

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
"Красноярский государственный медицинский университет  
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого"  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра туберкулеза с курсом ПО

Реферат  
Тема: Методы обнаружения МБТ в патологическом  
материале

Выполнил:  
Ординатор второго года обучения  
Специальности фтизиатрия  
Лешенков Александр Юрьевич  
Проверил:  
кмн Омельчук Данил Евгеньевич

Красноярск, 2021

## Введение

Диагностика туберкулеза (ТБ) и его лечение остаются одной из наиболее актуальных медико-социальных проблем. В последнее десятилетие во многих странах мира отмечается рост распространенности ТБ и смертности от него, увеличивается количество пациентов с тяжелыми, быстро прогрессирующими формами заболевания (Фещенко Ю.И., Мельник В.М., 2007). В повседневной практике врачи нередко испытывают трудности в дифференциальной диагностике ТБ, хронических неспецифических заболеваний легких (ХНЗЛ), новообразований, туберкулезных и карциноматозных плевритов. Важнейшей проблемой фтизиатрии остается диагностика ТБ у больных без выделения микобактерий туберкулеза (МБТ). ТБ без бактериовыделения часто труден для диагностики и дифференциальной диагностики (Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2008а,б).

## Актуальность

Актуальной проблемой не только фтизиатрии, но и медицины в целом является своевременная диагностика ограниченных форм ТБ: инфильтративного и очагового ТБ. Клинические проявления туберкулезного процесса могут маскироваться под пневмонию. *К ошибочной диагностике пневмонии вместо ТБ могут приводить:*

- нижнедолевая локализация инфильтрата;
- острое или подострое начало туберкулезного процесса по типу пневмонии;
- отрицательные результаты бактериоскопических методов выявления МБТ в мокроте;
- изменения на рентгенограммах, похожие на пневмоническую инфильтрацию.

## Лабораторные методы выявления МБТ

Бактериоскопический метод включает прямую бактериоскопию мазков с патологического материала, окрашенных по Цилю — Нильсену, бактериоскопию методом флотации, люминесцентную микроскопию, фазово-контрастную микроскопию (Петренко В.И., 2006).

*Метод окраски по Цилю — Нильсену* позволяет определить МБТ, когда в 1 см<sup>3</sup> мокроты содержится 5000–1000 МБТ при условии, если просмотрены 300 полей зрения. При незначительном количестве МБТ в мокроте бактериологический метод неэффективен.

*Метод флотации* позволяет повысить содержание МБТ за счет образования пены в суспензии углеводорода и МБТ, на предметное стекло пена наносится несколько раз, после фиксации мазка проводится окраска по Цилю — Нильсену.

*Люминесцентная микроскопия* основана на использовании специальных красителей (родамин, аурамин), которые окрашивают МБТ, в ультрафиолетовых лучах наблюдается характерное свечение. Метод на 10–15% повышает возможность выявления МБТ

в сравнении с прямой бактериоскопией мазка, позволяя просмотреть большее количество полей зрения.

*Фазово-контрастная микроскопия* выявляет биологические изменения формы МБТ.

Наряду с другими к дополнительным методам обследования относятся:

- КТ органов грудной клетки, включая комплексную (КТ, ультразвуковое исследование (УЗИ)) диагностику пристеночных образований грудной полости;
- цитологический метод исследования клеточного состава плевральной жидкости (для дифференциальной диагностики туберкулезных и карциноматозных плевритов);
- ФБС с биопсией;
- иммунологические методы обследования (включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени (realtime));
- ускоренные культуральные методы выявления МБТ с использованием индикаторной пробирки BVL MGIT (MycobacteriaGrowthIndicatorTube).

Последний из перечисленных методов основан на наличии в специальной индикаторной пробирке бульона и соединения с флуоресцеином. При наличии МБТ поглощается кислород, растворенный в бульоне. При этом на дне пробирки наблюдается яркая флуоресценция. В этом случае результат считается положительным.

*Скрининговую световую и люминесцентную микроскопию мазка на МБТ* можно использовать для отдельных групп риска (Фещенко Ю.И., Мельник В.М., 2007):

- у пациентов с ХНЗЛ;
- у лиц с остаточными изменениями после излеченного ТБ;
- у контактных с больными ТБ;
- у пациентов, кашляющих в течение 3 нед, и больных с выделением мокроты.

Абациллярный ТБ труден в дифференциальной диагностике. Несмотря на внедрение КТ и магнитно-резонансной томографии, других инструментальных и инвазивных методов, ТБ и онкопатологию нередко диагностируют с опозданием. У определенной категории больных морфологическая верификация диагноза невозможна из-за тяжелой сопутствующей патологии, возраста, отказа пациентов от использования инвазивных методов обследования. Диагноз ТБ устанавливается на основании клинко-рентгенологических исследований с подтверждением роста МБТ на плотных питательных средах (золотой стандарт диагностики).

*Использование прямых (молекулярно-биологических) и непрямых (серологических) методов* в дифференциальной диагностике ТБ и других заболеваний легких, особенно онкологической природы, требует дальнейшего изучения (Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2008а,б). Внедрение молекулярно-биологических методов позволяет повысить эффективность выявления ТБ без выделения МБТ. Современным исследованием является *усовершенствованный метод ПЦР с детекцией продуктов амплификации (realtime)*. ПЦР (realtime) основана на принципе флуоресцентной детекции (гибридизации с высокоспецифичными ДНК-зондами, мечеными флуорохромами).

Как правило, при дифференциации ТБ на догоспитальном этапе и в первые дни пребывания пациентов в стационаре до начала антибактериальной терапии у пациентов проводят трехкратное исследование мокроты с бактериоскопией после окраски мазка

по Цилю — Нильсену, люминесцентную микроскопию и посев на твердую питательную среду Левенштейна — Йенсена. Одновременно выполняют однократное исследование мокроты с использованием новой молекулярно-генетической технологии ПЦР (realtime).

Использование современных молекулярно-биологических методов в диагностике МБТ актуально с учетом изменения морфологии возбудителя ТБ. Под влиянием антибактериальных препаратов, в первую очередь противотуберкулезных, как морфологические, так и физико-химические свойства МБТ изменяются. При этом кислотоустойчивость МБТ снижается, они укорачиваются, становятся похожими на коккобациллы и поэтому при окраске по Цилю — Нильсену не окрашиваются и не определяются. Персистирующие МБТ преобразуются в L-формы, которые на питательных средах не дают роста.

Как известно, к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) относятся изониазид, рифампицин, пиперазид, этамбутол и стрептомицин. Их применяют в лечении впервые выявленных больных МБТ. В группу резервных ПТП входят фторхинолоны как препараты бактериостатические, менее эффективные.

Фторхинолоны, наряду с амикацином, протионамидом, пара-аминосалициловой кислотой, циклосерином составляют резервные ПТП (Мишин В.Ю., 2008). Их применяют вместо основных ПТП при выявлении лекарственной устойчивости к ним и при развитии неустраняемых побочных явлений. В то же время при лечении пневмонии у пациентов с активацией МБТ и эмпирическом назначении фторхинолонов выделение микобактерий с мокротой может прекратиться, туберкулезный процесс становится абациллярным.

ПЦР (realtime) — высокочувствительный метод в диагностике инфильтративного, диссеминированного ТБ, туберкулом легких. Бактериоскопическими методами МБТ в мокроте при туберкуломах выявить трудно, чаще удается определить возбудителя на твердых питательных средах. В случаях дифференциации округлых образований в легких может помочь проведение однократного исследования мокроты с помощью ПЦР (realtime). Наличие или отсутствие деструкции в легких у олиго- и абациллярных пациентов и размеры полостей распада не являются решающими факторами, влияющими на чувствительность ПЦР (realtime). Выявление округлых образований в легких помогает выявить туберкулому. У большинства больных с периферическим раком и доброкачественными образованиями в легких результат ПЦР (realtime) отрицательный. Ложноположительные результаты возможны у незначительного количества пациентов.

Метод ПЦР (realtime) в несколько раз повышает эффективность диагностики олиго- и абациллярного ТБ по сравнению с люминесцентной микроскопией и посевом на питательные среды. Использование этого метода позволяет улучшить дифференциацию ТБ и онкологических заболеваний легких, в том числе при дифференциальной диагностике округлых образований.

### **Цитологический метод исследования клеточного состава плеврального выпота**

При исследовании клеточного состава плеврального выпота (ПВ) у определенной категории больных целесообразно использование *методов иммуоцитохимии*. Начинают исследование с окраски центрифугата по методу Паппенгейма с последующей микроскопией. Ядерный хроматин визуализируется окраской по Папаниколау. Для иммуоцитохимических исследований необходимы монослойные препараты клеток, которые готовятся на цитоцентрифуге. Для диагностики новообразований в случае предположения о злокачественном характере ПВ чаще используется набор маркеров,

которые включают антитела к цитокератинам (С MNF 116, С AE1/AE3), СЕА (carcinoembryonic antigen — карциноэмбриональный антиген), Вег-ЕР4, виментин, CD-15 и мезотелин (mesothelialcell НВМЕ- 1). Полученные результаты сопоставляют с гистологическим исследованием операционного материала первичной опухоли (Григорук О.Г. и соавт., 2007).

При плевритах туберкулезной этиологии в клеточном составе преобладают лимфоциты. Для исключения плеврита туберкулезного генеза проводят бактериологическое исследование осадка после центрифугирования экссудата и посева на питательные среды. При метастазах рака легкого цитологический метод выявляет комплекс клеток в виде папиллярных и железистоподобных структур. При плоскоклеточном раке в экссудате характерно наличие ракеткообразных и ладьевидных клеток. При наличии метастазов рака молочной железы в плевре опухолевые клетки образуют комплексы шаровидной формы с радиальным упорядоченным расположением однотипных опухолевых клеток.

При метастазах аденогенного рака определяются железистоподобные структуры, для которых характерна однотипность опухолевых клеток. Первичные опухоли плевры (мезотелиомы) вызывают трудности при диагностике. Клетки опухоли плевры похожи на железистый рак. Высокодифференцированная эпителиома верифицируется в виде плотных округлых однотипных образований, состоящих из мелких клеток. При эпителиальной мезотелиоме низкой дифференцировки определяется полиморфизм клеток. *Иммуноцитохимическое исследование* при мезотелиомах дает положительные результаты на мезотелин, виментин и цитокератины (С MNF116, С AE1/AE3).

*Плевральный выпот с содержанием в составе клеток >50% лимфоцитов чаще всего отмечают при туберкулезе. При этом определяются единичные мезотелиальные клетки. Диагностическую ценность цитологического исследования ПВ повышает флуороцитометрический ДНК-анализ. Этот метод целесообразно использовать в идентификации (фенотипировании) лимфоцитарных популяций в экссудате при подозрении на лимфому (Ходош Э.М., 2008). При лимфоме в ПВ определяются атипичные лимфоциты и большое количество пролиферирующих мезотелиоцитов.*

*Иммуноцитохимическое исследование* в самом простом варианте включает использование трех моноклональных антител к СЕА, В 72.3 и Leu-M1. При трактовке результатов учитываются варианты:

- положительный результат цитологического препарата получен хотя бы с двумя моноклональными антителами из трех, в этих случаях высока вероятность метастазов аденокарциномы в этиологии ПВ;
- наличие злокачественной мезотелиомы дает отрицательные результаты цитологического препарата со всеми тремя моноклональными антителами.

Иммуноцитохимическими методами признаки метастазирования в плевру у большинства пациентов при цитологическом исследовании ПВ можно определить при раке молочной железы, желудка, яичника, почки. Онкопатология других органов значительно реже обуславливает метастазирование в плевру, поэтому при цитологическом исследовании ПВ прямые и косвенные признаки опухоли не определяются. *Цитологический метод* исследования экссудата является классическим, *цитохимический и иммуноцитохимический методы* — уточняющие. Большое значение для получения монослоя клеток после центрифугирования экссудата имеет использование цитоцентрифуги.

По результатам цитологических исследований диагностика аденогенного рака легкого практически невозможна (отсутствуют патогномонические признаки). Возможна цитологическая диагностика плоскоклеточного и мелкоклеточного рака легких, молочной железы, желудка, яичника, почки. Цитохимические окраски на гликоген и слизь используются в диагностике мезотелиомы плевры. *Имуногистохимические исследования на виментин, цитокератины, мезотелин используются в диагностике мезотелиомы (цитологический препарат дает положительный результат со всеми тремя моноклональными антителами). При метастазах аденокарциномы в плевре получают отрицательный результат с этими моноклональными антителами.*

## Список литературы:

1. **Глаголев Н.А.** (2007) Комплексная (КТ, УЗИ) диагностика пристеночных образований грудной полости. Пульмонология, 5: 114–120.
2. **Григорук О.Г., Лазарев А.Ф., Базулина Л.М.** (2007) Диагностическая ценность цитологического метода при исследовании клеточного состава плевральной жидкости. Пульмонология, 3: 66–71.
3. **Мишин В.Ю.** (2008) Химиотерапия туберкулеза легких. Пульмонология, 3: 5–14.
4. **Петренко В.И. (ред.)** (2006) Фтизиатрия: Учебник. Нова Книга, Винница, 503 с.
5. **Салина Т.Ю., Морозова Т.И.** (2008а) Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени в диагностике туберкулеза легких. Проблема туберкулеза и болезней легких, 6: 12–14.
6. **Салина Т.Ю., Морозова Т.И.** (2008б) Современные технологии лабораторной диагностики туберкулеза (эффективность использования в клинической практике). Проблемы туберкулеза и болезней легких, 11: 42–44.
7. **Фещенко Ю.І., Мельник В.М.** (2007). Контроль за туберкульозом в умовах адаптованої ДОТС-стратегії. Медицина, Киев, 474 с.
8. **Харрис Э., Махер Д., Грехем С.** (2006) ТБ/ВИЧ: Клин. руковод., 2-е доп. изд. Весь Мир, Москва, 223 с.
9. **Ходош Э.М.** (2010) Внебольничная пневмония: ключи к пониманию тактики ведения и безуспешной антибактериальной терапии. Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология, 1(30): 50–55.
10. **Ходош Э.М.** (2008) Этиология плеврального выпота: диагностический алгоритм. Пульмонология, 5: 114–118.