемым критериям представлено на рисунке 22.

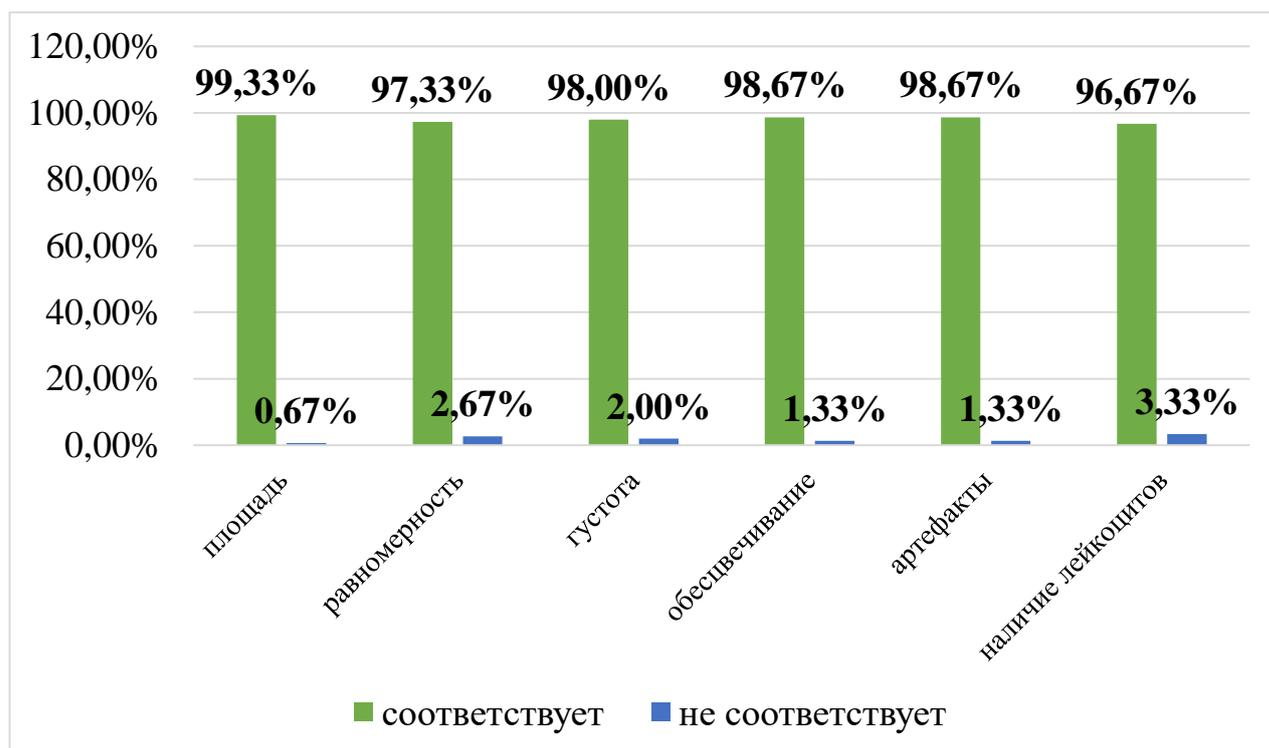


Рис.22. Детальное соотношение качественных и некачественных мазков мокроты

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов проведенного исследования позволяет нам говорить о контроле качества проводимых исследований, как первостепенной задаче медицинских лабораторий. Данного правила должны придерживаться все лаборатории без исключений. Особо остро данный вопрос стоит для лабораторий, связанных с первичной диагностикой туберкулеза. Широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов не позволяет проявлять халатность при проведении этих исследований.

В результате проведенного исследования были сделаны следующие выводы:

1. На основании анализа литературных данных, регламентирующих документов можно сделать заключение – в современной фтизиатрии для соответствия высоким стандартам качества необходимо учитывать факт распространения лекарственной устойчивости среди микобактерий туберкулеза уже на стадии первичной диагностики заболевания.

2. Лабораторный этап диагностики является одним из центральных, так как позволяет точно идентифицировать возбудителя, а в случае лекарственноустойчивого штамма провести диагностику степени устойчивости к различным лекарственным препаратам.

3. Диагностика туберкулеза легких методом микроскопии мазков мокроты, окрашенных по Цилю-Нильсену проста, достаточно эффективна, экономически выгодна, а так же обладает достаточной диагностической чувствительностью, позволяющей применять данный метод для первичной диагностики антибиотикорезистентных форм туберкулеза.

4. Микробиологические лаборатории Белгородской области, несмотря на некоторые отдельные погрешности, в целом обеспечивают достаточный уровень качества проводимых исследований, полученные при исследованиях данные можно использовать для постановки диагноза и мониторинга течения заболевания.

5. С целью исключения единичных ошибок в работе с микроскопом медицинского персонала, адаптированы для использования в лабораториях лечебной сети практические рекомендации Центрального НИИ туберкулеза РАМН для специализированных противотуберкулезных учреждений и центров микроскопии. Их применение на рабочем месте повысит качество исследования и упростит работу персонала лабораторий.

### Рекомендации

Таблица 1

Возможные причины ошибок при микроскопии и способы их устранения

Проблема	Возможная причина	Способ устранения
Тусклое поле зрения	Низкое положение конденсора. Закрытая диафрагма конденсора.	Поднять конденсор. Открыть диафрагму.
Темные объекты в поле зрения, смещающиеся при повороте окуляра	Грязный окуляр, линзы микроскопа контаминированы грибами, на линзах окуляра имеются царапины.	Протереть окуляр. Заменить окуляр.
Недостаточно четкое изображение	Возможно, перевернут препарат (мазок находится снизу стекла). Пузырек воздуха в масле. Загрязнены линзы.	Перевернуть предметное стекло. Заменить масло. Протереть линзы.
Нечеткое изображение при малом увеличении	Возможно, поверхности линз загрязнены маслом или загрязнены. Возможно повреждение линз.	Очистить линзы. Заменить линзы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ И ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антибиотикорезистентность // Википедия. [2017-2019]. Дата обновления: 27.05.2019. URL: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=100074956> (дата обращения: 04.05.2019).
2. Всемирная организация здравоохранения. Доклад [Текст]: О глобальной борьбе с туберкулезом // Всемирная организация здравоохранения. – 2017. – 6 с.
3. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика [Текст] : учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / А.А. Кишкун. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - 972 с.
4. Кошечкин В.А. Фтизиатрия [Текст]: учебник для студентов вузов, обучающихся по спец.: «Лечебное дело», «Медико-профилактическое дело», по направлению подготовки «Фтизиатрия» / В.А. Кошечкин; рец. А.К. Токмалаев. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 304 с.
5. Лечение туберкулёза // Википедия. [2011 – 2019]. Дата обновления: 10.04.2019. URL: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=99132237> (дата обращения: 27.03.2019).
6. Масленников А.А. Методы диагностики туберкулеза [Текст] - The methods of tuberculosis diagnostics: учебно-методическое пособие / А.А. Масленников, Н.И. Оболонкова, О.А. Ефремова; рец.: К.Ф. Макконен, А.Н. Придачина ; НИУ БелГУ. - Белгород : ИД Белгород, 2017. - 72 с.
7. Противотуберкулёзные препараты // Википедия. [2010-2019]. Дата обновления: 24.03.2019. URL: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=98819875> (дата обращения: 13.03.2019).
8. Российское Общество Фтизиатров. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза [Текст] / Российское Общество Фтизиатров. - М.: Российское Общество Фтизиатров, 2014. - 29 с.
9. Туберкулёз // Википедия. [2006-2019]. Дата обновления: 01.02.2019. URL: <https://ru.wikipedia.org/?oldid=97848338> (дата обращения: 06.02.2019).

10. Туберкулез // Всемирная организация здравоохранения URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (дата обращения: 11.02.19).
11. Фролькис Л.С. Терапия [Текст]: учебное пособие для студентов медицинских училищ и колледжей, обучающихся по спец. «Акушерское дело» / Л.С. Фролькис; рец.: М.В. Дзигуа, О.В. Конышева. - М. : КноРус, 2018. - 208 с.
12. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / под ред. П. К. Яблонского. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 240 с.