

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
УО «ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТЕ»

**ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ТУБЕРКУЛЕЗА**

**ПРЕАНАЛИТИЧЕСКИЙ ЭТАП ЛАБОРАТОРНОГО
ИССЛЕДОВАНИЯ**

Д.В. Шевчук, О.Е.Кузнецов

(методические рекомендации
для студентов старших курсов и врачей)

Гродно, 2006

Методы 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. Получаемые результаты оказывают помощь клиницистам в дифференциальной диагностике процессов различной локализации, способствуют раннему выявлению туберкулеза, учитываются 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.

В настоящее время, когда организационно-методические и научно-исследовательские мероприятия направлены на снижение заболеваемости туберкулезом, роль лабораторных исследований значительно возросла. Перед работниками лабораторий поставлены задачи расширять возможности диагностики и определить для клиницистов значение различных исследований в современных условиях полихимиотерапии.

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.

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.

Работники бактериологических лабораторий должны быть знакомы с методами дифференциации атипичных микобактерий.

Туберкулезу нередко сопутствуют неспецифические заболевания легких, что диктует необходимость широкого изучения неспецифической микрофлоры и грибковых инвазий. Эти исследования являются неотъемлемой частью всего комплекса дифференциальной диагностики туберкулеза.

При туберкулезе имеется определенная специфика гематологических исследований. Результаты, получаемые при различных анализах крови, позволяют судить об активности процесса, об аллергической настроенности организма больного, они имеют определенное прогностическое значение.

Дифференциально-диагностические возможности в настоящее время значительно увеличились благодаря разработке методов, позволяющих получать пунктаты из различных органов, для последующего цитологического

исследования, появлению ПЦР-диагностики, внедрению автоматизированных систем бактериологической диагностики микроорганизмов (Bactec MGIT).

Выполнение современных методов исследования различного патологического материала требует высокой эрудиции лабораторных работников, а правильное толкование получаемых результатов – знакомства клиницистов с основными методами лабораторных исследований.

ГЛАВА 1

В этой главе мы постараемся отразить наиболее значимые на наш взгляд изменения в организме человека при туберкулезе.

ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

При обследовании больных туберкулезом должны производиться следующие гематологические исследования: скорость оседания эритроцитов, определение количества эритроцитов и гемоглобина, подсчет общего количества лейкоцитов в счетной камере и их процентного состава в мазках крови. При наличии анемии рекомендуется определять количество ретикулоцитов для суждения о регенерационной способности костного мозга, в дифференциально-диагностических случаях – количество тромбоцитов [6].

Специалисты клинической лабораторной диагностики должны учитывать возможность возникновения своеобразных реакций кроветворных органов при туберкулезе и изменения картины крови при лечении антибактериальными препаратами.

Для решения вопроса об активности туберкулезного процесса могут быть применены: определение гематологических сдвигов при проведении пробы Коха (Рабухина-Йоффе), исследование фагоцитарной активности лейкоцитов крови и их сенсibilизация к туберкулину и некоторым другим антигенам.

Сдвиги в гемограмме.

Туберкулезная инфекция не является сильным раздражителем кроветворной системы, и это обуславливает отсутствие специфической для туберкулеза картины крови, и развитие преимущественно незначительных сдвигов в гемограмме. Изменения гематологических показателей находятся в зависимости от характера процесса, тяжести течения, реактивности организма, состояния его защитных сил. При этом гемограмма больше отражает фазу процесса, чем его клиническую форму. Это положение относится в основном к фазе инфильтрации [7].

Даже у больных с распространенными деструктивными формами туберкулеза, при достаточных компенсаторных возможностях и отсутствии свежих воспалительных изменений, картина крови может быть нормальной.

При обострении туберкулезного процесса наиболее постоянными гематологическими изменениями являются палочкоядерный сдвиг (влево) нейтрофилов и ускорение СОЭ. Сдвиг влево в большинстве случаев бывает небольшим. Общее количество лейкоцитов у большинства пациентов находится в пределах нормы, при остром и тяжелом течении туберкулеза имеют место лейкоцитоз, чаще не превышающий $15 \times 10^9/\text{л}$, и более резкий сдвиг влево.

Повышение количества лейкоцитов, нередко с появлением в крови молодых форм нейтрофильного ряда – метамиелоцитов и миелоцитов, имеет место при

присоединении неспецифических воспалительных процессов, что должно быть отифференцировано в клинике.

У больных туберкулезом в группе лимфоцитов крови преобладают узкопламенные формы. В фазу вспышки туберкулезного процесса нередко наблюдается снижение числа лимфоцитов. Выраженная лимфопения свидетельствует о тяжести процесса. Высокие цифры лимфоцитов отмечаются при стабилизации очаговых изменений в легких. На количестве лимфоцитов сказывается также методика подсчета лейкоцитарной формулы: лимфоциты, находящиеся в большем числе в центральных отделах мазка, при подсчете через весь мазок определяются, соответственно, в большем проценте, чем при счете по его краю.

Эозинофилы при обострении процесса могут, как оставаться в пределах нормы (2-4%), так и уменьшаться (до 0,5%) или переставать определяться. Последнее, является неблагоприятным показателем. Выраженная эозинофилия связана с аллергическими явлениями, которые часто являются следствием приема антибактериальных препаратов. Не следует забывать о возможности развития летучих эозинофильных инфильтратов (аллергическая пневмония).

Моноцитоз в клинике туберкулеза бывает связан с формированием новых бугорков в органах. Стойкое, длительно держащееся повышение количества моноцитов (предел нормы 4-8%) имеет место при первичном туберкулезе, что обусловлено характерным для него гематогенным распространением возбудителя по органам, а также (в меньшей степени) при гематогенно-диссеминированных процессах. При тяжелом, осложненном течении первичного туберкулеза и, реже, при вторичных формах наблюдается монопения (2-3%), свидетельствующая об угнетении ретикуло-гистиоцитарной системы. В последующем, наряду с нормализацией показателей гемограммы, может наблюдаться моноцитоз, который должен расцениваться как благоприятный признак, отражающий восстановление функции ретикуло-гистиоцитарной системы.

Отражаемые лейкоцитарной формулой процентные соотношения отдельных групп клеток коррелируют с их абсолютными величинами лишь при нормальном общем количестве лейкоцитов. При значительном увеличении или уменьшении общего числа лейкоцитов крови следует уточнять, за счет какой группы клеток это происходит, т.е. учитывать не только относительные, но и абсолютные числа.

Со стороны красной крови у больных туберкулезом чаще определяется небольшое снижение гемоглобина и значительно реже снижение количества эритроцитов, т.е. имеет место уменьшение насыщения эритроцитов гемоглобином. Выраженная анемия может возникнуть при внелегочных поражениях с наличием казеозных изменений, в частности при первичном туберкулезе с поражением лимфатических узлов, туберкулезе кишечника, диссеминированных процессах с вовлечением органов кроветворения (селезенка, костный мозг), при некоторых осложнениях, как, например, амилоидозе внутренних органов [8].

При цирротических процессах в легких имеется склонность к эритроцитозу, что является компенсаторной реакцией в условиях значительного уменьшения

дыхательной поверхности легких. Уменьшение явлений легочной недостаточности сопровождается снижением количества эритроцитов. Это должно расцениваться как благоприятный признак.

Ретикулоциты – молодые, не вполне созревшие эритроциты. У большинства больных туберкулезом их количество находится в пределах нормы.

При обычной окраске мазка в цитоплазме нейтрофилов может выявляться в виде крупных зерен токсическая (токсогенная) зернистость. Эта грубая зернистость наблюдается при острых воспалительных и нагноительных процессах, сепсисе и свидетельствует о тяжести патологического процесса.

Увеличение количества тромбоцитов наряду с повышением уровня серотонина в крови наблюдается у больных с хроническими распространенными формами туберкулеза легких в период обострения. Выраженное нарастание количества тромбоцитов отмечается у больных туберкулезом при осложнениях нагноительными процессами различной локализации и этиологии, а также амилоидозом. Указанные осложнения в 75% случаев сопровождаются тромбоцитозом от 80 до 200 %.

При некоторых формах туберкулеза, характеризующихся высокой сенсibiliзацией, нестойкостью иммунитета и склонностью к острой гематогенной диссеминации, в первую очередь при первичном туберкулезе с казеозными изменениями в лимфатических узлах и при остром туберкулезном сепсисе могут наблюдаться своеобразные реакции кроветворной системы (маски), симулирующие идиопатические заболевания крови. Они имеют обратимый характер и при успешном лечении основного заболевания подвергаются обратному развитию. К числу таких реакций относятся лейкопении, различного вида анемии (гипохромная, апластическая, гемолитическая), полицитемия, лейкомоидные реакции, геморрагический диатез.

ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ

Среди различных биохимических систем организма системе белков принадлежит, несомненно, первостепенная роль [9]. Поэтому анализ изменений организма при туберкулезе мы начнем с нее.

1. Уменьшение содержания альбумина и возрастание уровня альфа-1 и альфа-2 глобулинов – такая диспротеинемия обуславливается усилением биосинтеза белков острой фазы (альфа-1 и альфа-2 глобулинов, составляющих группу гликопротеинов) и подавлением, вследствие интоксикации, компенсаторной продукции альбумина гепатоцитами. Наблюдается чаще всего при остром воспалительном процессе, сепсисе, начальной стадии пневмонии, туберкулезе легких с преобладанием процессов инфильтрации и экссудации.

Тип протеинограммы	Альбумин	Глобулины			
		α_1	α_2	β	γ

Острый воспалительный процесс	↓	↑	↑	=	=
-------------------------------	---	---	---	---	---

2. Умеренное снижение выраженности фракций альбумина и значительное увеличение уровня α_2 (нередко α_1) и γ -глобулина. Последняя фракция белков усиленно синтезируется клеточными элементами системы фагоцитирующих мононуклеаров. Содержание бета-глобулинов и общего белка не изменяется. Характерно уменьшение показателя $A/(\alpha_2+\gamma\text{-глобулины})$ ниже 2,2. Наблюдается при синдроме хронического воспаления (холецистит, цистит, пиелит, поздняя стадия пневмоний, хронические формы туберкулеза легких).

Тип протеинограммы	Альбумин	Глобулины			
		α_1	α_2	β	γ
Хроническое воспаление	↘	↗	↑	=	↑

3. Значительное уменьшение содержания альбумина, повышение концентрации α_2 и β -глобулинов (за счет α_2 -микροглобулинемии или увеличения уровня липопротеинов очень низкой плотности – ЛПОНП) при умеренном снижении уровня γ -глобулинов (иммуноглобулинов G и A). Этот тип изменений свойственен нефротическому симптомокомплексу, терминальной стадии туберкулеза легких.

Тип протеинограммы	Альбумин	Глобулины			
		α_1	α_2	β	γ
Нефротический симптомокомплекс	↓	=	↑	↑	↘

Альбумино/глобулиновое соотношение (А/Г коэффициент составляющий в норме 1,2-1,8) снижается:

- при хронических диффузных поражениях печени
- пневмонии
- плевриты
- туберкулез
- воспалительные процессы различной локализации
- злокачественные новообразования
- амилоидоз

Коэффициент $A/(\text{суммарная фракция } \alpha_1 \text{ и } \alpha_2 \text{ глобулинов})$ составляет в норме 3,9-6,1, является весьма информативным и адекватным тестом оценки активности воспалительного процесса. При умеренных, выраженных и резких изменениях воспалительного характера в бронхолегочной системе величина этого соотношения уменьшается соответственно до значений: 3,8-2,8; 2,7-2,0; ниже 2,0.

Важно определение С-реактивного белка в случае скрыто протекающего активного воспалительного процесса, не сопровождающегося характерными клиническими и другими проявлениями. Во многих случаях, появление положительной пробы на С-реактивный белок служит первым сигналом вспышки туберкулезного процесса или эстацербации старых очагов, когда обычными лабораторными методами исследования еще не улавливаются патологические изменения.

По-видимому, надо согласиться с мнением W.Danzer, что результаты определения С-реактивного белка зависят от длительности и эффективности проводимой противотуберкулезной терапии. Положительная проба на С-реактивный белок ослабевает, а затем становится отрицательной, если пациент получает длительное и достаточно эффективное лечение. Но у пациентов, которым лечение не назначалось или оно было малоэффективным, реакция на С-реактивный белок нередко положительная в течение нескольких лет. Кроме того, стойкая положительная проба на С-реактивный белок у пациента, несмотря на длительное противотуберкулезное лечение, может свидетельствовать о вторичном заболевании, которое маскируется туберкулезом легких.

Активность изоферментов ЛДГ (лактатдегидрогеназы) в легочной ткани человека может увеличиваться при пневмониях и других заболеваниях.

Значительное увеличение активности щелочной фосфатазы наблюдается при заболеваниях костной ткани (сопровождающихся ростом костной ткани):

- метастазы в костную ткань
- туберкулез костей и суставов

В настоящей главе мы приводим результаты некоторых исследований сыворотки крови [4].

В таблицах обнаруженные изменения даны в виде интервалов относительных величин, где 100% - норма, которая устанавливалась по результатам исследования практически здоровых людей и доноров.

Содержание общего белка в крови больных различными формами вновь выявленного туберкулеза значительно не изменяется.

Содержание белковых фракций в сыворотке крови больных различными формами туберкулеза легких в %

Форма заболевания	Альб.	α_1	α_2	β	γ
Очаговый туберкулез легких	90-100	100-110	100-120	100-105	100-120
Инфильтративный туберкулез легких	90-100	100-125	100-122	100-120	100-110
Диссеминированный туберкулез легких	80-100	100-110	10-125	100-110	100-155
Фиброзно-кавернозный туберкулез легких	75-100	100-120	100-130	100-125	100-135
Эмпиемы плевры	90-100	100-140	100-135	100-115	100-125

Активность некоторых ферментов в сыворотке крови больных различными формами туберкулеза легких в %:

Форма заболевания	АсТ	АлТ	Алд	Лп
Очаговый туберкулез легких	100-190	100-150	97-100	100-107
Инфильтративный туберкулез легких	100-195	100-130	90-100	100-105
Диссеминированный туберкулез легких	100-120	100-125	97-100	100-105
Фиброзно-кавернозный туберкулез легких	100-190	100-150	100-110	100-105
Эмпиемы плевры	100-160	90-100	85-100	100-105

АсТ – аспаратаминотрансфераза

АлТ – аланинаминотрансфераза

Алд – альдолаза

Лп - липаза

Содержание общих гликопротеидов у больных различными формами туберкулеза в %:

Форма заболевания	%
Очаговый туберкулез легких	100-110
Инфильтративный туберкулез легких	100-120
Диссеминированный туберкулез легких	100-130
Фиброзно-кавернозный туберкулез легких	100-120
Эмпиемы плевры	100-110

Содержание α - и β -липопротеидов у больных различными формами туберкулеза легких в %:

Форма заболевания	α -ЛП	β -ЛП
Очаговый туберкулез легких	65-100	63-100
Инфильтративный туберкулез легких	55-100	60-100
Диссеминированный туберкулез легких	65-100	55-100
Фиброзно-кавернозный туберкулез легких	68-100	60-100
Эмпиемы плевры	70-100	65-100

У больных всеми формами легочного туберкулеза количество общих липопротеидов значительно снижено (примерно на 30-40%).

ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ

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

Мокрота – патологическое отделяемое органов дыхания.

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

Мокроту 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.

Макроскопическое исследование

Оценивают:

- цвет
- количество
- запах
- консистенцию
- характер
- форма (по Базарновой)
- реакцию (рН как правило щелочная, кислой становится при разложении и от примесей желудочного сока, что помогает дифференцировать кровохарканье от кровотечения из ЖКТ).

Цвет – преобладание одного из компонентов мокроты придает ей соответствующий оттенок, зависит от характера мокроты и ее примесей, от вдыхаемых частиц, окрашивающих мокроту.

Сероватый, желтоватый, зеленоватый цвет мокроты зависит от содержания и количества гноя (элементы «белой» крови – нейтрофилы, лимфоциты). Ржавый, красный, коричневый цвет – от примеси крови и продуктов ее распада. Серый и черный цвет придают мокроте уголь и пыль, белый – мучная пыль. Вдыхаемая пыль, содержащая красители, может окрашивать мокроту в другие цвета.

Количество – зависит от характера патологического процесса.

Большое количество указывает на наличие у пациента полостных образований (абсцесс, бронхоэктазы, туберкулез с деструкцией легочной ткани, гангрена, крупозная пневмония).

Запах (специфический) – появляется при распаде ткани (онко, гангрена, бронхоэктазы).

Характер мокроты – мокрота как правило неоднородна.

Содержание в мокроте слизи, гноя, крови, серозной жидкости, фибрина определяет ее характер. Он может быть:

- слизистый
- слизисто-гнойный
- слизисто-гнойно-кровянистый
- серозный
- серозно-гнойный

- кровянисто-слизистый и др.

- доминирующий фактор ставится на последнее место

Консистенция – зависит от состава мокроты

- жидкая – от наличия серозной жидкости
- полужидкая – от присутствия серозной жидкости в слизисто-гнойной мокроте
- клейкая – при большом содержании фибрина
- вязкая – при наличии слизи, муцина.

Особое внимание необходимо обратить на наличие патологических примесей.

Исследование гнойных комочков мокроты особенно информативно для выявления микобактерий туберкулеза.

В гнойной мокроте при неспецифических процессах могут определяться плотные, гнойные образования – пробки Дитриха.

При кавернозном туберкулезе легких могут обнаруживаться плотные беловатые образования - линзы Коха – рисовидные зерна, состоящие из микобактерий туберкулеза и казеозных масс.

Могут обнаруживаться мелкие желтоватые зернышки (манная крупа) – актиномицеты (друзы) – при актиномикозе.

При туберкулезе могут определяться белесоватые дорожки – тетрада Эрлиха (распад петрификатов, очагов Гона) состоящая из:

1. микобактерий туберкулеза
2. извести
3. холестерина
4. эластических волокон

При исследовании патологических примесей можем обнаружить пленки (при разрыве эхинококкового пузыря).

Включения, патологические элементы, паразиты в мокроте обнаруживают при рассмотрении ее в чашке Петри на белом фоне или черном фоне, при этом полезно пользоваться лупой.

Таким образом в мокроте можно обнаружить:

Спирали Куршмана	Беловатые, прозрачные, штопорообразные извитые трубчатые тела, резко отграниченные от остальной бесформенной массы мокроты, имеющие диагностическое значение при бронхиальной астме
Фибриновые свертки	Древовидно разветвленные образования беловатого или слегка красноватого цвета длиной до 10-12 (и даже 18) см, эластичной консистенции, состоящие из слизи и фибрина, имеющие значение при фибринозном бронхите, реже при крупозной пневмонии
Чечевицы, или рисовидные тельца (линза Коха)	Зеленовато-желтоватые, довольно плотные образования творожистой консистенции

	величиной от булавочной головки до небольшой горошины, состоящие из детрита, туберкулезных палочек и эластических волокон; обнаруживаются <u>при кавернозном туберкулезе легких</u>
Гнойные пробки (пробки Дитриха)	Комочки беловатого или желтовато-сероватого цвета величиной с булавочную головку со зловонным запахом, состоящие из детрита, бактерий, кристаллов жирных кислот; встречаются при бронхоэктазах, гангрене легкого
Дифтеритические пленки из зева и носоглотки	Сероватые обрывки, местами окрашенные кровью, состоящие из фибрина и некротизированных клеток
Некротизированные кусочки легкого	Черноватые образования различной величины, содержащие эластические волокна и зернистый черный пигмент, иногда пронизанные соединительной тканью, кровеносными сосудами, лейкоцитами и эритроцитами; встречаются при абсцессе и гангрене легкого
Кусочки опухоли легкого	Чаще имеют вид мелких частиц, окутанных кровью (достоверно выявляются лишь при микроскопии)
Друзы актиномикоза	Мелкие зернышки беловатого или зеленовато-сероватого цвета, окутанные гнойной массой, содержащиеся в скудном количестве; структура их отчетливо выявляется при микроскопии
Пузыри эхинококка	Образования разной величины – от маленькой горошины до грецкого ореха и больше, серовато-белого или желтого цвета, иногда пропитанные кровью или известью; встречаются в случае свежего разрыва эхинококковой кисты легкого и выкашливания обильного количества бесцветной прозрачной жидкости
Инородные тела	Случайно попавшие из полости рта: вишневые косточки, семена подсолнечника, ореховая скорлупа и т.д.

Особенность мокроты:

при отстаивании она делится на слои (в случаях выделения мокроты при опорожнении обширных полостей в легком - абсцесс, бронхоэктазы) за счет разной относительной плотности составляющих компонентов:

- а) абсцесс – 2 слоя: - нижний (плотный)
- верхний (жидкий)
- б) гангрена (гнилостная мокрота) – 3 слоя:
- нижний (плотный, гнойный)

- средний (серозный)
- верхний (пенистый)

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.

Признаки воспаления

- Нейтрофилы (гнойная мокрота) – все поле зрения; видим зернистость, ядра. При хронических воспалительных процессах могут быть дегенеративные изменения нейтрофилов.
- Эозинофилы – хорошо видны (окраска по методу по Романовского-Гимзе). Встречаются при бронхиальной астме и других аллергических состояниях (гельминты, новообразования, эозинофильные инфильтраты)
- Лимфоциты – видны при микроскопии нативного препарата (остальные клетки белой крови видны в окрашенных препаратах) – в небольших количествах встречаются в норме, количество их увеличивается при инфекционном процессе (туберкулез и др.), инфаркте легкого, новообразованиях легкого;
- Эритроциты – чаще всего не изменены (могут быть и свежие и дегенеративно измененные эритроциты – признак длительных хронических процессов, онкологии). В большом количестве обнаруживаются в мокроте, с примесью крови (легочное кровотечение, инфаркт легкого, застой в малом круге кровообращения, новообразования, туберкулез и др.)
- Плоский эпителий – показатель плохо собранной мокроты.
- Цилиндрический эпителий – в большом количестве обнаруживается при острых катарах верхних дыхательных путей, бронхиальной астме, бронхите, астмоидных состояниях, новообразованиях легкого, пневмосклерозе.
- Кубический эпителий – обнаруживается при пневмонии.

Если встречаются молодые эпителиальные клетки (парабазальный, промежуточный эпителий), возможно есть раздражающий фактор внелегочной локализации (язва в полости рта, воспалительный процесс в полости рта, лейкоплакия).

- Альвеолярные макрофаги – присутствуют в мокроте в большом количестве, выполняют защитную функцию.

- Эластические волокна – определяются при распаде легочной ткани - в начале абсцессов, гангрены, опухоли, при кавернозных формах туберкулеза. Эластические волокна могут покрываться мылом и тогда они называются коралловые эластические волокна. Если обнаруживаем такие волокна, то обязательна окраска мазка по Цилю-Нильсену для выявления МБТ.
- Обызвествленные эластические волокна – признак реактивации очага Гона или петрификатов.

Исследование мокроты на наличие микобактерий туберкулеза

- Прямая бактериоскопия
- Люминесцентная бактериоскопия
- Культуральный метод – посев на среды.
- Биологический метод – заражение лабораторных животных.
- ИФА
- ПЦР
- Биочипы
- ВАСТЕС MGIT

Мокроту на МБТ в амбулаторных условиях собирают трижды, после соответствующего туалета полости рта:

1. Первая проба – в поликлинике или стационаре, в присутствии медицинского работника, через 1-2 часа после сна.
2. Вторая проба – в тот же день через несколько часов (3-4 часа).
3. Третья проба – на следующий день пациент приносит мокроту сам.

➤ Посуда чистая, стерильная, с закрывающейся пробкой.

➤ Мазки готовят в тот же день.

При отсутствии у пациента мокроты можно накануне вечером и утром, либо в течение 2-х дней до обследования назначить отхаркивающие средства, раздражающие ингаляции.

У нетранспортабельных пациентов забор мокроты производит участковая медсестра поликлиники на дому в стерильную посуду и доставляет в бактериологическую лабораторию.

Прямая бактериоскопия

Бактериоскопический метод диагностики туберкулеза – исследование мазка после обработки и окраски по методу Циля-Нильсена. Микобактерии туберкулеза окрашиваются в красный цвет. Преимущество этого метода заключается в скорости получения результата, однако возможности его ограничены [11,12,13], в частности, известно, что положительный результат – обнаружение МБТ в мазке –

может быть получен только при значительном содержании микробных тел в мокроте: от 50 тыс. микробных клеток в 1 мл (таблица 1.1.).

Таблица 1.1.

Количество микобактерий выявленных при бактериоскопии,
число жизнеспособных микобактерий в пробе мокроты и вероятность
положительного результата исследования
(H.L. David, Bacteriology of mycobacterioses. Atlanta, USA, 1996)

Количество микобактерий выявленных при бактериоскопии	Примерное число МБТ в 1 мл мокроты	Вероятность положительного результата исследования
0 в 100 полях зрения	менее 1 000	Менее 10%
1 – 2 в 300 полях зрения	5 000-10 000	50%
1 – 9 в 100 полях зрения	около 30 000	80%
1 – 9 в 10 полях зрения	около 50 000	90%
1 – 9 в каждом поле зрения	около 100 000	96,2%
10 и более в поле зрения	около 500 000	99,95%

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 [3].

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)

Препарат после окраски микроскопируют с иммерсионной системой при 1000-кратном увеличении.

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 докрашивают 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.

-
- Считают не менее 100 полей зрения, если не нашли КУБ то считают еще 100 полей зрения.
-

Регистрация результатов с указанием количества обнаруженных КУБ проводится следующим образом:

НЕТ КУБ на 100 полей зрения	0
1-9 КУБ на 100 полей зрения, указывается число	
10-99 КУБ на 100 полей зрения	+ (скудное)
1-10 КУБ на 1 поле зрения	++ (умеренное)
Более 10 КУБ на 1 поле зрения	+++ (обильное)

Рекомендуется еще один препарат докрасить пикриновой кислотой (0,25-0,5%). Просмотр двух препаратов (одного докрашенного метиленовым синим, а другого пикриновой кислотой) увеличивает процент нахождения МТ. При докрашивании препарата пикриновой кислотой фон препарата изменяется на желтый, тем самым облегчается процедура микроскопии микобактерий, окрашивающихся в красный или малиновый цвет.

Исследования бактериоскопическим методом может выполняться в следующих учреждениях:

- НИИ медицинского профиля
- Областная, городская и районная больница
- Взрослая и детская поликлиника
- Участковая больница
- Сельская врачебная амбулатория
- Психиатрическая и наркологическая больница и диспансер
- Санаторий
- ИТ учреждения

Люминесцентная бактериоскопия

Основана на различии свечения микроскопируемого объекта в ультрафиолетовом или коротковолновом спектре света. Окраска производится флюорохромами – органическими красителями (аурмин, родамин). МБТ под действием УФ-лучей в темном поле люминесцентного микроскопа светятся в виде золотистого цвета палочек. Высокая контрастность микроскопической картины позволяет проводить исследование под меньшим увеличением (400-крат), увеличивая площадь одновременно просматриваемого поля зрения, сокращая время, затрачиваемое на поиск единичных микобактерий, просмотр всего мазка. Этот метод особенно подходит для исследования олигобациллярного материала.

Информативность бактериоскопии с применением флюорохромов по данным различных авторов может повышаться на 15 – 30%.

Данный метод не применим для бактериоскопии мочи, в связи с наличием в ней большого количества микобактерий – сапрофитов.

Метод флотации.

Метод основан на том, что после встряхивания водной суспензии легких углеводов (ксилол, толуол, бензин и т.д.) и МБТ, а затем ее отстаивании, последние, адсорбируясь на поверхности пузырьков углеводорода, всплывают. Образовавшееся на поверхности раствора флотационное кольцо содержит МБТ в большем количестве, чем остальная часть раствора и служит материалом для приготовления мазка.

Информативность бактериоскопии с применением флотационного метода может повышаться на 10%.

Методика (метод Поттенджера):

- свежeweыделенную мокроту (не более 10-15 мл) помещают в узкогорлую бутылку

- приливают двойное количество 0,5% раствора едкой щелочи, смесь энергично встряхивают 10-15 мин.
- приливают 1 мл ксилола (можно бензина, толуола) и около 10 мл дистиллированной воды для разжижения мокроты, снова встряхивают 10-15 мин.
- доливают дистиллированную воду в таком количестве, чтобы уровень жидкости поднялся до горлышка бутылки.
- оставляют стоять на 40-50 мин
- образовавшийся верхний беловатый слой снимают по каплям пипеткой и наносят на предметные стекла, предварительно подогретые до 60 градусов (стекла для подогревания можно положить на металлический поднос и покрыть им водяную баню). Каждую последующую каплю наносят на предыдущую, подсушенную.
- препарат фиксируют, красят по Цилю-Нельсену и микроскопируют.

Метод седиментации

Основан на осаждении МБТ из раствора при добавлении хлороформа и центрифугировании. Из полученного осадка готовят мазок, окрашивают по Цилю-Нельсену и микроскопируют.

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) [13].

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.

Следует отметить, что потребности микробов в ростовых веществах весьма переменчивы и существенно зависят от условий культивирования. Имеющиеся в

литературе сведения по этому вопросу немногочисленны и зачастую противоречивы.

В популяции МБТ обычно встречаются быстро и медленно растущие, персистирующие и лекарственно-устойчивые штаммы микобактерий. В зависимости от преобладания тех или иных штаммов МБТ с разными свойствами, меняется скорость и характер их роста на питательных средах, а при снижении жизнеспособности МБТ их рост на среде может не только замедлиться, но даже и не появиться.

Первичные культуры микобактерий, выделенные из патологического материала, особенно чувствительны к отсутствию факторов роста. По-видимому, при вегетировании в тканях организма они теряют способность самостоятельно синтезировать такие вещества. Следовательно, для таких культур необходимы полноценные питательные среды .

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.

Для культивирования и дифференциации микобактерий туберкулёза используется большое количество разнообразных по составу и консистенции питательных сред.

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,

особенно при их пониженной жизнеспособности, что особенно часто встречается в условиях химиотерапии.

Разработка новых плотных питательных сред, позволяющих ускорить выделение микобактерий, повысить интенсивность их роста, а также, что весьма важно, снизить себестоимость в условиях массового применения, является несомненно актуальной проблемой, заслуживающей серьезного внимания, которой и посвящена настоящая работа.

- На кафедре фтизиатрии гродненского медицинского университета совместно с сотрудниками ГОУЗ «Фтизиатрии» и УОЗ «Гродненская областная клиническая больница» на протяжении 2001-2005 годов разрабатывались и апробировались к использованию новые плотные питательные среды с частичной заменой животного белка на более дешевый – растительный, и L-аспарагина на лизин. По результатам проведенных исследований практическому здравоохранению предложен ряд новых, эффективных питательных сред:
- плотная питательная яично-овощная среда Кузнецова (патент ...)
- плотная питательная яично-овощная среда с лизином и рибофлавином (патент ...)
-
-
- среда Левенштейна-Йенсена предварительно замороженная (эффект «замораживания и оттаивания») (патент...)

Диагноз туберкулеза у пациента подтверждается на основании лабораторного исследования при обнаружении в диагностическом МБТ при параллельных микроскопических и культуральных исследованиях. Именно поэтому исследования в микробиологических лабораториях противотуберкулезной службы, помимо микроскопии мазков из клинического материала, должны обязательно включать культуральные исследования, направленные на идентификацию кислотоустойчивых микобактерий и определение их принадлежности к виду *M. tuberculosis* или к другим видам нетуберкулезных микобактерий, а также определение чувствительности микобактерий к лекарственным препаратам.

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.

МБТ – очень требовательные гетеротрофы, нуждающиеся в глутаминовой и особенно аспарагиновой кислоте и глицерине (источнике углеводов) Стимулятором роста является лецитин, содержащийся в больших количествах в яичном желтке.

Показания к проведению бактериологического исследования

В связи с ограничением объема массовых флюорографических обследований должны проводиться бактериологические исследования на туберкулез у лиц из контингентов повышенного риска заболевания туберкулезом:

- с остаточными туберкулезными изменениями (VII группа диспансерного учета)
- больных хроническими неспецифическими болезнями органов дыхания
- больных с хроническими заболеваниями мочеполовой системы (хронический пиелонефрит, цистит, простатит, мочекаменная болезнь, осложненная пиелонефритом, лица с неясными болями в поясничной области, расстройством мочеиспускания, находящиеся на гемодиализе, после пересадки почки)
- перенесшие туберкулез любой локализации и имеющих урологические жалобы с дизурией, гематурией и альбуминурией
- женщин с бесплодием и хроническими воспалительными заболеваниями гениталий
- работников из неблагоприятных по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйств
- с гиперэргическими реакциями Манту и имеющих контакт с больным туберкулезом
- нетранспортабельных больных
- при подозрении на туберкулез легких, туберкулез лимфатических узлов, костно-суставной и туберкулез других локализаций
- бактериологическое обследование на туберкулез производится у всех лиц при обращении в поликлинику за медицинской помощью с субфебрильной температурой неясной этиологии, грудной симптоматикой и простудными заболеваниями
- рентгеноположительные лица обследуются при наличии отягощающих факторов (перенесенные тяжелые заболевания, длительное лечение кортикостероидными препаратами и др.)

Бактериологическому исследованию подвергается самый разнообразный материал: мокрота, промывные воды бронхов, желудка, экссудат, отделяемое ран, моча, ликвор, биопсийный и секционный материал и др.

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.

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

Доставка материала на исследование

Результативность бактериологического обследования зависит от правильности сбора патологического материала, хранения и его доставки, особенно от больных с бронхолегочными заболеваниями. При необходимости транспортировки патологического материала на дальние расстояния (особенно в летний период) необходимо применять консерванты, которыми должна снабжать специализированная баклаборатория. В качестве консервантов употребляют стерильные: 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия, 10% раствор глицерина на дистиллированной воде и 2-3% раствор борной кислоты на дистиллированной воде. Патологический материал заливается в соотношении 1:1, вязкая мокрота 1:2, 1:3. В случае использования консерванта допускается более длительное хранение патологического материала (до 2-3 суток в условиях холодильника).

Материал доставляется в лабораторию в стерильной, хорошо закрытой посуде. С целью максимально гомогенизировать материал и подавить рост неспецифической гнилостной и гноеродной флоры, при отсутствии предварительной консервации, материал обрабатывается 10% трехзамещенным фосфорнокислым натрием (фосфат натрия), или 2%-6% стерильным водным раствором серной кислоты (метод Гона).

Для повышения информативности метода целесообразно исследовать патологический материал 3-кратно, в течение одной недели. Такая мера повышает чувствительность метода на 3,4-5,8%. Рядом авторов установлено, что максимальный прирост высеваемости МБТ у вновь выявленных пациентов наблюдается при 6-кратных посевах (36-37%) [2].

Для повышения результативности культурального метода рекомендуют посев осуществлять одновременно на две-три различные по составу питательные среды, чаще на среду Левенштейна-Йенсена и на среду Финна II. Посевы просматриваются каждые 7 дней, рост МТ появляется на 3-6 неделе. Большинство посевов дает рост МТ в течение 2-х месяцев. Однако, отдельные штаммы растут до 90 дней, поэтому необходимо инкубировать посевы до 3-х месяцев. При отсутствии роста к этому времени посев считается отрицательным.

Вирулентные культуры МБТ растут на плотных питательных средах в виде R-колоний (шероховатых) различной величины. Колонии чаще сухие, морщинистые, цвета слоновой кости, иногда с розоватым или желтоватым оттенком. Гладкие колонии (S-формы) характерны для микобактерий бычьего типа, которые в последние годы встречаются крайне редко. Следует помнить, что гладкие колонии с влажным ростом могут вырастать после курса проведенной химиотерапии больному туберкулезом. В виде S-форм с ярко оранжевой или желтой пигментацией растут сапрофиты и атипичные микобактерии.

Положительный ответ дают только после микроскопии мазка из выросших колоний по Цилю-Нильсену, подтверждения их кислотоустойчивости. В мазках обнаруживаются интенсивно прокрашенные красные палочки, лежащие одиночно или скоплениями, переплетаясь в виде «кос» (благодаря наличию корд-фактора), в длительно растущих культурах видны темные зерна.

Далее проводится количественная оценка результатов посева. Существуют различные системы оценки. Общепринятой в РБ считается трехбалльная система.

Результаты учитывают путем ежедневного, начиная с третьего дня инкубации, сравнения сроков появления роста на питательной среде и оценки интенсивности роста колоний МБТ. Интенсивность роста оценивалась путем подсчета колоний по 3-х балльной системе (колониеобразующие единицы - КОЕ):

- (1+) – от единичных до 20 КОЕ – «скудное» бактериовыделение, бактериоскопически микобактерии не определяются;
- (2+) – от 21 до 100 КОЕ – «умеренное» бактериовыделение, бактериоскопически определяются единичные микобактерии в каждом поле зрения или единичные в препарате;
- (3+) - более 100 КОЕ – «обильное» бактериовыделение, бактериоскопически определяются 10 и более микобактерий в каждом поле зрения.

[Приказ МЗ РБ «О состоянии противотуберкулезной помощи населению Республики Беларусь и мерах по ее совершенствованию» // №143 от 28.07.1992г].

Идентификация микобактерий

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.

Возбудитель туберкулеза, открытый в 1882 г. Р. Кохом, в современной классификации относится к роду *Mycobacterium* семейства *Micobacteriaceae* [13,208]. Среди патогенных микобактерий, отличительными свойствами которых является их кислотоустойчивость, различают несколько видов возбудителей туберкулеза: *Mycobacterium tuberculosis* (человеческий вид), *Mycobacterium bovis* (бычий вид) и *Mycobacterium africanum* (промежуточный вид), а так же целый ряд атипичных микобактерий: *M.Intracelulare*, *M.Avium*, *M.cansasii*, *M.fartuitum* и другие, которые при определенных условиях могут вызывать микобактериозы.

Род микобактерий, по определителю бактерий Берджи (1997г.), по способности вызывать заболевания человека и животных микобактерий можно разделить на 3 группы. В одну группу входят патогенные для человека и животных виды микобактерий *M. tuberculosis* и *M. bovis*, которые вызывают туберкулез человека и крупного рогатого скота, *M. leprae* - возбудитель проказы. В другую - сапрофитные микобактерии, которые свободно живут в окружающей среде и, как правило, не опасны для человека. К ним относятся *M. terrae* - выделенная из почвы (земли), *M. phlei* - найдена на траве тимофеевке, *M. goodnae* (*M. aqual*) - выделена из водопроводной воды и др. Промежуточное положение занимает группа условно (потенциально) патогенных микобактерий, которые при определенных условиях могут вызвать заболевания человека: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonai* и др. [13,180].

По характеру роста на питательных средах род *Mycobacterium* в практических целях подразделяется на три большие группы:

- 1-я – медленно растущие (возбудитель туберкулеза и ряд атипичных микобактерий: *M. kansasii* и др.);
- 2-я – быстро растущие (менее 7 дней видимый рост: *M. phlei*, *M. fortuitum*, *M. stegmatis* и др.);
- 3-я – не растущие на питательных средах возбудители проказы: *M. leprae* и др.

Атипичные микобактерии могут быть различного происхождения:

1. Попавшие в организм человека извне сапрофиты, которые человек может принять с пищей, загрязненной водой, молоком, и выделяющиеся затем с патологическим материалом. Они могут обнаруживаться в нормальном содержимом желудка и в моче. Как правило это скотохромогенные микобактерии.
2. Атипичные микобактерии могут формироваться из типичных микобактерий туберкулеза, в результате воздействия на них самых разнообразных факторов. Часто они выделяются либо параллельно с типичными МБТ, либо после того как больные перестали выделять МБТ.
3. Еще одним источником атипичных микобактерий может быть латентная туберкулезная инфекция в организме.

Для идентификации атипичных и типичных туберкулезных микобактерий применяется множество тестов, учитывается скорость роста, температурный оптимум роста, морфология колоний, их цвет. Наиболее широко распространенным тестом позволяющим дифференцировать *M. Tuberculosis* и *M. Bovis*, а также другие микобактерии является ниациновый тест, основанный на способности микобактерий человеческого типа в значительно больших количествах синтезировать ниацин, по сравнению с остальными.

Микобактерии туберкулеза растут при температуре 37-38 °С; при 22 и 45 градусах – растут атипичные микобактерии

Определение лекарственной чувствительности

Определение спектра и степени чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам имеет существенное значение для тактики химиотерапии, для контроля за эффективностью лечения и определения прогноза заболевания [5].

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 засеивается 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 вне- или внутриклеточного их расположения. Для среды Левенштейна-Йенсена эти концентрации эквивалентно равны в микрограммах на 1 мл: изониазид –1; рифампицин – 20; стрептомицин – 5; канамицин – 30; этамбутол –2; этионамид, протионамид – 30; виомицин – 30; тиацетазон – 20. Культура считается чувствительной, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 колоний при обильном росте в контроле. Только при наличии более 20 колоний культура расценивается как устойчивая к той концентрации препарата, которая

содержится в среде. Для атипичных микобактерий характерна первичная устойчивость к большинству противотуберкулезных препаратов.

Выявление L-форм МБТ

Динамика бактериовыделения служит важным диагностическим и прогностическим критерием при химиотерапии больных деструктивным туберкулезом легких. Быстрое снижение численности микобактериальной популяции и прекращение бактериовыделения на фоне химиотерапии служит благоприятным прогностическим признаком, позволяя надеяться на быструю динамику туберкулезного процесса и закрытие полостей распада. Однако в процессе лечения претерпевают изменения не только количественные, но и качественные характеристики микобактериальной популяции.

Качественные изменения могут проявляться возникновением L-форм микобактерий, отличающихся от обычных возбудителей по ряду биологических, биохимических и морфологических признаков, но способных к длительному персиситированию в организме человека и к реверсии в исходные бактериальные формы, со свойственной им вирулентностью.

L-формами называются варианты микроорганизмов, частично или полностью утратившие клеточную стенку, но сохранившие способность воспроизведения подобных себе структур в условиях искусственного культивирования.

Исследования по изучению L-трансформирующего действия различных противотуберкулезных препаратов на МБТ позволили установить, что все изученные противотуберкулезные препараты обладают способностью индуцировать образование L-форм. Однако L-формы часто определяются в чистой культуре или в сочетании с бактериальной формой как у леченных, так и у впервые выявленных больных с деструктивным туберкулезом легких. Таким образом, установлена возможность индукции L-форм МБТ под влиянием как ферментных систем организма, так и противотуберкулезных препаратов.

Одной из основных особенностей L-форм микроорганизмов является их способность к реверсии в исходный вид со свойственной ему вирулентностью.

Установленный факт выделения L-форм микобактерий в тот период, когда бактериальные формы перестают выявляться обычными методами, но процесс, несмотря на клинически благоприятную динамику, сохраняет еще выраженные признаки активности, может служить одним из важных показателей необходимости продолжения интенсивной химиотерапии. В связи с этим при частых рецидивах процесса или необычном торпидном его течении следует проводить специальные микробиологические исследования в поисках L-форм МБТ. Стойкое выделение L-форм у абацилярных пациентов с большими остаточными изменениями в легких указывает на сохраняющуюся активность туберкулезного процесса и является важным прогностическим признаком вероятности рецидивов и обострений. У пациентов с ограниченными не деструктивными формами туберкулеза легких L-формы выделяются значительно

чаще, чем бактериальные формы возбудителя. Исчезновение L-форм происходит более медленными темпами.

L-формы МБТ обладают повышенной хрупкостью и требуют особых, щадящих методов выделения и культивирования. Для их культурального выявления разработаны элективные питательные среды, подобраны адекватные детергенты, осмотические стабилизаторы, разработаны методика посева и контроля.

Таким образом, исследование L-форм МБТ является актуальным и перспективным направлением фтизиатрии, т.к. позволяет углубленно изучить патогенез заболевания с учетом разнообразия его клинической симптоматики, диагностировать специфический процесс, не сопровождающийся бактериовыделением, раскрыть генез рецидивов и реактиваций, проводить их профилактику, прогнозировать исход инфекционного процесса, выбрать оптимальную схему этиотропной терапии.

Исследования у пациентов, не выделяющих мокроту.

У больных, не отхаркивающих мокроту или отделяющих ее эпизодически и в скудном количестве, с целью выявления бацилловыделения применяют раздражающие аэрозольные ингаляции, провоцирующие усиление секреции бронхов, кашель и отделение мокроты. Исследуют также промывные воды бронхов и промывные воды желудка.

Раздражающие ингаляции, провоцирующее отделение мокроты, занимают первое место среди других способов получения материала у указанной группы больных. Этот метод прост, не требует высокой квалификации медицинского персонала, по сравнению с исследованием промывных вод бронхов и желудка, повышает процент высеваемости микобактерий. Для аэрозольных ингаляций чаще всего пользуются портативными ингаляторами.

В зависимости от выраженности кашлевого рефлекса, для появления мокроты бывает необходимо ингалировать 30-60 мл раздражающей смеси (15% раствор поваренной соли в 1% пищевой соде (150 г NaCl и 10 г NaHCO₃ на 1 л дистиллированной воды)). Смесь разливают во флаконы и стерилизуют автоклавированием. Если после ингаляции 60 мл раствора кашель не появляется, больному следует предложить сделать максимальный вдох, а затем продолжать импульсивно выдыхать воздух. При последующем вдохе, как правило, появляется кашель.

Материал (мокрота), полученная после раздражающих ингаляций, исследуется бактериологически, а также бактериоскопически с окраской мазков по Цилю-Нильсену, методом флотации и люминесцентной микроскопии. Гиперсекреция бронхиального содержимого сохраняется длительно, поэтому больному рекомендуется собирать мокроту дополнительно, в течении суток.

Если при раздражающей ингаляции не удастся получить мокроту, то прибегают к исследованию промывных вод бронхов или желудка (у детей младшего возраста в связи с заглатыванием мокроты).

Метод индуцированной мокроты.

Метод предложен I.Pin et al. (1992) в модификации Т.А.Рорov et al. (1995), позволяет многократно получить мокроту у пациента с высокой воспроизводимостью. [1,10]

Противопоказания: дыхательная недостаточность II–III ст., выраженный бронхоспастический синдром.

Показания: хронические обструктивные болезни легких, экзогенный аллергический альвеолит, рак легких, туберкулез, пневмоцистная пневмония, аспергиллез, банальная бронхиальная инфекция

Перечень необходимого оборудования, лекарственных средств, медицинских препаратов:

1. Ультразвуковой небулайзер, который обеспечивает скорость подачи аэрозоля от 0,87 до 2,0 мл/мин со средним массовым аэродинамическим диаметром частиц .5 мкм.
2. Spiroграф или пикфлоуметр.
3. Карманный ингалятор «Сальбутамол»;
4. Растворы NaCl 3%, 4%, 5%.
5. Стерильная посуда для сбора мокроты.

Технология использования метода

Забор мокроты должен осуществляться в специально отведенном помещении при наличии вытяж-

ной трубы и вентиляции, проводится средним медицинским персоналом.

1. Провести исследование функции внешнего дыхания по основным скоростным показателям:

ОФВ1 или ПСВ.

2. За 30 мин до взятия мокроты провести ингаляцию сальбутамола дважды по одному вдоху

(200 мкг) с интервалом 15 мин.

3. Приступить к ингаляции 3% раствора NaCl через ультразвуковой небулайзер. Продолжительность процедуры — 7 мин.

4. По окончании ингаляции прополоскать рот водой.

5. Откашляться и попытаться собрать мокроту в специальную посуду.

6. Провести контрольное исследование функции внешнего дыхания.

7. При получении удовлетворительного образца мокроты процедура может считаться законченной.

8. В противном случае следует повторить действия с п. 3 по п. 7, последовательно используя 4% и 5% раствор NaCl вместо 3%.

9. Образец мокроты доставить в лабораторию, исследование провести в течение 24 ч с момента получения ИМ при хранении в холодильнике ($t=4^{\circ}\text{C}$) и не позднее 30 мин в случае хранения при комнатной температуре.

Если в ходе исследования показатель ОФВ1 (ПСВ) снизился на 10%, концентрацию раствора NaCl увеличивать нельзя. Последующие ингаляции

проводить тем же раствором. Если произошло снижение ОФВ1 (ПСВ) на 20% и более, а также при появлении респираторных симптомов (одышка, удушье, свистящее или затрудненное дыхание) ингаляцию следует прекратить.

Удовлетворительным считается образец мокроты в объеме не менее 2 мл, с минимальными примесями слюны; в нативном препарате мокроты должно быть менее 20% клеток плоского эпителия от общего количества клеток.

Возможные осложнения:

Метод ИМ отличают простота выполнения, доступность, хорошая переносимость. К возможным побочным явлениям, возникающим в процессе выполнения процедуры, следует отнести:

- индивидуальную непереносимость сальбутамола, гипертонических растворов;
- головокружение, возникающее в результате форсирования дыхания во время ингаляции;
- головную боль, тахикардию, повышение артериального давления, тремор рук, тошноту при передозировке сальбутамола.

Чтобы избежать подобных осложнений перед началом исследования необходимо:

- объяснить больному суть метода, его безвредность, безболезненность и безопасность;
- тщательным образом собрать анамнез, уточнив при этом, пользуется ли больной каким-либо бронхолитиком (в случае положительного ответа уточнить способ его приема, кратность, дозировку, время последнего приема с целью предотвращения передозировки препарата), а также уточнить аллергоанамнез и переносимость лекарственных средств, в том числе сальбутамола, при непереносимости последнего заменить его на другой бронхолитик.

Исследование промывных вод бронхов.

При взятии промывных вод бронхов основной задачей является получение секрета из глубоких отделов бронхиального дерева, для чего вызывают гиперсекреторный рефлекс, распространяющийся на мельчайшие разветвления бронхов. Процедура выполняется врачом-оториноларингологом. При введении жидкости в трахею у больного с кашлем выделяется пенная слизь, обычно содержащая комочки мокроты. Этот материал собирают в стерильную баночку для исследования.

Не рекомендуется заменять промывание бронхов примитивным промыванием гортани и глотки, что значительно снижает возможность определения бацилловыделения. Параллельное исследование материала, полученного после раздражающих ингаляций и при заборе промывных вод бронхов, повышает процент нахождения микобактерий в материале.

Исследование промывных вод желудка.

Исследование на микобактерии туберкулеза предложил Armand-Dellile (1927) для детей, не выделяющих мокроту. Впоследствии этот способ с успехом стал применяться и у взрослых лиц, не выделяющих мокроту. Микобактерии

туберкулеза попадают в желудок в основном при заглатывании небольших количеств мокроты, не отхаркиваемой больными. Кроме этого, возможно проникновение микобактерий туберкулеза через неповрежденную стенку желудка при наличии бактериемии.

Промывные воды желудка берут обязательно натощак. Больного необходимо предупредить, что последний прием пищи должен быть накануне до 9 часов вечера, т.е. примерно за 12 часов до взятия промывных вод желудка, причем за 2-3 дня из рациона питания должны быть исключены молочные продукты и жирная, трудно перевариваемая пища. Молочные продукты могут содержать кислотоупорные сапрофиты, а из трудно перевариваемой жирной пищи могут попасть в промывные воды кислотоустойчивые остатки, создающие розовый фон, затрудняющий микроскопию. Для нивелирования данного эффекта, пациенту предварительно дают выпить 100 –150 мл. раствора питьевой соды, для нейтрализации кислой реакции желудочного содержимого. Промывные воды желудка должны исследоваться немедленно, чтобы исключить повреждающее действие желудочных ферментов.

Посевы промывных вод желудка дают меньший процент высеваемости микобактерий, поэтому в современных условиях антибактериальной терапии этот метод рекомендуется применять у детей, а у взрослых – только при отсутствии возможности взять промывные воды бронхов.

Исследование мочи.

При туберкулезе мочевой системы имеются некоторые особенности в исследовании мочи, в связи с чем, кроме общепринятых исследований, в клинике туберкулеза применяют ряд специальных исследований.

При туберкулезе мочевой системы наблюдается увеличение количества белка, что может быть обусловлено наличием в моче лейкоцитов и эритроцитов. Диагностическую ценность при дифференциальной диагностике заболеваний мочевых путей и определении активности туберкулезного процесса в почках имеет определение скрытой пиурии и ее изменение после подкожного введения туберкулина (проба Коха).

Для учета скрытой пиурии пользуются подсчетом числа лейкоцитов, выделяемых почками в минуту. Для этого после опорожнения мочевого пузыря собирают утреннюю 3-х часовую порцию мочи (у женщин с помощью катетера).

Л.Е.Скрябина несколько упростила подсчет форменных элементов в минутном объеме мочи, который производится следующим образом: в течение 5 минут центрифугируют 10 мл мочи из полученной 3-х часовой порции. Осадок переносится в счетную камеру Горяева. Число лейкоцитов, определяемых в счетной камере, умножают на 1000 (что соответствует числу клеток в 1 мл мочи) и делят на 10 (т.к. осадок получен из 10 мл). таким образом определяется число лейкоцитов в 1 мл мочи. Это число умножают на количество мл. мочи, собранной за три часа, и для вычисления минутной лейкоциурии делят на 180 [2]. За нормальную минутную лейкоциурию принимают 2000-25000 клеток.

Повышенное количество лейкоцитов может быть выявлено как при туберкулезе, так и при неспецифическом пиелонефрите и поэтому само по себе не является дифференциально-диагностическим признаком и не служит показателем активности специфического процесса в почках. В этом отношении известное значение имеет определение минутной лейкоцитурии после подкожного введения туберкулина.

Пробу с туберкулином ставят после определения скрытой пиурии (исследование мочи по Нечипоренко). В тот же день подкожно в область плеча вводят 20 – 40 ТЕ туберкулина (при выборе концентрации туберкулина руководствуются клиническими показателями и результатами предварительной пробы Манту). Моча исследуется через 24, 48, 72 и 96 часов после подкожного введения туберкулина: производят подсчет лейкоцитов так же, как и перед туберкулиновой пробой.

Установлено, что у больных с туберкулезным поражением почек, после подкожного введения туберкулина, отмечается закономерное увеличение числа лейкоцитов в моче, а степень этого увеличения пропорциональна активности специфического процесса. Выраженной реакцией считают увеличение числа лейкоцитов (после введения туберкулина) в 3-5 раз, умеренной реакцией – увеличение в 1,5-2 раза.

Исследование мочи на наличие микобактерий туберкулеза производят при подозрении на туберкулез почек и мочевыводящих путей, в дифференциально-диагностических случаях при наличии у больного туберкулезного процесса другой локализации. Для исследования используют среднюю порцию утренней мочи. Предварительно необходимо провести тщательный туалет наружных половых органов раствором антисептика. Мочу центрифугируют и из осадка готовят мазок. Сбор суточной мочи не эффективен в связи с частой контаминацией микроорганизмами, бактерицидным действием продуктов метаболизма и ферментов неспецифической флоры. Если МБТ не будут найдены при обычных бактериоскопических исследованиях, можно использовать метод флотации.

Исследование фекалий.

Для исследования кала на микобактерии туберкулеза отбирают кусочки величиной с лесной орех, если возможно содержащие гной. Кал рекомендуется исследовать методом флотации. Для этого отобранные кусочки заливают дистиллированной водой (15-20 мл), размешивают деревянной палочкой, затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр и полученный фильтрат флотируют согласно методике, описанной выше.

Исследование кала не имеет смысла производить в случаях, когда больной выделяет МБТ с мокротой или они обнаруживаются в промывных водах желудка и бронхов, т.к. при этом микобактерии могут попадать в кал транзитом через кишечник.

Исследование экссудатов, асцитической жидкости, гноя.

При анализе серозных экссудатов или асцитической жидкости производят качественное и количественное определение белка, цитологическое исследование и поиск микобактерий туберкулеза. Для накопления микобактерий пользуются методом флотации. При подготовке к флотации экссудата или асцитической жидкости не требуется предварительной их гомогенизации.

Процесс в плевральной полости чаще носит вторичный характер и является в большинстве случаев проявлением (осложнением течения) имеющегося в организме самостоятельного заболевания. Известно более 50 этиологических факторов, ведущих к появлению плеврального выпота, однако абсолютное их большинство приходится на:

- туберкулезный
- парапневмонический
- раковый метастатический плеврит
- мезотелиому плевры.

Почти у каждого пятого больного с плевральным выпотом однозначно установить природу плеврального выпота не удастся. Поэтому для установления клинического диагноза используется большой набор методик исследования. Знание наиболее часто встречающихся поражений плевры и диагностических возможностей различных методов исследования для каждой конкретной патологии является важным условием для проведения оптимальных диагностических действий. Дифференциальная диагностика должна осуществляться в первую очередь в отношении туберкулеза, пневмонии и рака, при этом среди всех экссудативных плевритов удельный вес туберкулеза составляет 40-50% (Л.Суркова и др.). В настоящее время одновременно с ростом заболеваемости туберкулезом наметилась тенденция увеличения доли плеврита среди других форм туберкулеза.

В процессе диагностики плеврального выпота перед врачом стоит задача определения его нозологической принадлежности. Для этого осуществляется плевральная пункция с полным лабораторным исследованием плевральной жидкости.

ПРАВИЛО! Каждый случай плеврального выпота, даже при казалось бы очевидном его происхождении, предполагает проведение диагностической плевральной пункции.

К обязательным исследованиям при плевральном выпоте относится посев плевральной жидкости на стерильность и микобактерии туберкулеза. При подозрении на туберкулезный генез плеврального выпота производят посев на МБТ масс фибрина и проводят биопробу на морских свинках.

Одновременное гистологическое и бактериологическое исследование плевры, экссудата и фибрина является более информативным для подтверждения туберкулезной этиологии заболевания, при этом достоверность подтверждения туберкулеза составляет от 80 до 96%. (В.А.Соколов, 1998).

Аденозиндезаминазный тест

С целью подтверждения туберкулезной этиологии плеврита определяют фермент аденозиндезаминаза (методика разработана и внедрена в ГОУЗ «Фтизиатрия» в 2002г, авторы С.Э. Савицкий, О.Е. Кузнецов) который является маркером туберкулезного процесса.

Аденозиндезаминаза представляет собой фермент, катализирующий гидролиз аденозина до инозина и аммиака. При проведении клинических исследований, было показано, что уровень активности аденозиндезаминазы (АДА, далее АДА-тест) можно рассматривать в качестве вполне достоверного критерия ранней диагностики туберкулезного плеврита, позволяющего контролировать также процесс лечения. Достоверность теста [5,10] настолько высока, что на основе его результатов следует начинать антибактериальную терапию, не дожидаясь других данных исследований. Это сократит время диагностирования, ускорит начало лечения и улучшит его результативность. Необходимость внедрения такого быстрого, легкого, применимого даже в амбулаторных условиях теста, каким является АДА-тест, особенно очевидна.

Активность АДА в сыворотке и плевральной жидкости определяли при помощи разработанного в клинко-диагностической лаборатории метода, в основу которого положена реакция: аденозин + H₂O --> инозин + NH₃ (катализирует реакцию аденозиндезаминаза), реакция идет необратимо слева направо. По количеству образовавшегося аммиака определяют активность фермента.

Активность АДА полученная при исследовании колебалась в пределах:

- сыворотка крови: 8,77-11,05 ЕД
- плевральная жидкость: 5,55-12,00 ЕД.

При этом выявлено, что в начальный период и разгар заболевания туберкулеза легких активность аденозиндезаминазы возрастала в 3-6 раз (в среднем 18,50-21,00 ЕД), по сравнению с нормой.

Определив пороговое значение для величины активности АДА в сыворотке крови и плевральной жидкости (18,5 ЕД) мы получили параметры для ее оценки в качестве теста для диагностики туберкулеза: чувствительность, равная отношению числа правильных положительных диагнозов к сумме этого числа и ошибочно отрицательных диагнозов, равна 95,6%. Специфичность теста, рассчитанная как отношение числа правильных отрицательных диагнозов к сумме этого числа и ошибочно положительных диагнозов, равна 90%. Эффективность теста – отношение суммы числа правильных положительных диагнозов и числа правильных отрицательных диагнозов к числу охваченных исследованием пациентов равна 94%.

На основании полученных результатов обосновывается целесообразность применения в комплексной диагностике туберкулеза простого и доступного для применения во всех противотуберкулезных стационарах, не требующего дополнительных затрат для приобретения оборудования и подготовки медицинского персонала аденозиндезаминазного теста (АДА-теста), как эффективного диагностического теста.

Исследование цереброспинальной жидкости (ликвора).

При дифференциальной диагностике туберкулезного менингита в цереброспинальной жидкости определяют белок, глюкозу, цитоз, а также исследуют ее на наличие микобактерий туберкулеза, которые можно выявить методом прямой бактериоскопии, флотации и бактериологически.

Для прямой бактериоскопии ликвор в пробирке оставляют на сутки в холодильнике для возможного образования пленки. (появление нежной паутинной пленки, свободно плавающей в жидкости, является одним из характерных признаков туберкулезного менингита). Показатели цереброспинальной жидкости приведены в таблице.

Таблица 1. Показатели цереброспинальной жидкости

Диагноз	Физ-кие свойства	Цитоз	Белок	Глюкоза	Хлориды	Примечание
Норма	Бесцветная, прозрачная	0-6 клеток в мкл	0,2-0,3 г/л	2,8-3,9 ммоль/л	120-130 ммоль/л	Реакция Панди может быть слабо положительной
Туберкулезный менингит	Бесцветная, прозрачная или слегка мутная, может ксантохромия	Увеличение, преобладают лимфоциты	Повышен	Понижен а до 1,5-1,6 Иногда до 0 ммоль/л	Понижены	Характерно выпадение паутинообразной сетки, содержащей МБТ

Исследование кожи.

Выявление микобактерий туберкулеза у больных туберкулезом кожи в обычных препаратах, окрашенных по Цилю-Нильсену, является трудновыполнимым, поэтому рекомендуется пользоваться методом флотации. Материал собирают при помощи соскобов в стерильную разовую посуду, в зависимости от формы туберкулеза кожи.

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)

Впервые этот метод применен для получения альвеолярных макрофагов кролика в 1961 г. Mугvik и соавт. В настоящее время БАЛ чаще проводится с использованием фибробронхоскопа, чаще на уровне сегментарных или субсегментарных бронхов. Через канал бронхоскопа вводят порционно 100-150 мл. теплого стерильного физиологического раствора (37°C). Через несколько минут аспирируют содержимое бронхов в отдельную стерильную емкость (БАС). Аспирируется обычно 40-60% от введенного количества. Подсчет общего количества клеточных элементов проводят в камере Фукса – Розенталя. После центрифугирования, приготовления мазков из осадка и окраски по Райту-Романовскому, Романовскому-Гимзе, посчитывают клеточный состав: альвеолярные макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы и эозинофилы. Общее

количество клеток в БАС варьирует в пределах 0,055-0,083 x 10⁶/мл. Жизнеспособность альвеолярных макрофагов составляет в норме 63,6+-5,6%. Цитограмма БАС у здоровых лиц в среднем представлена: альвеолярные макрофаги – 85-98%, лимфоциты – 7-12%, нейтрофилы – 1%. По Voisin (1975) у некурящих здоровых лиц в БАС содержится в среднем: альвеолярных макрофагов – 93±5%, лимфоцитов – 7±1%, нейтрофилов, эозинофилов – менее 1%.

Изменения при туберкулезе легких.

При активном туберкулезе легких в БАС может наблюдаться 4 типа клеточных реакций.

1 тип: макрофагальная реакция (MP)– при наличии:

- альвеолярных макрофагов >86%
- лимфоцитов <12%
- нейтрофилов <2%

2 тип: лимфоцитарная реакция (LP) – при наличии:

- нейтрофилов <2%
- лимфоцитов >12%

3 тип: нейтрофильная реакция (NP) – при наличии:

- лимфоцитов <12%
- нейтрофилов >2%

4 тип: смешанная лимфоцитарно-нейтрофильная реакция (ЛНР) – при наличии:

- лимфоцитов >12%
- нейтрофилов >2%

Каждая клиническая форма туберкулеза легких имеет различный клеточный состав БАС, что связано с особенностями течения туберкулеза и наличием сопутствующих патологических процессов.

Таблица 2. Частота клеточных реакций при различных клинических формах туберкулеза (%) [1]

Клиническая форма туберкулеза	Типы клеточных реакций			
	MP	LP	NP	ЛНР
Очаговый	36,6	45,5	8,2	10,0
Инфильтративный	20,2	29,9	23,4	26,6
Туберкулома	3,4	24,2	20,4	22,0
Диссеминированный	4,2	41,6	25,0	29,2
Кавернозный	7,1	25,1	46,4	21,4
Фиброзно-кавернозный	16,7	6,3	46,2	30,8

Клеточные реакции БАС можно использовать для прогнозирования течения туберкулезного процесса.

Развитие и нарастание деструктивных процессов в легких оказывает достоверное влияние на клеточные реакции БАС за счет увеличения частоты NP и ЛНР. При бактериовыделении увеличивается частота NP и ЛНР. Количество нейтрофилов в БАС при наличии у больного бактериовыделения составляет 21,8+-

9,9%, при отсутствии - 9,1+-7,1%. Количество лимфоцитов не зависит от бактериовыделения.

В то же время цитологические исследования БАС при ограниченных поражениях легких не позволяют установить туберкулезную природу заболевания. У 10% больных даже при развитом туберкулезном процессе цитограмма БАС остается без изменения. Помогает в дифференциальной диагностике туберкулеза легких одновременное проведение пробы Коха, которая повышает диагностическую информативность цитологических исследований. При повторном цитологическом исследовании лаважной жидкости через 48-72 часа после пробы Коха при туберкулезе у 62,5% больных среднее содержание АМ имеет тенденцию к повышению [1], а нейтрофилов – к снижению, увеличивается число плазматических и эпителиальных клеток. При пневмонии и раке среднее содержание АМ снижается, а нейтрофилов повышается, содержание лимфоцитов и эозинофилов практически не изменяется. Различия в содержании АМ, нейтрофилов становятся более выраженными. У больных с длительно протекающей пневмонией (абсцедирующей) и бронхоальвеолярным раком возможны ложноположительные реакции.

При саркоидозе отмечается значительное повышение количества лимфоцитов, в активной фазе может достигать 50% и более. В процессе терапии, благоприятном течении болезни, этот показатель снижается. Для дифференциальной диагностики туберкулеза и саркоидоза наиболее информативен процентный состав популяций макрофагов. Для туберкулеза характерны следующие соотношения популяций АМ в цитограмме БАС: биосинтезирующие - >40%, фагоцитирующие - >50%, секретирующие - <10%.

При саркоидозе органов дыхания резко возрастает среди АМ количество секретирующих клеток - >50%, фагоцитирующие составляют < 40%, биосинтезирующие - < 10%.

У больных хроническим бронхитом отмечается повышение в БАС количества нейтрофилов до 30-35%, при выраженном снижении альвеолярных макрофагов (55-60%). Выраженная эозинофилия (37-55%) наблюдается при бронхиальной астме.

Биопсия при патологических процессах в грудной клетке

При ряде заболеваний для установления точного по морфологическим критериям диагноза и стадии необходим биоптат легкого большого объема, а также биоптат еще и лимфатического узла. Для этого применяют торакоскопию либо парастернальную медиастиноплевроскопию. При наиболее часто встречающихся диффузных поражениях легких (саркоидоз, карциноматоз, туберкулез) патологический процесс в легких идентичен таковому в лимфатических узлах, поэтому если имеются эндоскопические признаки увеличения лимфоузлов, то целесообразно применять чрезтрахеобронхиальную пункцию при бронхоскопии, а при не результативности ее – медиастиноскопию по Carlens. С целью повышения результативности биопсий желательнее получить биоптат из легкого, плевры и лимфоузлов. Этот принцип частично реализуется

при комплексном бронхологическом обследовании и торакоскопии. Это очень важно не только для установления правильного диагноза, но и для установления стадии болезни. В последнее время, в связи с широким внедрением в медицину волоконной оптики, для этих целей все шире применяют видеоассистированную торакоскопию и медиастиноскопию.

ПЦР-диагностика

В настоящее время все большее внимание уделяется лабораторному методу исследования, основанному на использовании полимеразной цепной реакции. Благодаря применению ПЦР-технологии удается выявить и воспроизвести миллионы копий того участка ДНК, который принадлежит болезнетворному агенту, например, внедрившемуся в организм человека возбудителю туберкулеза, т.е. осуществить анализ на генетическом уровне.

Если «ключевая последовательность» ДНК микобактерии известна, то способом искусственного синтеза можно получить органическое вещество (праймер) с комплиментарной последовательностью азотистых оснований, обеспечивающих способность прикрепляться к одной из нитей ДНК миеобактерии в строго определенном месте.

Такой «праймер» – копия небольшого (соответствующего 20-30 азотистым основаниям) участка ДНК – является своеобразным «стартовым блоком» , с которого под влиянием ДНК-полимеразы происходит удлинение цепи, комплиментарной азотистым основаниям нити материнской ДНК.

Для удлинения цепи используются азотистые основания (моонуклеотиды) и другие компоненты, вводимые в реакционную смесь.

Если свойственная праймеру последовательность азотистых оснований характерна только для микобактерий, находящихся в организме человека, то, несмотря на огромное количество присущего человеку генетического материала и малое количество ДНК микобактерий («иголка в стоге сена»), будет создан отрезок комплиментарной цепи, характерный только для болезнетворного агента. Для обнаружения, например, палочки Коха достаточно, чтобы в пробе содержался участок ДНК возбудителя с двумястами парами оснований. Происходит как бы отыскивание иголки в стоге сена («иголка»-это участок ДНК микобактерии, а «стог сена» - сотни миллиардов азотистых оснований нити ДНК клетки). Новообразовавшаяся цепь наполовину состоит из нативной (оригинальной) нити ДНК и наполовину – из новообразованной, комплиментарной (обе нити составляют половинки «лестницы» ДНК).

Исключительное значение метод ПЦР играет в подтверждении туберкулезной этиологии при плевритах, менингитах, туберкулезе мочеполовой системы, туберкулезе лимфоузлов, поскольку результативность бактериологической диагностики в выше указанных случаях крайне низкая.

Если «ключевая последовательность» ДНК микобактерии известна, то способом искусственного синтеза можно получить органическое вещество (праймер) с комплиментарной последовательностью азотистых оснований, обеспечивающих способность прикрепляться к одной из нитей ДНК в строго определенном месте.

Такой «праймер» – копия небольшого (соответствующего 20-30 азотистым основаниям) участка ДНК – является своеобразным «стартовым блоком», с которого под влиянием ДНК-полимеразы происходит удлинение цепи, комплиментарной азотистым основаниям нити материнской ДНК [210]. Если свойственная праймеру последовательность азотистых оснований характерна только для микобактерий, находящихся в организме человека, то, несмотря на огромное количество присущего человеку генетического материала и малое количество ДНК микобактерий («иголка в стоге сена»), будет создан отрезок комплиментарной цепи, характерный только для болезнетворного агента. Исключительное значение метод ПЦР играет в подтверждении туберкулезной этиологии при плевритах, менингитах, туберкулезе мочеполовой системы, туберкулезе лимфоузлов, поскольку результативность бактериологической диагностики в выше указанных случаях крайне низкая [175,213].

Большую проблему в ПЦР-диагностике составляют ложноположительные реакции, связанные с контаминацией материала во время забора, доставки в лабораторию и непосредственно во время выполнения исследования. МБТ – повсеместно распространенный патоген, в норме присутствующий в определенных количествах в организме большинства людей после первичного инфицирования. Во вдыхаемом нами воздухе присутствуют как живые МБТ, так и огромное количество их фрагментов и обломков молекул ДНК. В подобных условиях риск контаминации забираемого материала резко возрастает, а количество ложноположительных реакций по данным некоторых авторов может составлять от 1 до 50%. Единственной возможностью исключения появления ложноположительных реакций при выполнении молекулярно-биологических исследований является стандартизация преаналитического (использование одноразовой лабораторной посуды, РНК и ДНК освобожденной, соблюдение правил асептики и антисептики при взятии биологического материала) и аналитического (соблюдение технологии выполнения молекулярно-биологического исследования) этапа лабораторного исследования.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Наиболее чувствительным методом выявления микобактерий туберкулеза является заражение морских свинок (самые восприимчивые к туберкулезной инфекции лабораторные животные). Биологический метод применяется для выявления не только типичных, но и разнообразных, биологически измененных форм возбудителя, в частности L-трансформированных и фильтрующихся форм. Считается, что ее заражение позволяет диагностировать туберкулез при наличии в материале, использованном для заражения, 1-5 микробных клеток. Серьезными недостатками биологического метода являются его высокая стоимость, необходимость специальных условий, длительность проведения анализа и зависимость результатов от чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам. С введением в клиническую практику химиотерапии и появлением форм возбудителя, устойчивых к лекарственным препаратам, например, к изониазиду, биологическая проба, по мнению ряда исследователей, утратила свою

эффективность. Под влиянием лекарственных противотуберкулезных препаратов многие штаммы снижают или теряют свою вирулентность [39,123,124].

Методика выполнения

Для повышения чувствительности метода (на 15-29%) создают у свинки состояние иммунодефицита путем ежедневного введения больших доз кортизона (12,5 мг). Перед заражением свинке ставят р.Манту с 0,02мл туберкулина в наружную поверхность бедра. В качестве контроля в другое бедро вводят аналогичное количество стерильного бульона. При отрицательной реакции через 72ч можно начинать опыт. Исследуемый материал обрабатывают кислотой как при посеве, затем осадок тщательно трехкратно отмывают стерильным изотоническим раствором и вводят под кожу правой паховой области или в яичко. Наблюдают, повторяют р.Манту. При наличии метных изменений и положительной р.Манту свинку забивают через 4-6 недель, при отсутствии – через 3 месяца. При вскрытии может наблюдаться картина генерализованного туберкулеза, может наблюдаться увеличение регионарных лимфоузлов. Во время вскрытия делают мазки-отпечатки из органов для бактериоскопического исследования. При отсутствии макроскопической картины кусочки лимфоузлов, печени и селезенки гомогенизируют и засевают на питательные среды

Иммуноферментный анализ.

ИФА получил широкое распространение в диагностике различных инфекционных заболеваний в связи с высокой чувствительностью и специфичностью анализа, высокой производительностью, простотой проведения анализа и регистрации результатов, возможностью использования микроколичества диагностического материала и автоматизации процесса. ИФА используют для определения, как антител, так и антигенов в биологических жидкостях. В 1976 году ИФА был впервые применен для серодиагностики туберкулеза, используя в качестве антигена фильтрат *M. tuberculosis* H₃₇RV. При использовании ИФА специфические антитела выявляются у 80% больных активным туберкулезом, в том числе и костно-суставным. Однако образование антител меняется в зависимости от активности туберкулезного процесса, распространенности и давности заболевания, а также в процессе лечения. Несмотря на значительное число публикаций, посвященных применению методов ИФА для серодиагностики туберкулеза, проблема диагностики не является решенной, поскольку чувствительность анализа колеблется от 68 до 92%, а специфичность - от 86 до 97%, то есть число ложноположительных реакций среди здоровых или лиц с нетуберкулезными заболеваниями колеблется от 3 до 14%. Недостаточная специфичность анализа связана с наличием общих антигенов между МБТ и другими непатогенными микобактериями.

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 ¹⁴C 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.

БИОЧИПЫ

Идея создания биологического чипа, который по величине, скорости и объему работы был бы похож на чип электронный, пришла в голову практически одновременно трем ученым - в Британии, Югославии и СССР. Российские ученые нашли наиболее короткий и эффективный путь к успеху. 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-ловушки. 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. Биочипы уже испытаны на в Центральном НИИ туберкулеза РАМН - здесь с их помощью определяли микобактерии лекарственно-устойчивого туберкулеза. В обычных лабораториях на подобный анализ уходит от двух недель до двух месяцев. «Противотуберкулезный» биочип может всего за сутки выявить формы патогенов, устойчивые к определенным антибиотикам. Картинка свечения ячеек дает точный ответ на вопрос, какой именно из десятков мутантных штаммов бактерии «поселился» у данного пациента. Традиционный же способ диагностики требует на это как минимум пять-шесть недель.

Преаналитический этап лабораторных исследований

Главная задача клинико-диагностической лаборатории состоит в том, чтобы обеспечить врача-клинициста информацией, необходимой для лечения больного. Такая информация предоставляет ценность, только если она точна, соответствует клинической ситуации и правильно используется врачом при принятии решений.

Лабораторные исследования являются наиболее чувствительными показателями состояния пациента. Наиболее важные решения в отношении ведения процесса лечения пациента опираются на небольшие и незначительные изменения показателей лабораторных тестов.

Специалисты клинической лабораторной диагностики уже давно осознали, что многие факторы способны повлиять на результаты лабораторных исследований. Среди этих факторов: влияние лекарственных средств или их воздействие на функции различных органов и систем. Специалисты клинической лабораторной диагностики осведомлены о возможности возникновения аналитических влияний, клиницисты же, большей частью, не знают об их влиянии. Это может привести к неправильной интерпретации полученного результата и принятию в отношении пациента неверных действий.

Любые клинические решения, основанные на результатах лабораторных исследований, правильны лишь при условии, что образцы крови или другого биологического материала, корректно идентифицированы и стандартизированы, или когда недостаток установлен и сделаны необходимые допущения. Многие врачи не принимают во внимание большинство вариаций лабораторных данных, за исключением таких наиболее очевидных причин различий, как пол и возраст. Понимание внутрииндивидуальной вариации лабораторных результатов важно для принятия правильных клинических решений при оценке последовательных результатов исследований.

Этапы лабораторного исследования.

Последнее время в клинической лабораторной диагностике часто используется такое понятие как аналит. Понятие аналит давно признано и широко употребляется в мировой литературе и близко к употребляемому у нас термину «лабораторный показатель», «параметр», «тест» и др. Существует несколько определений показателя. Наиболее емко данное понятие сформулировано Национальным комитетом по клиническим лабораторным стандартам США (NCCLS).

Аналит – это компонент или характеристика образца, подлежащее изменению. Это понятие включает в себя любой элемент: ион, соединение, вещество, фактор, инфекционный агент, клетку, органеллу, активность (ферментативную, гормональную, иммунологическую) или признак: наличие или отсутствие, концентрацию, активность, интенсивность или другие характеристики, которые необходимо определить (NCCLS, document NRSL8-A).

В целом назрела необходимость унификации и утверждения основных терминов, понятий и определений, используемых в современной лабораторной диагностике.

Что производит клиническая лаборатория? Продукция лаборатории – авторизованный отчет, содержащий результаты лабораторного исследования, а также данные о пациенте (имя, пол, возраст, диагноз), вид биологического материала, время его взятия и доставки в лабораторию, актуальные референсные интервалы для каждого анализата и другую информацию (рис.1). Лаборатория производит и поставляет клиницисту в той или иной степени достоверную, чаще объективную диагностическую информацию.

Рис.1. Отчет о результатах лабораторных исследований.

Наименование лечебно-профилактического учреждения, телефон			
БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВИ № _____			
первичное <input type="checkbox"/>		повторное <input type="checkbox"/>	
Дата взятия/время доставки материала	Образец	КОД отделения	
Ф.И.О. пациента:		Пол:	Возраст:
Диагноз:			
	Вид исследования	Результат	Референсные величины
	КАЛИЙ		3,2 – 5,6 ммоль/л
	НАТРИЙ		130 – 155 ммоль/л
	КАЛЬЦИЙ общий		2,0 – 2,6 ммоль/л
	ХЛОР		95 – 110 ммоль/л
	ОБЩИЙ БЕЛОК		65 – 85 г/л
	АЛЬБУМИН		35 – 53 г/л
	МОЧЕВИНА		1,7 – 8,3 ммоль/л
	КРЕАТИНИН		М. 80 – 115 мкмоль/л
			Ж. 53 – 97 мкмоль/л
	ГЛЮКОЗА		3,9 – 6,4 ммоль/л
	БИЛИРУБИН общий		5,0 – 20,5 мкмоль/л
	- связанный		1,0 – 7,5 мкмоль/л
	- свободный		
	АСаТ		5 – 37 IU/L
	АЛаТ		5 – 42 IU/L
	ОБЩИЕ ЛИПИДЫ		4,0 – 8,0 г/л
	АЛЬФА-АМИЛАЗА		18 – 98 IU/L
	ЩЕЛОЧНАЯ фосфатаза		35 – 117 IU/L
	ХОЛЕСТЕРИН ОБЩИЙ		3,12 – 5,2 ммоль/л
	HDL – холестерин		> 1,42 ммоль/л
	Об. Холл. / HDL – хол.		3,7 – 6,7
	МОЧЕВАЯ КИСЛОТА		0,19 – 0,41 ммоль/л
	СЕРОГЛИКОИДЫ		0,13 – 0,20 ед.
	ХОЛИНЭСТЕРАЗА		76 – 230 мккат/л
	ГГТп		11 – 50 IU/L
	ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНЫ		0,45 – 1,52 ммоль/л
	КРЕАТИНКИНАЗА (СК)		25 – 200 IU/L
	МВ ФРАКЦИЯ СК		0 – 25 IU/L
	ЛДГ		174 – 516 IU/L
	ЖЕЛЕЗО		6,6 – 28,3 мкмоль/л
	ОЖСС		50 – 72 мкмоль/л
	ФОСФОР		0,8 – 1,6 ммоль/л
	МАГНИЙ		0,8 – 1,0 ммоль/л
	МЕДЬ		11 – 22 мкмоль/л
Рапорт КДЛ			

Дата/ время выдачи результата	Врач КДЛ

Цикл производства лабораторного продукта принято разделять на три этапа: преаналитический, аналитический и постаналитический. Если аналитический этап полностью проходит в лаборатории, то два других этапа имеют довольно основательную внелабораторную составляющую (рис.2). И эта их особенность значительно затрудняет проведение согласованных, последовательных мероприятий по обеспечению качества.

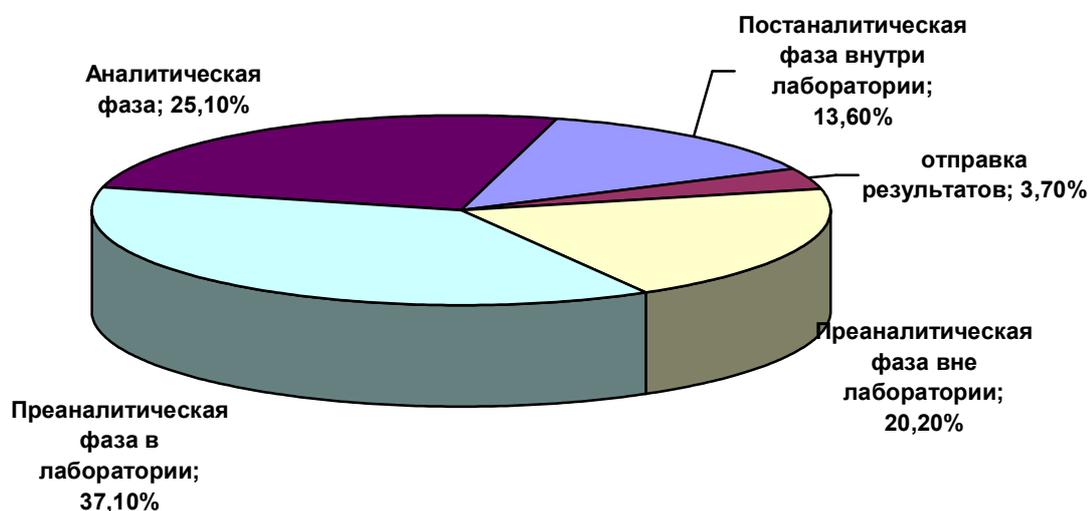
Рис.2. Этапы лабораторного анализа



Понятие «качество», применительно к клинко-диагностическим лабораториям, - это правильно и своевременно назначенный тест для нуждающегося в нем пациента, выполненный на достаточном аналитическом уровне с необходимой информацией для его интерпретации. Данное определение подразумевает, что только при хорошей организации и качественном проведении всех этапов лабораторного исследования – преаналитического, аналитического и постаналитического – можно рассчитывать, что каждый производимый лабораторный результат, представленный в авторизованном отчете, может быть использован врачом для принятия диагностических решений или решений, изменяющих схему лечения.

Эти этапы не равнозначны по затратам времени на их выполнение. В современной лаборатории большая часть времени тратится на проведение преаналитического этапа (15-20% по времени проходит вне лаборатории, рис.3).

Рис.3. Затраты времени на этапах лабораторного исследования.



Важно понимать, что, как и в любой сфере человеческой деятельности, ошибки, совершаемые в клиничко-диагностических лабораториях, неизбежны. Задача каждой лаборатории с помощью системы контроля качества создать надежный набор инструментов, позволяющий выявить ошибки и проводить целенаправленные мероприятия, сводящие их к минимуму.

Несомненно, в высоком качестве лабораторного обслуживания заинтересован пациент. В качестве своей продукции заинтересованы и специалисты клинической лабораторной диагностики. Доля лабораторных показателей во всем потоке диагностической информации, используемой клиницистом, достигает 70-80%.

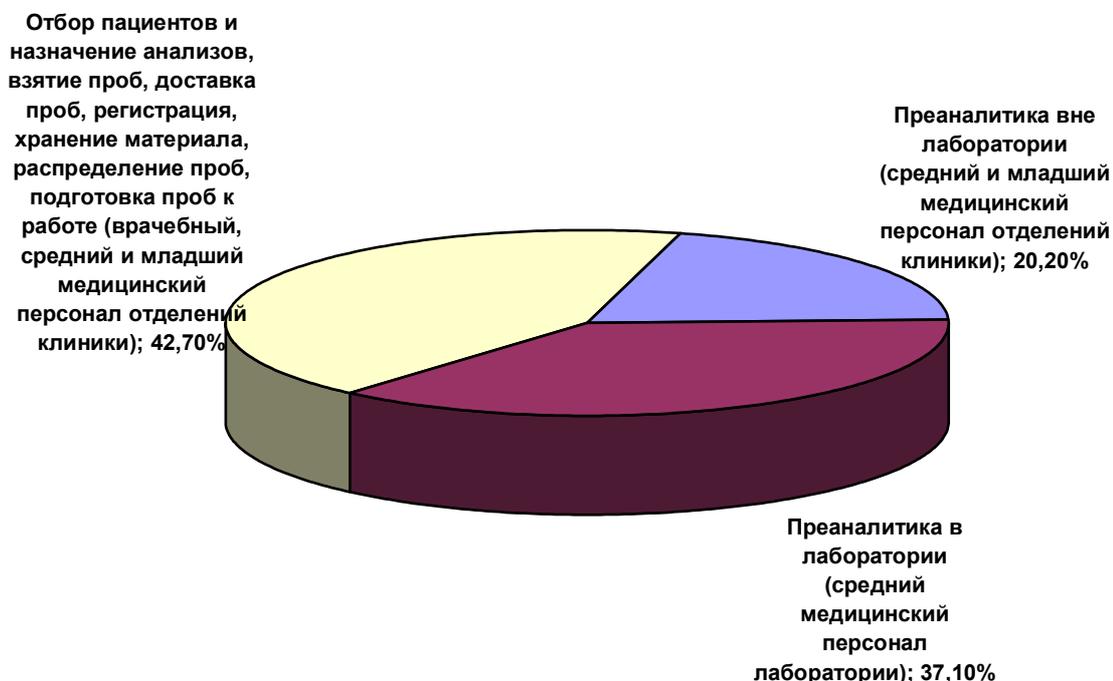
Преаналитический этап лабораторного исследования.

Вопрос стандартизации лабораторных исследований, в целом, и на данном этапе в частности, стоит достаточно остро. Лабораторное обследование начинается с назначения клиницистом перечня анализов, измерение которых необходимо для постановки диагноза или слежения за состоянием пациента. Одна из распространенных причин ошибок – неадекватное лабораторное обследование. Заведомо ценный тест не принесет пользы, если результат анализа никак не использовать.

В каждом лечебно-профилактическом учреждении, опираясь на **признанные** международные и отечественные стандарты и рекомендации, следует разработать и утвердить стандарт проведения данного этапа лабораторного исследования.

Сложность организации преаналитического этапа в клиничко-диагностической лаборатории любого типа во многом обусловлена тем, что здесь преобладает ручной труд и тем, что многочисленный персонал, обслуживающий пациента на этом этапе, имеет разноплановое подчинение (рис.4.).

Рис.4. Персонал, включенный в преаналитический этап.



В лечебно-профилактическом учреждении рекомендуется разработать и утвердить инструкцию по качеству проведения каждого этапа лабораторного исследования (Таблица 1).

Таблица 1. Содержание инструкции по обеспечению качества преаналитического этапа.

Форма заявки на исследование
Процедура взятия пробы: <ul style="list-style-type: none"> – лабораторная посуда – системы для взятия биологического материала
Процедура выполнения манипуляции <ul style="list-style-type: none"> – венозная, капиллярная, артериальная кровь – моча – цереброспинальная жидкость – асцитическая и плевральная жидкость и т.д.
Доставка биологического материала
Регистрация, центрифугирование и идентификация материала
Хранения биологического материала

Выявление влияний – гемолиз, липемия, лекарственные препараты и т.д.
Документирование, ответственность

Факторы влияния на результаты измерения аналитов, детальные рекомендации, ограничения, исключения по подготовке пациентов, взятию, хранению, условиям доставки биологических проб, условиям центрифугирования – все это необходимо подробно обсудить в руководстве по преаналитике клиники.

Бланк-заявка должна быть разработана руководителем лаборатории совместно с клиницистами. Частая смена ее нежелательна. Главное требование к бланку-заявке одно: удобство работы с ними для клиницистов, медсестер и специалистов лаборатории. Заполнение бланка не требует определенного навыка, но в целом, без участия в заполнении и контроле персонала клинических отделений всех заявок отправляемых в клиническую лабораторию, никогда не добиться успеха в обеспечении качества преаналитического этапа.

Подготовка пациента к исследованиям – одна из важнейших составляющих преаналитического этапа. Здесь обязательно должны быть выполнены определенные действия:

- врач-клиницист должен объяснить пациенту необходимость лабораторного исследования
- медицинская сестра должна информировать пациента о том, как ему нужно подготовиться к исследованию

Дополнительно можно порекомендовать разработать памятки для пациентов по подготовке к различным видам исследований (таблица 2).

Таблица 2. Памятка для пациента.

Памятка для пациента
<p>Исследование назначено Вашим лечащим врачом.</p> <p>Цель исследования: объективно оценить состояние Вашего здоровья</p> <p>Вы должны подготовиться к исследованию следующим образом: воздержаться от физических нагрузок, приема алкоголя и лекарств, изменений в питании в течение 24 часов до взятия крови. Вам не следует принимать пищу после ужина, лечь спать нужно накануне в обычное для Вас время и встать не позднее, чем за час до взятия образца. Утром после подъема воздержитесь от курения. Если Вы испытываете трудности с отменой лекарств, то обязательно сообщите об этом лечащему врачу.</p> <p>Накануне вечером перед проведением процедуры взятия или получения биологического образца, подойдите к медицинской сестре и уточните, где Вам необходимо находиться утром для ее выполнения.</p> <p>Очень важно, чтобы Вы точно следовали указанным рекомендациям, так как только в этом случае будут получены ценные результаты исследования.</p>

Достоинство таких памяток в том, что они способствуют стандартизации преаналитического этапа и устраняют ряд ошибок, которые могут возникнуть в результате неинформированности пациента о порядке подготовки к лабораторному обследованию.

В инструкцию по качеству проведения преаналитического этапа нужно четко прописать условия взятия крови или сбора биологического материала. Особо следует обратить внимание на:

- наличие инструкции у процедурной медицинской сестры
- обучение медицинской сестры правилам взятия и сбора биологического материала
- готовность пациента к исследованию
- правильную идентификацию пациента и биологического образца
- правильное заполнение направления на исследование
- правильный выбор приспособления для взятия биологического материала

Хотелось бы подробнее остановиться на условиях взятия крови из вены. Ключевые моменты и общие правила:

- наложение жгута не более двух (2) минут (табл.3)
- не заставлять пациента работать, сжимая и разжимая пальцы
- соблюдать последовательность взятия крови/пробирок: микробиология, цельная нативная кровь (для приготовления сывороток), цитратная кровь, гепаринизированная кровь

Таблица 3. Влияние длительности наложения жгута при венепункции на результаты анализов

Аналит	Время наложения жгута, мин.			
	0	2	4	6
Кальций общий, моль/л	2,38	2,45	2,52	2,58
Белок общий, г/л	72	74	77	80
Альбумин, г/л	39	40	42	43

Важно, особенно для пациентов, находящихся в отделении интенсивной терапии или операционной, принять за правило: никогда не брать кровь из вены, в которую проводится введение лекарств и растворов (при взятии крови на лабораторные исследования необходимо учитывать и расписание уже проведенных инфузий; кровь можно брать только через 8 часов после введения жировых эмульсий и через час после введения растворов, содержащих аминокислоты и гидролизаты белков, электролиты, или растворов с высоким содержанием углеводов). Приемлемый интервал между взятием крови и отделением сыворотки (или плазмы) от контакта с клеточными элементами крови – 1,5-2,0 часа.

Особое внимание следует уделить процессу сбора мочи. Должен быть четко прописан порядок и последовательность всех действий и процедур, а для пациента

должны быть разработаны ясные и понятные памятки, содержащие предупреждение о том, что в случае нарушения рекомендаций моча будет непригодна для анализа (таблица 4).

Для создания условий по стандартизации преаналитического этапа и обеспечения качества настоятельно рекомендуется пользоваться специальной лабораторной посудой.

Таблица 4. Сроки доставки проб в лабораторию (ARUP Laboratories, 2002).

Наименование исследования	Максимально допустимое время (с момента взятия материала)
Микроскопия мочи	90 минут
Паразитология: кал на амебиаз	Немедленно
Общеклиническое исследование крови	60 минут
Биохимия крови:	
– глюкоза	20 минут
– ферменты	30 минут
– К, Na, Cl	30 минут
Коагулологическое исследование	45 минут
Микробиологическое исследование:	
– мазок со средой	90 минут
– мазок без среды	20 минут

При организации транспортировки проб в лабораторию нужно учитывать не только временной фактор, но и стабильность отдельных аналитов в пробе (фосфора, калия, АЛТ, АСТ, глюкоза и др.). В случае исследования состояния свертывающей и противосвертывающей системы, помимо особой тщательности соблюдения техники взятия крови из вены (например, отбросить первую порцию крови, не менее 1 мл) и соотношения антикоагулянт (цитрат/цельная кровь 1:9), существуют строгие требования к условиям и времени транспортировки проб: только в закрытых пробирках, время доставки при 20-25°C от 2 до 4 часов. При доставке и хранении материала следует избегать воздействия прямого света.

Лабораторная часть преаналитического этапа начинается с момента доставки пробы и заявки в лабораторию. Выделяют следующие этапы:

- организация приема проб и заявок (регистрация проб пациента);
- идентификация проб, центрифугирование;
- при необходимости соблюдение условий и сроков хранения проб до анализа;
- выявление влияний (гемолиз, липемия) и примесей (метаболиты лекарств, загрязнения);
- распределение проб по рабочим местам, выполнение исследования

В лаборатории рекомендуется организовать место приема биологического материала. При поступлении материала в лабораторию регистратор проверяет соответствие проб направлениям, состояние проб, время взятия и доставки

материала. Специалистом клинической лабораторной диагностики должны быть определены и утверждены критерии отказа в приеме материала на исследование (например, расхождение между данными заявки и этикетки на пробирке, невозможность прочесть заявку, материал взят не с тем антикоагулянтом или консервантом, превышение сроков доставки, наличие сгустков в цельной крови с антикоагулянтом и прочее). После центрифугирования наиболее частые критерии отказа – гемолиз, мутность пробы. В таблице 5 отражены основные внешние факторы, оказывающие влияние на стабильность пробы и препятствующие проведению исследования.

Таблица 5. Внешние факторы, влияющие на стабильность пробы.

Факторы	Аналиты, подверженные максимальным изменениям
Время и температура	Все аналиты
Открытые пробирки	Этанол, рСО ₂ , рО ₂
Антикоагулянт	Коагулограмма
Свет	Билирубин
Замораживание/оттаивание	Кальций и фосфор в моче
Перемешивание после оттаивания	Все аналиты

Центрифугированию подвергается различный материал, который в дальнейшем предполагается использовать для лабораторных исследований. Оценка времени центрифугирования – это, прежде всего, определения соответствия времени и условий центрифугирования данному виду материала (визуальный контроль центрифугирования).

Как исключить и уменьшить риск свертывания крови после центрифугирования? Лучший материал для исследования – плазма. Использование плазмы дает дополнительное удобство: сокращение времени подготовки проб к исследованию на 25-30 минут. При использовании в работе сыворотки, необходимо использовать пробирки с консервантом, вакуумные или иные системы для взятия крови со специальным гелем или покрытые силиконовыми частицами, что активизирует агрегацию тромбоцитов и стандартизирует условия образования сгустка.

Правило получения проб – как можно быстрее отцентрифугировать доставленный материал. Длительный контакт сыворотки со сгустком крови приводит к значительным изменениям истинного содержания многих аналитов (калий, глюкоза, АСТ, ЛДГ).

В структуре затрат времени значительную часть занимают процессы, входящие в преаналитический этап, а финансовые затраты на этой стадии могут составлять от 20% до 40% общей стоимости лабораторных исследований. Анализ ошибок в лаборатории показывает, что около 40% из них совершается на преаналитическом этапе при выполнении исследований в плановом порядке и около 60% ошибок происходит на данном этапе в лабораториях неотложного

анализа. При этом структура основных ошибок выглядит следующим образом (M.Plebani, P.Carraro, 1997):

- идентификация учреждения, отделения – 15%
- идентификация пациента – 2,6%
- использование не того антикоагулянта – 2,6%
- нарушение условий взятия крови – 2,1%

Основная форма контроля преаналитического этапа – периодические внешние и внутренние проверки. Но данную форму контроля нельзя признать эффективной. Проблема контроля этого этапа лабораторных исследований остается на сегодняшний день одной из серьезнейших проблем современной лабораторной медицины.

Наиболее эффективным и действенным представляется шаг в создании стандартных условий взятия, транспортировки и хранения биологических проб пациента (использование вакуумных или иных систем). Внедрение таких систем в практику оказывает влияние не все этапы лабораторного исследования и в целом переводит организацию работы лаборатории на иной уровень. Их использование не только облегчает организацию и значительно продвигает стандартизацию преаналитического этапа, но и создает условия, необходимые для внедрения современных лабораторных систем. При наличии анализаторов они могут использоваться в качестве первичных пробирок, что значительно упрощает аналитический этап лабораторного исследования.

В современных клиниках, клиничко-диагностических лабораториях около 90-95% образцов крови и других биологических образцов забирается при помощи вакуумных систем. Сравнение расходов на открытое взятие крови (взятие крови шприцем), на вторичные пробирки для анализаторов, шприцы, иглы, моющие и дезинфицирующие средства, электроэнергию, дополнительное оборудование для мойки пробирок, учет боя стекла, приобретение необходимых реагентов (антикоагулянтов: ЭДТА, цитрат, гепарин) и оплата труда персонала с одной стороны, приобретение систем для взятия биологического материала (крови, мочи), с другой стороны, по экономическим затратам соизмеримо. Но фактор значительного снижения риска заражения персонала гепатитом и ВИЧ при использовании систем для забора крови (на протяжении всего времени взятия крови соблюдается стерильность забираемого образца, исключается контакт с кровью больного гарантируя защиту медперсонала и пациента, безопасную транспортировку биоматериала) в сравнении с процедурой открытого взятия крови (взятия крови шприцем) нельзя оставить без внимания.

Без внедрения вакуумных систем для взятия крови и образцов биологических жидкостей в широкую практику нельзя ожидать улучшения преаналитического этапа, а главное, обеспечения качества лабораторного исследований в целом.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Лабораторные исследования, которые должны быть проведены всем пациентам с заболеваниями органов дыхания:

1. Острые пневмонии

Лабораторные исследования обязательные:

- анализ мокроты (в т.ч. посев мокроты для определения чувствительности бактериальной флоры к антибиотикам)
- биохимические исследования (общий белок, белковые фракции, билирубин, хлориды, сиаловые кислоты, С-реактивный белок, гаптоглобин, церулоплазмин, фибриноген, ЛДГ, изоферменты ЛДГ в плазме крови)
- серологические исследования – определение титра антител к вирусным и бактериальным агентам

Дополнительные лабораторные исследования (по показаниям):

- исследование мокроты на микобактерии туберкулеза
- вирусологическое исследование в условиях специализированной вирусологической лаборатории
- цитологическое исследование мокроты на атипичные клетки (при подозрении на рак)
- исследование на микоплазму (при атипичных и затяжных пневмониях)
- при наличии жидкости в плевральной полости исследование содержимого (общеклиническое, бактериологическое и цитологическое)
- цитологическое исследование материала полученного при бронхоскопии и зондировании бронхов (промывные воды, соскобы, биопсийный материал и т. п.)
- иммунологическое исследование (определение количества иммуноглобулинов, иммунных комплексов в крови, секреторного иммуноглобулина в мокроте).

2. Плевриты

Обязательные лабораторные исследования:

- биохимический анализ крови на содержание общего белка, белковых фракций, С-реактивного белка, сиаловых кислот, гаптоглобина, церулоплазмينا, фибриногена, холестерина в плазме (сыворотке) крови
- исследование экссудата: общий анализ с обязательным определением относительной плотности белка, постановка реакции Ривальта; цитологическое

и бактериологическое исследование (посев, дополненный антибиограммой, при необходимости – биологическая проба на животных)
Дополнительные лабораторные исследования (по показаниям):

- исследование мокроты на наличие микобактерий туберкулеза
- цитологическое исследование мокроты на атипичные клетки
- биохимическое исследование экссудата (определение содержания в нем глюкозы, общего белка, белковых фракций, сиаловых кислот, ЛДГ и нго изоферменты, аденозиндезаминаза, α -амилаза)

3. Хронические неспецифические заболевания легких

(хронический бронхит, пневмосклероз, эмфизема легких, бронхоэктатическая болезнь, хроническая пневмония)

обязательные лабораторные исследования:

- общий анализ мокроты
- бактериологическое исследование мокроты и определение чувствительности бактериальной флоры к антибиотикам
- биохимические исследования крови: определение общего белка, белковых фракций, С-реактивного белка, сиаловых кислот, гаптоглобина, фибриногена, церулоплазмينا, холестерина, активности ЛДГ и ее изоферментов, аспаратаминотрансферазы
- исследование кислотно-основного состояния и уровня газов крови
- определение гематокрита (тест для выявления легочной недостаточности)
- исследование функции почек при наличии протеинурии (по представленной схеме)
- иммунограмма при подозрении на иммунодефицит (определение иммуноглобулинов, титра комплемента, иммунных комплексов в крови)

Дополнительные лабораторные исследования (по показаниям):

- исследование мокроты на МТ методом флотации (при подозрении на туберкулез)
- исследование мокроты на атипичные клетки (при подозрении на рак)
- пробы с конго-красным или метиленовой синькой при подозрении на амилоидоз)
- цитологическое исследование материала, полученного при бронхоскопии и зондировании бронхов (промывные воды, соскобы, биопсийный материал и т.п.)
- определение содержания в крови α_1 -антитрипсина

4. Бронхиальная астма

Обязательные лабораторные исследования:

- анализ мокроты общий и на лабораторные тест-критерии бронхиальной астмы; подсчет эозинофилов в мокроте (взятой после приступа)
- исследование слизи из носа на эозинофилы
- биохимическое исследование крови: определение содержания общего белка, белковых фракций, С-реактивного белка, фибриногена, билирубина, сиаловых кислот, гистамина, активности гистаминазы, гематокрита
- иммунологическое исследование

Дополнительные лабораторные исследования (по показаниям):

- определение содержания 17-кетостероидов и оксикортикостероидов в крови и моче (для оценки функции надпочечников)
- определение экскреции 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) с мочой (для выявления карциноида)
- выявление аллергии к пылевым, микробным, грибковым и другим аллергенам (постановка кожных проб, проведение ингаляционных провокационных проб при отрицательных кожных). Аллергологическое исследование проводится после консультации с аллергологом.

5. Злокачественные новообразования легкого

Обязательные лабораторные исследования:

- цитологическое исследование мокроты (3-х кратное)
- цитологическое исследование материала, полученного при бронхоскопии и зондировании бронхов (промывные воды, биоптаты, соскобы и т.п.)
- цитологическое исследование пунктатов (плеврального содержимого, опухолевых узлов периферической локализации, лимфатических узлов)
- биохимическое исследование крови: определение концентрации общего белка, белковых фракций, С-реактивного белка, активности аспаратаминотрансферазы, ЛДГ, спектра изоферментов ЛДГ, фибриногена.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Характеристика мокроты при различной легочной патологии.

Нозологическая форма	Макроскопическое исследование			Микроскопическое исследование
	Количество	Характер	Включения, патологические элементы	
Острый бронхит	Скудное (в поздних стадиях большое количество)	Слизистая, слизисто-гнойная		Цилиндрический эпителий, лейкоциты (умеренное количество), при затяжном течении макрофаги
Хронический бронхит	Различное	Слизисто-гнойная, слизисто-гнойно-кровянистая		Лейкоциты (большое количество); эритроциты, обильная флора, макрофаги
Бронхоэктатическая болезнь	Обильное (утренняя – «полным ртом»)	Гнойно-слизистая, трехслойная	Пробки Дитриха	Лейкоциты (большое количество); кристаллы жирных кислот, кристаллы гематоидина, холестерина; флора разнообразная, обильная
Крупозная пневмония	Скудное вначале, обильное позже	Клейкая, ржавая вначале, позже слизисто-гнойная	Свертки фибрина, измененная кровь	Макрофаги, лейкоциты, эритроциты, кристаллы гематоидина, зернышки гемосидерина, пневмококки
Бронхиальная	Скудное	Слизистая	Спирали	Цилиндрически

астма			Куршмана	й эпителий, кристаллы Шарко-Лейдена, эозинофилы
Абсцесс легкого	Обильное при прорыве абсцесса в бронх	Гнойная со зловонным запахом	Обрывки ткани	Лейкоциты (большое количество), эластические волокна, кристаллы жирных кислот, гематоидина, холестерина, флора разнообразная, обильная
Туберкулез легких	Различное	Слизисто-гнойная, иногда с примесью крови	Рисовидные тельца («линзы Коха») при наличии каверн	Микобактерии туберкулеза; эластические волокна и различные кристаллы
Бронхолегочной рак	Различное	Слизисто-кровянистая, слизисто-гнойно-кровянистая	Обрывки ткани в обильной мокроте при распаде опухоли	Атипичные клетки

Использованная литература:

1. Цитоморфологические методы диагностики болезней органов дыхания / Л.Суркова, М. Дюсьмикеева, А. Василевский и др. // Метод. рекомендации. - Минск, НИИПиФ РБ. - 2001.
2. Туберкулез / Под ред. Хоменко А. Г. // Руководство для врачей М.: Медицина, 1996. – 496 с.
3. Ященко Т. Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулезе. - М., «Медицина». – 1973.
4. Колб В. Г. Биохимические аспекты организма при туберкулезе.- Мн.: Беларусь. - 1971.
5. Рудой И. М. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза.- М.: Медицина, 1969.
6. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. проф. Е. А. Коста. – М.: Медицина, 1975.
7. Шебанов Ф. В. Туберкулез. – М.: Медицина, 1969.
8. Любина А., Ильичева Л. Клинические лабораторные исследования. – М.: Медицина, 1984.
9. Камышников В. Справочник по клинико-биохимическим методам исследования. – Мн.: Беларусь, 2000.
10. Лаптева И. М., Королева Е. Г. Применение метода индуцированной мокроты в диагностике пневмоний / Инструкция по применению. - Минск, - 2004.
11. Попковский М. А., Кривовнос П. С., Ломако М. Н. История борьбы с туберкулезом в Беларуси, прошлое и настоящее // Матер. 9-й республиканской научной конференции по истории медицины. - Минск, 2001. - С. 204-206.
12. Мордовской Г. Г. Приготовление и использование новой питательной среды для выращивания микобактерий туберкулеза / Метод. рекомендации. - М., 1972. - С. 9.
13. Ященко Т. Н., Мечева И. С. Питательные среды / Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулезе. - М.: Медицина. – 1973. С.149-157.

содержание

	Стр.
Введение	2
Общеклинические анализы	4
Сдвиги в гемограмме	4
ИЗМЕНЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ.	6
Исследование мокроты	9
Микроскопическое исследование мокроты	13
Исследование мокроты на наличие микобактерии туберкулеза	14
Прямая бактериоскопия	15
Люминисцентная бактериоскопия	17
Метод флотации	18
Метод седиментации	18
Бактериологическое исследование	18
Идентификация микобактерий	24
Определение лекарственной чувствительности МБТ	25
Выявление L-форм МБТ	26
Исследования у пациентов не выделяющих мокроту	27
Метод индуцированной мокроты	28
Исследование промывных вод бронхов	30
Исследование промывных вод желудка	30
Исследование мочи	31
Исследование фекалий	32
Исследование экссудатов, асцитической жидкости, гноя	32
Аденозиндезаминазный тест	33
Исследование спинномозговой жидкости	34
Исследование кожи	35
Бронхоальвеолярный лаваж	35
Биопсия при патологических процессах в грудной клетке	37
ПЦР-диагностика	37
Биологический метод	39
Иммуноферментный анализ	40
Система микробиологического мониторинга	40
Биочипы	41
Преаналитический этап лабораторных исследований	41
Приложения	50
Использованная литература	55