

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ

Тошева Дилноза Рахматовна <https://orcid.org/0000-0003-1991-7444>

Аннотация: известно, что для получения достоверных результатов и обоснованных выводов по выполненной научно-исследовательской работе должен быть собран достаточный объём клиничко-лабораторного материала, выбраны современные методы исследования, объект и предмет исследования, использован адекватный метод статистического анализа полученного материала. Кроме того, исследования должны быть рандомизированными, а группы исследования репрезентативны между собой. Только в таких случаях можно получить достоверные результаты, которых можно будет внедрить в практику здравоохранения.

MATERIAL AND METHODS OF RESEARCH FOR THE STUDY OF MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF PULMONARY TUBERCULOSIS

Tosheva Dilnoza Rakhmatovna <https://orcid.org/0000-0003-1991-7444>

Abstract: It is known that in order to obtain reliable results and justified conclusions on the completed research work, a sufficient volume of clinical and laboratory material should be collected, modern research methods, the object and subject of the study should be selected, an adequate method of statistical analysis of the obtained material should be used. In addition, the studies should be randomized, and the study groups should be representative of each other. Only in such cases can reliable results be obtained, which can be implemented in health care practice.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, штамм, Левенштейна-Йенсена, Циля-Нильсена, рифампицин, культура, мокрота.

В связи с этим в данной главе мы сочли необходимым привести полное описание клинического материала и современных методов исследования.

На этапе выполнения исследования были получены биологические материалы от больных туберкулезом (первичный и вторичный туберкулез) – кровь и сыворотка крови, анализированы медицинские документы этих больных. Для соблюдения принципа рандомизации все больные были выбраны случайно (случайная выборка), при составлении групп исследования использовали метод репрезентативности исследований. Кроме того, при выполнении медико-биологических исследований соблюдены принципы доказательной медицины, а при привлечении людей на медицинские исследования соблюдали требования Хельсинской Декларации Всемирной медицинской ассоциации, принятой в 1964 году в Хельсинки (последнее дополнение в 2013 году в Форталезе, Бразилия). После выполнения достаточного объема исследования сбор материала прекратили и подготовили первичный материал для статистического анализа.

На завершающей стадии исследования собранный материал был подвергнут статистической обработке, после этого на основе полученных данных составлены таблицы и диаграммы с их последующим описанием.

Материалы и методы: обращает на себя внимание большое количество пенсионеров ($60,54 \pm 4,03\%$), временно не работающих ($14,97 \pm 2,94\%$) и домохозяек ($14,97 \pm 2,94\%$) среди больных туберкулезом. В первом случае это пенсионеры по возрасту, что означает успешное лечение данного недуга и увеличении продолжительности жизни пациентов. Во втором случае, в связи с заболеванием у больных возникают трудности с трудоустройством. В третьем случае имеет место быть заражение туберкулезом от членов семьи данных женщин. Эти причины и являются наличием такой большой доли данных социальных категорий людей, заболевших туберкулезом.

Таблица 1.1

Распределение больных туберкулезом по социальному положению

Социальное положение	Количество больных
----------------------	--------------------

	Абс	%
Пенсионеры	89	60,54±4,03
Временно безработные	22	14,97±2,94
Домохозяйки	22	14,97±2,94
Рабочие	9	6,12±1,98
Учитель	1	0,68±0,67
Воспитатель	1	0,68±0,67
Студент	1	0,68±0,67
Военный	1	0,68±0,67
Медицинская сестра	1	0,68±0,67

Важным моментом для анализа полученных результатов является и инфицирование больного. При первичном выявлении данной патологии описывается как «первичный туберкулез», а при рецидиве заболевания как «вторичный туберкулез» (рис. 1.1). Вторичный туберкулез был диагностирован после длительной ремиссии.

По рис. 1.1 видно, что первичный туберкулез встречается чаще, чем вторичный в 3,59 раза ($P<0001$), что свидетельствует о том, что фтизиатрам приходится в основном работать с данными больными. В связи с большой разницей в инфицированности и патогенезе заболевания мы использовали это распределение и при изучении иммунологических аспектов данной патологии.

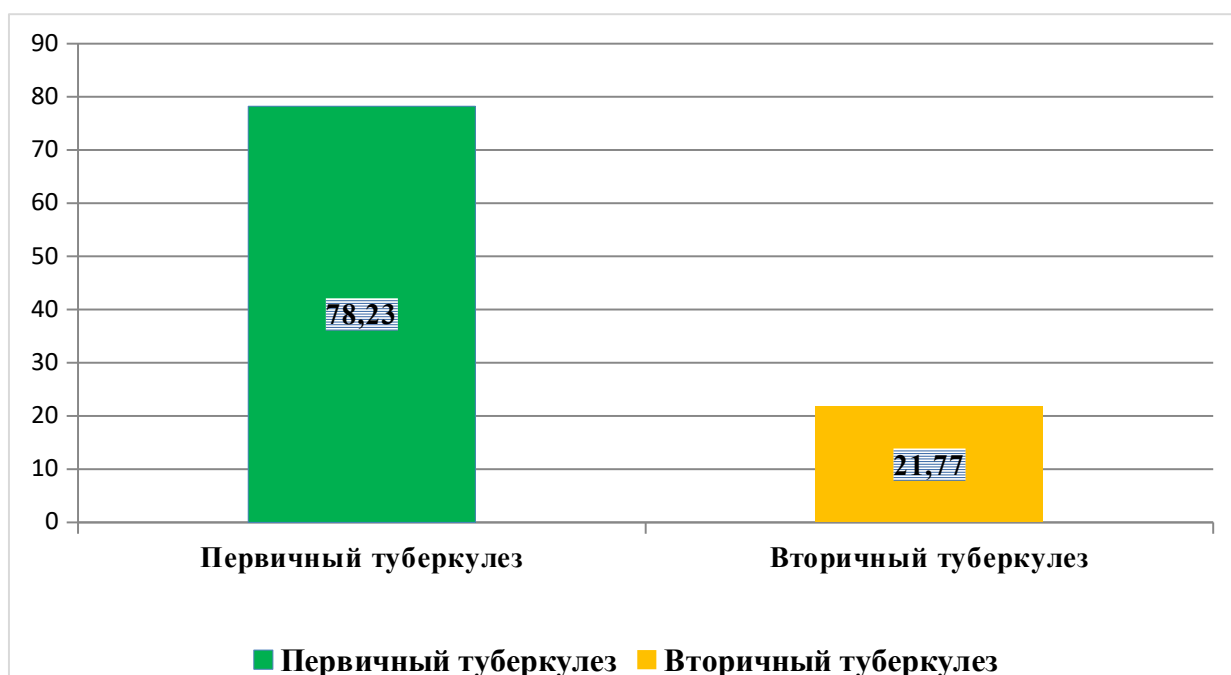


Рис. 1.1 Распределение обследованных больных туберкулезом по степени инфицированности, %

Важное значение в течение заболевания играет и высеваемость возбудителя туберкулеза - *Mycobacterium tuberculosis* бактериологическими методами. В нашем случае у 136 больных ($92,52 \pm 2,17\%$) высеян *Mycobacterium tuberculosis*, а в 11 случаях ($7,48 \pm 2,17\%$) возбудители бактериологическими методами высеять не удалось.

Кроме того, локализация патологического очага также имеет большое значение, так как расположение патологического процесса определяет тактику лечения больных. В 134 случаях ($91,16 \pm 2,34\%$) патологический очаг расположился в легких, а в 13 случаях ($8,84 \pm 2,34\%$) в других органах обследованных пациентов.

Известно, что основной причиной отсутствия высокой эффективности лечения больных туберкулезом является появление лекарственно устойчивых штаммов возбудителей. В связи с этим мы проводили распределение высеянных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* ($n=136$) по лекарственной устойчивости. Из приведенных данных в таблице 1.2 видно, что у большинства штаммов отмечалась лекарственная чувствительность к

препаратам первого и второго ряда для лечения туберкулеза ($72,11 \pm 3,70\%$, $n=106$), но в 4 случаях ($2,72 \pm 1,34\%$) определить лекарственную чувствительность не удалось. Однако в остальных случаях отмечалась лекарственная устойчивость к препаратам для лечения туберкулеза ($25,17 \pm 3,58\%$, $n=37$). Если моно-ЛУ-ТБ отмечали в $8,16 \pm 2,26\%$ ($n=12$) случаев, то МЛУ, ПЛУ и ШЛУ отмечали соответственно в $11,56 \pm 2,64\%$ ($n=17$), $2,72 \pm 1,34\%$ ($n=4$) и $2,72 \pm 1,34\%$ ($n=4$) случаев.

Таблица 1.2

Распределение высеянных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* по устойчивости к лекарственным препаратам

Чувствительность к лекарственным препаратам	Количество штаммов	
	абс	%
Лекарственно-чувствительный туберкулёз ЛЧ-ТБ	106	$72,11 \pm 3,70$
Моно резистентный туберкулез Моно-ЛУ-ТБ	12	$8,16 \pm 2,26$
Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью МЛУ-ТБ	17	$11,56 \pm 2,64$
Туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью ШЛУ-ТБ	4	$2,72 \pm 1,34$
Поли-лекарственно устойчивый туберкулез ПЛУ-ТБ	4	$2,72 \pm 1,34$
Неопределенный	4	$2,72 \pm 1,34$
Всего	147	100,0

Таким образом, каждый четвертый штамм ($n=41$) возбудителя туберкулеза обладал лекарственной устойчивостью (Моно-ЛУ-ТБ, МЛУ-ТБ, ШЛУ-ТБ, ПЛУ-ТБ), что осложняло лечение данной патологии.

Параллельно с клинико-лабораторными исследованиями была исследована мокрота больных. Установлено, что бактериоскопическим методом получены 53 положительных результата ($36,05 \pm 3,96\%$), с помощью метода GeneXpert

получены 133 ($90,48 \pm 2,42\%$), а с помощью ТЛЧ получены 99 положительных результатов ($67,35 \pm 3,87\%$). Данные результаты помогли подтвердить клинический диагноз туберкулеза и его чувствительность к лекарственным препаратам.

Давность заболевания также имеет значение для адекватного лечения туберкулезной инфекции, в связи с этим нами приведены давности заболевания туберкулезом обследованных больных (табл. 1.3).

Таблица 1.3

Сравнительные параметры давности заболевания туберкулезом обследованных больных

Давность	Количество больных	
	абс	%
До 1 месяца	11	$7,48 \pm 2,17$
от 1 до 3 месяцев	84	$57,14 \pm 4,08$
от 3 до 6 месяцев	16	$10,89 \pm 2,57$
от 6 до 12 месяцев	20	$13,61 \pm 2,83$
от 1 года до 5 лет	8	$5,44 \pm 1,87$
5 лет и более	8	$5,44 \pm 1,87$

Большинство больных, как указано в табл. 1.4, обращались за медицинской помощью до 3 месяцев - соответственно до 1 месяца ($7,48 \pm 2,17\%$, $n=11$) и от 1 до 3 месяцев ($57,14 \pm 4,08\%$, $n=84$), так как большинство больных имело первичный туберкулез.

Все диагнозы туберкулеза лёгких были подтверждены не только бактериологически, но и рентгенографией, которую прошли все больные. В связи с тем, что эти инструментальные исследования не входили в цели и задачи нашего диссертационного исследования, мы сочли целесообразным не приводить эти данные.

Анализируя все клинические, рентгенологические, бактериологические параметры всем больным, были верифицированы окончательные диагнозы лечащими врачами-фтизиатрами.

Все диагнозы были верифицированы на основании Международной Классификации Болезней 10-пересмотра (МКБ-10). Полученные результаты приведены на табл. 1.4.

Таблица 1.4

Показатели окончательных диагнозов обследованных больных туберкулезом

Диагнозы	Количество диагнозов	
	абс	%
Инфильтративный туберкулез	114	77,55±3,44
Кавернозный туберкулез	7	4,76±1,76
Туберкулёма	6	4,08±1,63
Цирротический туберкулез	4	2,72±1,34
Плеврит	4	2,72±1,34
Диссеминированный туберкулез	3	2,04±1,17
Экссудативный плеврит	3	2,04±1,17
Бронхиальный туберкулез	2	1,36±0,96
Туберкулез молочной железы	2	1,36±0,96
Туберкулез лимфоузлов	2	1,36±0,96

Основной формой туберкулеза лёгкого является инфильтративный туберкулез (77,55±3,44%, n=114), что подтверждается и другими исследователями. Другие формы встретились сравнительно редко (1,36-4,76%). Кроме сопутствующих заболеваний у обследованных больных выявлены и осложнения данной патологии, которые приведены на рис. 1.2.

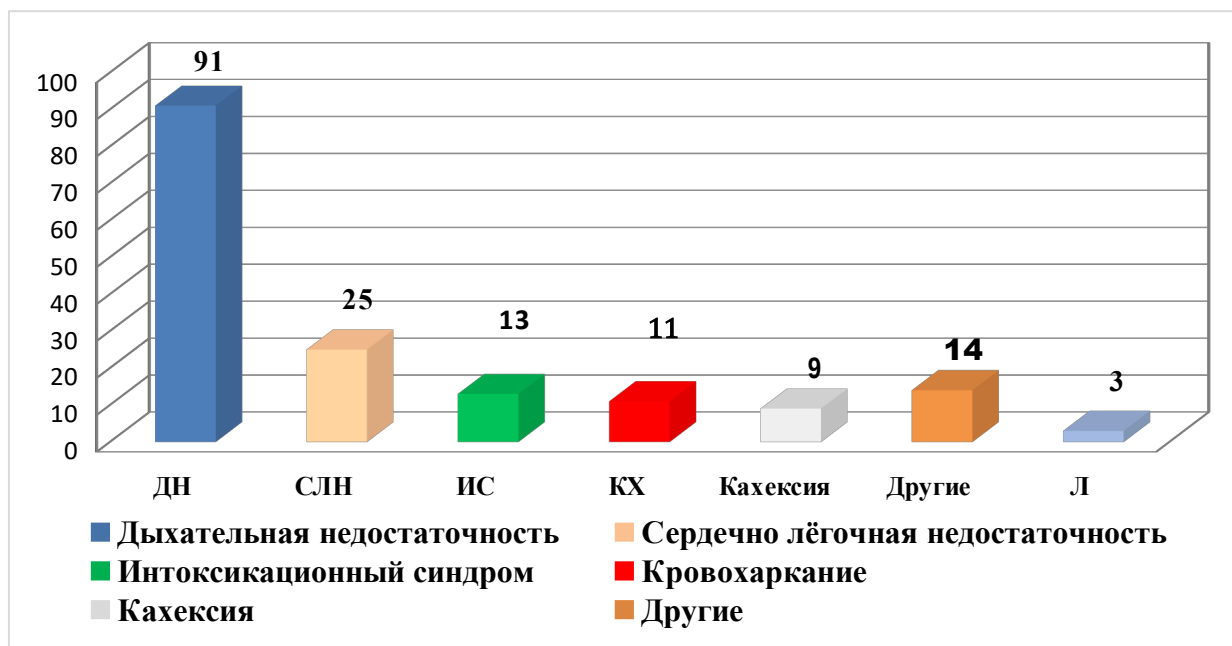


Рис. 1.2 Сравнительные параметры выявленных осложнений у больных туберкулезом

Выявленные осложнения усугубляют течение и прогноз исхода данной патологии у обследованных больных, видно, что осложнения в основном связаны с дыхательной и сердечно сосудистой системами.

Результаты и обсуждение: культуральный метод считается золотым стандартом диагностики туберкулёза и обязательно проводится межрегиональной бактериологической лабораторией БцФП. Для подтверждения диагноза туберкулёз необходимо выделить культуру *Mycobacterium tuberculosis* на искусственной питательной среде и идентифицировать её. Стандартной средой для выделения возбудителя туберкулёза при рутинных исследованиях является плотная питательная среда Левенштейна-Йенсена. Все работы проводили со строгим соблюдением правил техники и биологической безопасности при работе с заразным материалом. Пробирку с засеянной культурой ставили в термостат в горизонтальном положении на сутки, при температуре 37°C для того чтобы распределенный по всей поверхности скошенного агара материал с подозрением на наличие микобактерий, в случае чего могли дать успешный

рост. После истечения одних суток пробирку ставили в вертикальное положение при заданной вышеуказанной температуре, сроком до 56 дней. При отсутствии видимого роста колоний после 56 дней выдавали отрицательный результат.

Методы исследования мокроты

Свежевыделенную мокроту объемом от 10 до 15 мл поместили в узкогорлую ёмкость и добавили 0,5% раствора NaOH, полученный состав активно встряхивали около 15 минут. Добавили 1 мл ксилола и 10 мл дистиллированной воды для разбавления мокроты, снова встряхнули 15 минут, затем добавили дистиллированную воду, в том количестве, чтобы уровень жидкости поднялся до горлышка бутылки, и оставили стоять в течение 60 минут. Через час наблюдали образовавшийся белесого цвета слой на поверхности ёмкости, данный налёт сняли при помощи пипетки и нанесли на стерильные предметные стекла для последующей микроскопии.

Бактериоскопический метод

При бактериоскопическом методе все манипуляции с биоматериалом проводились в зоне BSL-3, исследования проходили в биологическом ламинарном шкафу «Labogene Scanlaf Mars Pro» (Дания). Из РР пробирки с доставленным биоматериалом от пациентов, одноразовой пластиковой бактериологической петлей производился мазок на центр предметного стекла размеров 2 x 1 см. Использовали унифицированный метод окраски по Циль-Нильсену. Окраска по Циль-Нильсену заключалась в следующих этапах.

1. Вначале на фиксированный препарат наносили фуксин Циля, для улучшения результата на предметное стекло предварительно помещали фильтровальную бумагу. Затем при помощи пинцета удерживая стекло, подносили препарат к пламени горелки и удерживали в непосредственной близости от пламени до отхождения паров. После добавляли новую порцию красителя и проделывали прежнее действие 2 раза. Закончив с окраской, охлаждали, снимали бумагу и промывали препарат дистиллированной водой.

2. Препарат обесцвечивали 5% раствором H_2SO_4 , наливая кислоту на стекло, затем несколько раз промывали водой.

3. Окрашивали водно-спиртовым раствором метиленового синего в течение 3-5 мин, промывали водой и высушивали. После чего микроскопировали препарат с помощью оптического микроскопа.

Положительный результат наблюдался в случае обнаружения в поле зрения палочковидных бактерий, окрашенных красным цветом, на наличие посторонних микроорганизмов указывает синий цвет.

Выводы: молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза методом Xpert MTB/Rif Ultra является на сегодняшний день наиболее точным и совершенным методом диагностики данной патологии. При данном методе важно соблюдать определенную последовательность. При работе устройство GeneXpert было обязательно подключено к компьютеру, на котором были установлена рабочая программа GeneXpert Dx System. Заранее подготовленный картридж со штриховым кодом и заполненный диагностируемой мокротой больного сканировался, после чего на экране компьютера появлялось окно проведения теста.

Программное обеспечение, используя информацию штрихового кода, автоматически заполняло следующие поля: вид анализа, номер партии реагента, номер серии картриджа и дату истечения срока годности и т.д. При желании можно было дополнять информационные строки, к примеру, информацию об исследуемом образце, мокрота или седимент мокроты. Далее кликая на кнопку на экране монитора Start Test (начать тест), мы ждали появления мигания зеленым светом модуля аппарата и только после этого загружали в него картридж. Закрыв дверцу модуля с картриджем, отмечали, что зеленая индикаторная лампочка переставала мигать, что свидетельствовало о начале тестирования. По окончании теста индикаторная лампочка гасла, после чего мы вынимали картридж и отправляли его в пакет для отходов.

Все манипуляции с картриджем проводились в перчатках. При внесении биоматериала в картридж проводили следующие действия. Открывали крышку контейнера и вносили с образцом биоматериала и вносили туда реагент для образца, в соотношении 1:2 (например, 2 мл образца + 4 мл реагента). Закрывали крышку контейнера и встряхивали его на вортексе в течение 20-30 секунд, после чего оставляли образец на рабочем столе на 10 минут. После вновь подвергали образец встряхиванию на вортексе и повторно оставляли на рабочем столе на 5 минут. После вышеуказанной процедуры, открывали картридж и при помощи одноразовой 2 мл пипетки вносили обработанный образец в открытое гнездо картриджа, затем закрывали крышку картриджа до характерного щелчка.

Результат тестирования отображался черным шрифтом на зеленом фоне, если результат MTB + Rif S (обнаружены микобактерии туберкулеза, устойчивость к рифампицину не обнаружена) или на красном фоне, если результат MTB + Rif R (обнаружены микобактерии туберкулеза, устойчивость к рифампицину обнаружена). А также черным шрифтом на желтом фоне в результате ошибки тестирования. При неопределенном или недействительном результате появлялась надпись черного цвета на сером фоне. Результаты вносились в лабораторный журнал, электронную базу данных Access, а также в бланк направления больного.

Список литературы / References

1. Тошева Д. Р. Распространенность туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя// *Infeksiya, immunitet va farmakologiya*.2024 №5.C.165-171.
2. Tosheva D.R .Prevalence of extensively drug-resistant tuberculosis //Gumanitar va tabiiy fanlar jurnali 2024-№12.C.117-121.
3. Tosheva D.R. Sil kasalligida yallig'lanish jarayonining turli shakllarida immunologik parametrlarning o'zgarishi //Tibbiyotda yangi kun.2024 №11 (73).C. 148-152

4. Тошева Д.Р. Лечение лекарственно-устойчивого туберкулеза позвоночника с помощью сочетания хирургического вмешательства и индивидуальной химиотерапии //Тиббиётда янги кун2023№10 (60).С.369-372.
5. ToshevaD.R. Causal Relationship of Immuno-Microbiological Parameters in Tuberculosis With Multiple and Broad Drug Resistance. International journal of health systems and medical sciences 2.5 2023.С.259-262.
6. Tosheva.D.R. Features of Drug Resistance of the Causative Agent of Tuberculosis in Modern Conditions //Amaliy va tibbiyot fanlari ilmiy jurnali. 2023.№. 4. – С. 59-63.
7. Тошева Д. Р. Особенности Лекарственной Устойчивости Возбудителя Туберкулеза В Современных Условиях //Amaliy va tibbiyot fanlari ilmiy jurnali. 2023. №. 2. С. 52-58.
8. Tosheva.D.R. Isoniazid-Resistant Mycobacterium Tuberculosis: Frequency of Detection, Resistance Spectra and Genetic Determinants of Resistance//American Journal of Pediatric Medicine and Health Sciences 2023№8.С.47-51
9. Tosheva.D.R. Evaluation of the Effectiveness of Vaccination for the Prevention of Tuberculosis in Children//Amaliy va tibbiyot fanlari ilmiy jurnali. 2023. №10. С.114-119.