



**Современные методы лабораторной диагностики
туберкулёза различного инфекционного
биоматериала пациентов, используемые
в бактериологической лаборатории
противотуберкулёзной службы**

**Заведующая бактериологической лабораторией
ГБУЗ СОКПТД им. Н.В. Постникова Персиянцева Т.П.
март 2024 год**

Задачи бактериологической службы

Основной задачей бактериологической службы ПТД является проведение в максимально короткие сроки всех необходимых микробиологических исследований биоматериала на наличие комплекса микобактерий туберкулёза, необходимые для утверждения диагноза.

А также для дифференциальной диагностики (онкологические заболевания, инфекционные заболевания нетуберкулёзной этиологии).

Задачи бактериологической службы

- ❖ **своевременность и качество выдачи результатов исследований**
- ❖ **проведение внутрилабораторного и внешнего контроля качества исследований (ФСВОК)**
- ❖ **соблюдение методик проведения исследований (СОПы)**
- ❖ **соблюдение требований санитарно-эпидемиологического режима**

Этиологическая диагностика туберкулеза

Задачи	Методы
Подтверждение / исключение наличие возбудителя	Микроскопия; Культуральные методы; Молекулярно-генетические
Идентификация возбудителя	Культуральные; Молекулярно-генетические; Иммунохроматография
Исследование лекарственной чувствительности	Культуральные методы; Молекулярно-генетические

Виды исследований , выполняемые в бактериологической лаборатории

1. **Микроскопическое** исследование диагностического материала (люминесцентная , световая микроскопия, LED-микроскопия (светодиодная)).

2. **Культуральные исследования:**

- ❖ **посев** диагностического материала **на плотные** питательные среды (Левенштейн-Йенсен и Финн-2);
- ❖ **посев** диагностического материала **на жидкую** питательную среду MGIT;
- ❖ **типирование** (биохимические методы идентификации микобактерий);
- ❖ **Тесты Лекарственной Чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (ТЛЧ)** на плотных и жидких питательных средах;
- ❖ **гемокультивирование** – определение бактериемии у пациентов.

3. **Молекулярно-генетические исследования** на наличие ДНК возбудителя в материале с определением устойчивости к противотуберкулезным препаратам (ПТП).

4. **Тесты in vitro** для диагностики туберкулеза по анализу крови. К ним относятся **квантифероновый тест**, при котором определяют гамма-интерферон из иммунных клеток (сенсibilизированных Т-лимфоцитов) и **T-SPOT**, определяют сами иммунные клетки (сенсibilизированные Т-лимфоциты) при добавлении венозной крови в пробирку, содержащую специфические антигены **M. Tuberculosis**.

Технологический процесс этиологического исследования



Правила проведения лабораторных исследований

Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 18 мая 2021 г. N 464н

- ❖ Лабораторные исследования проводятся при оказании медицинской помощи в следующих условиях: амбулаторно, в дневном стационаре, стационарно.
- ❖ **Направление на лабораторное исследование пациента осуществляется лечащим врачом.** Направление на лабораторное исследование оформляется в виде документа на бумажном носителе либо формируется в форме электронного документа.
- ❖ Лабораторные исследования включают **преаналитический, аналитический и постаналитический этапы.**
- ❖ Лаборатория должна иметь систему управления качеством клинических и микробиологических лабораторных исследований, разработанную в соответствии с требованиями национальных и отраслевых стандартов, внутрिलाбораторный контроль качества исследований и регулярное участие в программах межлабораторных сравнительных (сличительных) испытаний, а также осуществлять внутренний контроль качества и безопасности медицинской деятельности.
- ❖ Весь биологический материал человека, поступающий в медицинские и иные организации, осуществляющие медицинскую деятельность, должен рассматриваться как потенциально инфицированный. Работы со всем поступающим биологическим материалом в лаборатории должны проводиться с обеспечением биологической безопасности как в отношении сотрудников лаборатории, так и окружающей среды в соответствии с нормативными документами.

Преаналитический этап

Преаналитический этап – это комплекс мероприятий, выполняемых от назначения врачом лабораторного анализа, до осуществления лабораторных измерений взятого материала. Этот этап в наименьшей мере находится под контролем лаборатории, т.к. значительная его часть осуществляется сотрудниками других подразделений медицинской организации.

- ❖ Назначение врачом необходимых лабораторных исследований
- ❖ Заполнение врачом или мед сестрой направления на исследование
- ❖ Получение пациентом инструкций у врача или медсестры об особенностях подготовки к сдаче биологического материала
- ❖ Взятие биологического материала
- ❖ Доставка биологического материала

Правила биологической безопасности на преаналитическом этапе бактериологического исследования

К работе по взятию и транспортировке биологического материала допускается медицинский персонал, прошедший специальный **инструктаж по технике и мерам безопасности**.

При взятии биологического материала должны использоваться **средства индивидуальной защиты**: медицинские халаты, шапочки, сменная обувь, резиновые (латексные, виниловые) перчатки, при необходимости — дополнительно марлевые маски (респираторы), очки, клеенчатые фартуки.

Работать с исследуемым материалом следует в резиновых (латексных, виниловых) перчатках, все повреждения кожи на руках должны быть закрыты лейкопластырем или напальчником.

Следует избегать уколов и порезов. В случае загрязнения кожных покровов кровью или другими биологическими жидкостями следует немедленно обработать их в течение 2 мин тампоном, обильно смоченным 70% спиртом, вымыть под проточной водой с мылом и вытереть индивидуальным тампоном.

Необходимые условия процедуры сбора пробы биоматериала ПБА:

1. До начала антибактериальной терапии, при отсутствии такой возможности — непосредственно перед повторным введением (приемом) препаратов;
2. В количестве (масса, объем), необходимом для выполнения анализа, т.к. недостаточное для исследования количество биоматериала приводит к получению ложных результатов, а избыточное усложняет проведение исследования.
3. С минимальным загрязнением пробы бактериями нормобиоты, т.к. их наличие приводит к ошибочной трактовке результатов, полученных из проб нестерильных биотопов организма, например, при исследовании мокроты, проб из носа, глотки (зева), гениталий и др.;
4. Взятие проб биологического материала должны проводить специально обученные медицинские работники, желательно врачи;
5. В случае самостоятельного сбора биоматериала пациентами им должна выдаваться памятка с пошаговой инструкцией по сбору;
6. Для взятия и транспортировки проб используют стерильные инструменты, пробирки или контейнеры, предназначенные для этих целей. Использование нестерильных пробирок для транспортировки допускается только для проведения серологических исследований.

Оснащение кашлевой комнаты

- ❖ **ультрафиолетовый облучатель рециркулятор**, работающий в присутствии сотрудников и пациентов;
- ❖ **бактерицидная лампа** (после текущей или генеральной уборки) в отсутствие людей;
- ❖ **кушетка для больных** (предназначена для принятия удобной позы при сборе мокроты);
- ❖ **мебель с покрытием**, позволяющим проводить обработку дезинфицирующими растворами;
- ❖ **расходный материал**: респираторы , шапочки, перчатки, чистая ветошь.

- ❖ К **флаконам** для сбора диагностического материала предъявляются следующие основные требования:
 - ❖ флакон должен быть изготовлен из полипропилена (PP) высокой плотности (HD) и выдерживать центрифугирование при 3000g;
 - ❖ флакон должен иметь широкое горлышко, чтобы пациенту было удобно собирать мокроту
 - ❖ емкость флакона должна составлять около 50 мл;
 - ❖ крышка должна быть плотно завинчивающейся, чтобы предотвратить вытекание потенциально
 - ❖ опасного материала в процессе транспортировки.

Не загрязнять наружную поверхность посуды при сборе и доставке пробы!

Сбор биоматериалов

В методических указаниях изложены правила сбора и транспортирования биологических материалов в микробиологические лаборатории в целях повышения качества результатов лабораторных исследований и организации противоэпидемических и профилактических мероприятий, а также профилактики внутрибольничных инфекций у медицинского персонала и пациентов.

- ❖ **МОКРОТА** сбор проводится в специально оборудованном помещении под контролем медицинского работника, утром, до еды, после тщательного туалета полости рта в стерильные флаконы
- ❖ **МОЧА** следует собирать утреннюю порцию мочи в количестве 20-30 мл в стерильный флакон
- ❖ **ПЛЕВРАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ**
- ❖ **ЛИКВОР**
- ❖ **ПРОМЫВНЫЕ ВОДЫ ЖЕЛУДКА**
- ❖ **ПРОМЫВНЫЕ ВОДЫ БРОНХОВ**
- ❖ **ОТДЕЛЯЕМОЕ СВИЩА (ЛИМФОУЗЛА)**
- ❖ **СИНОВИАЛЬНАЯ ЖИДКОСТЬ**
- ❖ **СОДЕРЖИМОЕ РАЗЛЧНЫХ ПОЛОСТЕЙ**

забираются специалистом в специализированных кабинетах (процедурный, бронхоскопический и т.д.) согласно соответствующей методике, помещаются в стерильный контейнер для доставки в лабораторию

Хранение и доставка диагностического материала

- ❖ Доставляется диагностический материал в сопровождении специально обученного медицинского работника (если это не возможно, необходимо обучить водителя).
- ❖ В лабораторию диагностический материал доставляется в специальных термоконтейнерах, внутри в штативах.
- ❖ Необходимо иметь 2 контейнера (в лаборатории забирается после дезинфекционной обработки).
- ❖ Помимо направления на всю партию диагностического материала оформляется сопроводительный лист (2 экземпляра).
- ❖ Сопроводительные документы (направления, сопроводительный лист) доставляются отдельно от проб.



Сопроводительные документы

Оформление сопроводительных направлений

1. Заполнять направление строго печатными буквами! Разборчиво!
2. Внимательно указывать дату рождения пациента
3. Указывать дату и время сбора материала
4. Указывать цель направления

Сопроводительные документы должны помещаться в чистый конверт, без помещения в транспортировочный контейнер в котором находится биоматериал.

Категорически запрещается заворачивать флакон с материалом в бланк направления!

При поступлении материала, не отвечающего вышеуказанным требованиям, а также при отсутствии направления и/или маркировки (этикетки) на флаконе с материалом он подлежит уничтожению с обязательным извещением об этом учреждения, направившего материал

Ошибки в сопроводительных направлениях

1. Заполнять направление строго печатными буквами! Разборчиво!
2. Внимательно указывать дату рождения пациента
3. Указывать дату и время сбора материала
4. Указывать цель направления

Ошибки, возникающие на преаналитическом этапе исследований (сбор материала, хранение и доставка в бак лабораторию), обесценивают весь дальнейший ход лабораторных исследований, приводят к потере значительных средств, дискредитируют лабораторные методы в глазах лечащего врача из-за недостоверности получаемых результатов.

Аналитический этап

Аналитический этап включает технологический процесс проведения исследований, подготовку реагентов и приборов к проведению исследования, выполнение протокола анализа, проведение процедуры контроля качества, регистрацию, математическую обработку результатов исследований.

Контроль качества на аналитическом этапе исследований основывается на использовании контрольных материалов. Их анализ – так называемые контрольные измерения, дают возможность сделать заключение о достоверности и воспроизводимости получаемых в лаборатории результатов.

Для качественного выполнения анализов необходимо:

- ❖ современное передовое оборудование;
- ❖ квалифицированные специалисты;
- ❖ набор реагентов, имеющих высокую диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность.

Для контролирования качества выполняемых исследований проводится:

- ❖ внутрилабораторный и внешний контроль качества;
- ❖ контроль оценки качества в ФСВОК – федеральной системе внешней оценки качества (Россия) и EQAS - Международной системе оценки качества.

Алгоритм лабораторного исследования различного инфекционного биоматериала пациентов в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями по туберкулёзу: **Микроскопический**

❖ Окраска мазков по методу Ziehl-Neelsen

Метод окраски по Ziehl-Neelsen является наиболее употребляемым и распространенным методом для выявления кислотоустойчивых микобактерий

❖ Окраска препаратов для люминесцентной микроскопии

Метод основан на наблюдении микроскопических объектов с использованием их способности к свечению. По сравнению с методами обычной микроскопии исследование в свете люминесценции обладает рядом преимуществ: цветное свечение, высокая степень контрастности светящихся объектов на темном фоне, значительно большая площадь поля зрения.

Подсчитано, что если микроскопическое исследование необходимой площади мазка при окраске по Ziehl-Neelsen продолжается приблизительно 10 минут, то для исследования той же площади мазка методом люминесцентной микроскопии потребуется только 2 - 3 минуты. Чувствительность метода на 10% выше, чем бактериоскопии с окраской по Ziehl-Neelsen и позволяет обнаружить КУМ при содержании более 1 000 микробных тел в 1 мл материала.

❖ LED-микроскопия (светодиодная)

Чувствительность метода на 10% выше, чем бактериоскопии с окраской по Ziehl-Neelsen и позволяет обнаружить КУМ при содержании более 1 000 микробных тел в 1 мл материала.

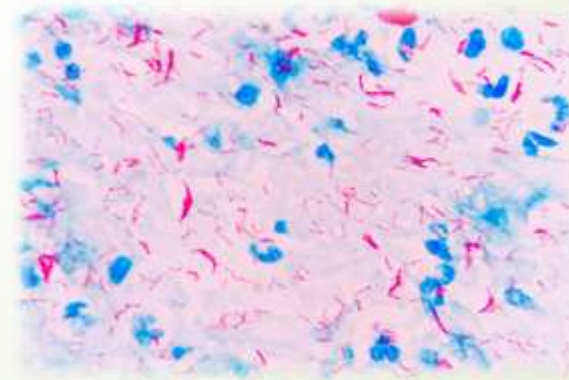
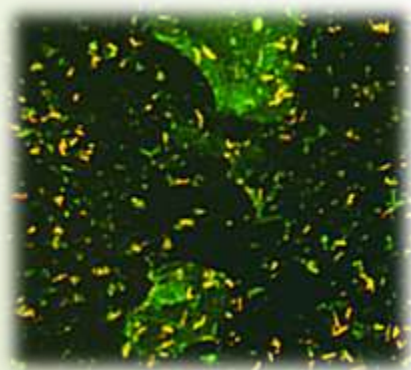
Приказ Минздрава России от 21.03.2003 № 109
«О СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ
МЕРОПРИЯТИЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»

❖ Приложение № 10

инструкция по унифицированным
методам микроскопических
исследований для выявления
кислотоустойчивых микобактерий в
клинико-диагностических лабораториях
лечебно-профилактических учреждений

Кроме высокой специфичности к комплексу **M. tuberculosis**, выявление **кислотоустойчивых микобактерий** при микроскопии играет важную роль по трем причинам:

- ❖ это наиболее быстрый метод диагностики туберкулеза;
- ❖ позволяет выявить больных с тяжелым развитием патологии, чреватым высоким риском летального исхода;
- ❖ дает возможность выявить больных, являющихся распространителями инфекции.



Алгоритм лабораторного исследования различного инфекционного биоматериала пациентов в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями по туберкулёзу: **Культуральный**

Для посева диагностического материала используют разнообразные питательные среды, среди которых можно выделить 3 основные группы

- ❖ **плотные питательные среды на яичной основе;** (Левенштейна-Йенсена, Финна, Петраньяни и др.) Стандартной плотной средой, рекомендуемой ВОЗ для выделения возбудителя и определения его лекарственной чувствительности является яично-солевая среда **Левенштейна-Йенсена**.
- ❖ **плотные или полужидкие питательные среды на агаровой основе;** (Миддлбрука 7Н10, 7Н11 и др.);
- ❖ **жидкие синтетические и полусинтетические питательные среды.** (Миддлбрука 7Н9, 7Н12, Дюбо, Школьниковой и др.).


Каждая из этих сред имеет положительные и отрицательные особенности. В связи с этим для повышения результативности культурального метода рекомендуется применять посев диагностического материала одновременно на 2 - 3 питательные среды разного состава.

Алгоритм лабораторного исследования различного инфекционного биоматериала пациентов в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями по туберкулёзу: **Молекулярно-генетический метод**

- ❖ **Автоматизированная закрытая система GeneXpert MTB/RIF** ПЦР в режиме реального времени (картриджная технология)
- ❖ **Тест-система «Амплитуб»** ПЦР в режиме реального времени (Синтол
Тест системы: Амплитуб-РВ, Амплитуб-МЛУ РВ (H и R), Амплитуб-ШЛУ РВ (Fq))
- ❖ **Биочиповая технология** (Гибридизационная технология с использованием биочипов Тест-системы: БИОЧИП-1 (H и R) БИОЧИП-2 (Fq)
ТБ-ТЕСТ (H, R, Fq, AG/CP, E, генотипы)
- ❖ **Секвенирование**

GeneXpert-диагностика in vitro, включающая автоматизированную подготовку образцов, амплификацию нуклеиновых кислот и определения искомой последовательности в образцах с использованием методов ПЦР в режиме реального времени:

- ❖ **Высокая скорость получаемых результатов**
- ❖ **Высокая точность и достоверность получаемых результатов**
- ❖ **ПЦР методика, не требующая отдельного помещения**
- ❖ **Простота в использовании (сочетает в себе автоматическую подготовку образца, амплификацию и детекцию в режиме реального времени)**
- ❖ **Работает с разными типами образцов патогенного материала**



«Амплитуб» — технология быстрой молекулярно-генетической диагностики туберкулёза для выявления микобактерий туберкулёзного комплекса, определения инфекционной опасности больного, определения антибиотикоустойчивости к препаратам I и II ряда, идентификации и генотипирования микобактерий. Технология «Амплитуб» состоит из 3-х основных этапов: пробоподготовки, выделения ДНК и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Секвенирование нового поколения (NGS)

Секвенирование нового поколения (Next-generation sequencing, NGS) – массово-параллельное (глубокое) секвенирование фрагментов ДНК, исследование миллионов фрагментов ДНК/РНК за запуск. Биоинформатический анализ используется для объединения этих фрагментов путем сопоставления отдельных данных с эталонным геномом. Появление NGS сделало WGS более быстрым и доступным.

Целевое (таргетное) секвенирование на платформе NGS - позволяет определить нуклеотидные последовательности в отдельных участках генома (нескольких генах). Целевое NGS ориентировано на секвенирование выбранного набора генов или областей генов с которыми ассоциированы специфические патогены.



Косвенный иммунологический метод: IGRA-тесты

Interferon – Интерферона
Gamma – Гамма
Release – Высвобождение
Assays – Анализ

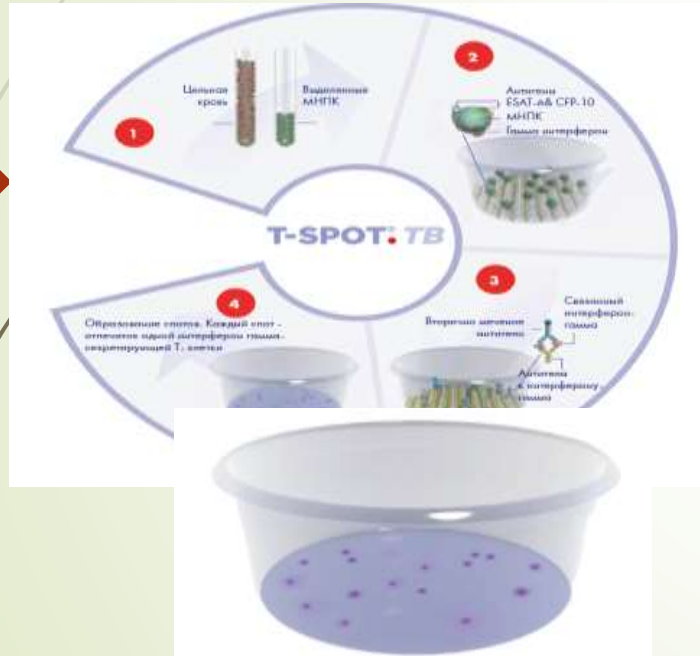
Суть диагностических тестов *in vitro* (исследование крови) – при контакте специфических белков *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT-6 и CFP-10) с Т-лимфоцитами крови инфицированного пациента выделяется гамма-интерферон (IGRA).

**ESAT-6 и CFP-10 ОТСУТСТВУЮТ ВО ВСЕХ ШТАММАХ БЦЖ И БОЛЬШИНСТВЕ
НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ**

IGRA-тесты представлены:

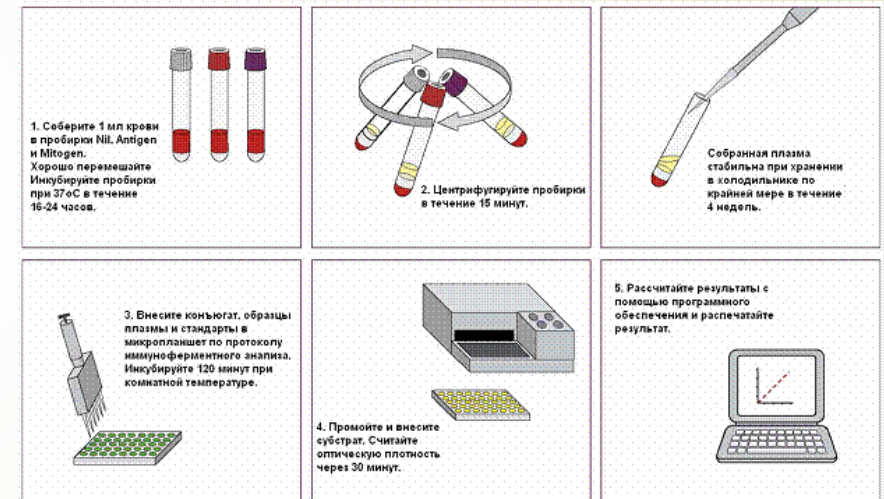
T-СПОТ.ТБ (ELISPOT)

Определение количества активированных Т-лимфоцитов, выделяющих гамма-интерферон



QFT (ELISA)

Определение уровня специфического гамма-интерферона в крови



IGRA- тесты не позволяют отличить активную форму туберкулеза от латентной

T-SPOT TB тест

Принцип метода: *in vitro* диагностика туберкулеза путем выявления эффекторных Т-клеток, реагирующих на стимуляцию антигеном *M. tuberculosis*.

- ❖ предназначен в качестве дополнительного средства диагностики туберкулезной инфекции
- ❖ высокая чувствительность и специфичность
- ❖ может применяться для пациентов с ВИЧ-инфекцией
- ❖ вакцинация БЦЖ не влияет на результаты теста T-SPOT TB
- ❖ метод является способом количественной диагностики наличия в организме возбудителей туберкулеза, но не дает возможности отличить активную форму туберкулеза от латентной

Постаналитический этап

Постаналитический этап – выдача результатов лабораторных исследований и измерений, оценка и использование их лечащим врачом в лечебном процессе.

- ❖ **Лаборатория выдает результат исследований**
- ❖ **Лаборатория не дает рекомендаций по тактике лечения и терапии в заключении**
- ❖ **Лаборатория не ставит диагноз по результатам исследования**
- ❖ **Лаборатория консультирует врача-клинициста по результатам исследования**

❖ Наиболее частыми причинами **неправильного результата лабораторных исследований** являются ошибки, допущенные на преаналитическом этапе: неправильное взятие пробы биологического материала и нарушения условий и сроков ее транспортировки.

❖ Ошибки, допущенные на преаналитическом этапе исследования чреваты потерей времени и средств на проведение повторных исследований, а их более серьезным следствием может стать неправильный диагноз. Поэтому для обеспечения качественного выполнения процедур преаналитического этапа в каждой медицинской организации необходимо разработать внутренний стандарт преаналитического этапа. Кроме этого, необходимо внедрение передовых технологий — использование одноразовых приспособлений для взятия и транспортировки проб биологического материала.

Возможные проблемы:

- 1. Сбор материала производит не врач или не обученный медицинский работник;**
- 2. Неправильная подготовка пациента;**
- 3. Медицинский персонал не соблюдает меры индивидуальной защиты (возможное инфицирование персонала, контаминация биоматериала);**
- 4. Забор материала проводят после начала антимикробной терапии.**

❖ Медицинский персонал, осуществляющий сбор и транспортировку биоматериала для бактериологических исследований не всегда понимает важность этого процесса для получения качественного и достоверного конечного результата.

❖ **Преаналитический этап** бактериологического исследования проводится вне лаборатории и включает в себя: прием врача и назначение пациенту необходимых лабораторных исследований; составление направления на бактериологическое исследование; получение пациентом инструкций врача/медицинской сестры об особенностях подготовки к сдаче анализов или сбору биологического материала; взятие проб биологического материала у пациента; доставка биоматериала в лабораторию.

❖ Все эти процедуры полностью находится **в компетенции врача-клинициста и медицинской сестры**. К сожалению, большинство врачей-клиницистов считают, что они не участвуют в диагностическом лабораторном процессе и поэтому не оказывают никакого участия, контроля персонала.

❖ Появление даже незначительных ошибок на преаналитическом этапе неизбежно приводит к искажению качества окончательных результатов лабораторных исследований. Как бы хорошо в дальнейшем лаборатория не выполняла исследования, **ошибки на преаналитическом этапе не позволят получить достоверные результаты**.

Заключение

- ❖ В лабораторной диагностике ТБ в настоящее время существует целый арсенал высокочувствительных и специфичных методов выявления МБТ и определение их лекарственной чувствительности
- ❖ Современные лабораторные методы позволяют проводить диагностику ТБ в кратчайшие сроки
- ❖ Лабораторные методы в диагностике ТБ дополняют друг друга и важно применять их комплексно, соблюдая диагностический алгоритм

Спасибо за внимание!

