

Теоретическое учебное пособие для проведения курсов обучения:
«Выявление туберкулеза методом микроскопии», «Культуральные методы диагностики туберкулеза»

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Эпидемиология туберкулеза.
Характеристика возбудителя туберкулеза.
Лабораторные методы диагностики
туберкулеза



Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Центральный НИИ туберкулеза РАМН

Фонд «Российское здравоохранение»

Москва 2008

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Центральный НИИ туберкулеза РАМН

Фонд «Российское здравоохранение»

Рекомендуется
Учебно-методическим объединением по медицинскому
и фармацевтическому образованию вузов России
в качестве учебного пособия для системы послевузовского
профессионального образования врачей.
УМО-107
08.02.07

Микробиологические методы диагностики ТУБЕРКУЛЕЗА

Эпидемиология туберкулеза.
Характеристика возбудителя туберкулеза.
Лабораторные методы диагностики
туберкулеза

Теоретическое учебное пособие
для проведения курсов обучения:

*«Выявление туберкулеза методом микроскопии»,
«Культуральные методы диагностики туберкулеза»*



УДК 616-002.5-078(078)

ББК 55.4:52.64я75

М59

Учебное пособие подготовили:

- В.В. Ерохин** чл.-корр. РАМН, профессор, председатель Тематической рабочей группы «Лабораторная диагностика туберкулеза» при РГБУ, директор ГУ ЦНИИТ РАМН;
- В.И. Голышевская** доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН;
- Э.В. Севастьянова** кандидат технических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии ЦНИИТ РАМН;
- М.В. Шульгина** доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела стандартизации и контроля качества клинических лабораторных исследований ГНИЦ ПМ.

М59

- М59** **Микробиологические методы диагностики туберкулеза: Эпидемиология туберкулеза. Характеристика возбудителя туберкулеза. Лабораторные методы диагностики туберкулеза:** Теоретическое учебное пособие для проведения курсов обучения: «Выявление туберкулеза методом микроскопии», «Культуральные методы диагностики туберкулеза». – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 40 с.
ISBN 978-5-94789-276-5

ББК 55.4:52.64я75

Настоящее учебное пособие разработано и издано по инициативе и при технической и финансовой поддержке Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и при поддержке Агентства США по международному развитию (USAID).

ISBN 978-5-94789-276-5

© Оформление ООО «Издательство «Триада», 2008



Предисловие	4
Список сокращений и основные понятия.....	5
1. Туберкулез как инфекционное заболевание.	
Эпидемиология туберкулеза	
1.1. История туберкулеза как инфекционного заболевания.....	6
1.2. Эпидемиология туберкулеза.....	10
2. Стратегии борьбы с туберкулезом	
3. Характеристика возбудителя туберкулеза	
3.1. Свойства возбудителя туберкулеза	17
3.2. Таксономия микобактерий.....	20
4. Лабораторная диагностика туберкулеза	
4.1. Характеристика диагностических методов	22
4.2. Микробиологические методы диагностики туберкулеза.....	23
4.2.1. Методы микроскопического исследования.....	24
4.2.2. Роль микроскопических исследований для выявления туберкулеза.....	32
4.2.3. Культуральные методы.....	33

Предисловие

В рамках реализации Фондом «Российское здравоохранение» Проекта «Профилактика, диагностика, лечение туберкулеза и СПИДа, компонент «туберкулез», финансируемого из средств займа МБРР, а также Программы Глобального фонда «Развитие стратегии лечения населения РФ, уязвимого к туберкулезу» был подготовлен комплект учебных материалов, предназначенных для проведения курсов обучения специалистов по лабораторной диагностике туберкулеза.

Набор учебных материалов для проведения курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии» включает в себя базовый модуль по микроскопии, рабочую тетрадь для слушателя курса, теоретическое учебное пособие и методическое руководство для преподавателей.

Теоретическое учебное пособие «Микробиологические методы диагностики туберкулеза» предназначено в первую очередь для проведения курса обучения «Выявление туберкулеза методом микроскопии». Помимо этого, указанное теоретическое учебное пособие также может быть использовано при проведении курса обучения «Культуральные методы диагностики туберкулеза».

Теоретическое учебное пособие «Микробиологические методы диагностики туберкулеза» включает в себя основные положения, касающиеся эпидемиологии туберкулеза и стратегий борьбы с туберкулезом, содержит краткую характеристику возбудителя туберкулеза и описание лабораторных методов диагностики туберкулеза. В пособии изложены основные теоретические аспекты микроскопического исследования для выявления кислотоустойчивых бактерий.

Теоретическое учебное пособие предназначено главным образом для специалистов лабораторной службы с высшим образованием – врачей-бактериологов и врачей клинической лабораторной диагностики специализированных противотуберкулезных учреждений РФ, а также врачей клинической лабораторной диагностики общей лечебной сети. Данное пособие также может быть полезным для преподавателей, проводящих курсы обучения лабораторных специалистов микробиологическим методам диагностики туберкулеза.

Теоретическое учебное пособие «Микробиологические методы диагностики туберкулеза» было обсуждено на заседании Тематической рабочей группы «Лабораторная диагностика туберкулеза» при Рабочей группе высокого уровня МЗ СР РФ (председатель ТРГ – член-корреспондент РАМН, профессор В.В. Ерохин) и рекомендовано к использованию при подготовке лабораторных специалистов.

Разработчики учебного пособия выражают глубокую благодарность за высказанные замечания и пожелания всем членам ТРГ «Лабораторная диагностика туберкулеза», а также российским и зарубежным экспертам и специалистам, принимавшим участие в рецензировании и обсуждении настоящего учебного пособия.

Разработчики учебного пособия также выражают глубокую благодарность за оказанную помощь и техническую поддержку в подготовке учебного пособия специалистам ВОЗ – В. Якубовяку, Е.Д. Юрасовой, К.Ю. Малахову, Л.Н. Рыбке.

Особую признательность составители учебного пособия выражают лабораторному специалисту ВОЗ Д. Заллокко за консультативную и техническую помощь в подготовке учебного пособия, а также рецензенту ВОЗ, заведующей референс-лабораторией Литвы А. Сосновской за сделанные исправления и рекомендации.

Список сокращений и основные понятия

- ТБ** – туберкулез
- КУМ** – кислотоустойчивые микобактерии
- МБ** – микобактерии
- МБТ** – микобактерии туберкулеза
- УФ** – ультрафиолетовый свет (лампа)
- КДЛ** – клинико-диагностическая лаборатория
- ОЛС** – общая лечебная сеть
- ЛУ** – лекарственная устойчивость
- МЛУ** – множественная лекарственная устойчивость – устойчивость к изониазиду и рифампицину или к изониазиду и рифампицину и другим противотуберкулезным препаратам

1 Туберкулез как инфекционное заболевание. Эпидемиология туберкулеза

1.1. История туберкулеза как инфекционного заболевания

Туберкулез известен человечеству с древнейших времен. Это заболевание было широко распространено во всем мире и являлось одной из основных причин высокой смертности населения.

Если число жертв является показателем значимости болезни, тогда все болезни, особенно наиболее опасные инфекции – такие, как бубонная чума, азиатская холера и др., должны остаться далеко позади туберкулеза.

Роберт Кох, 1882

Начало туберкулезной инфекции следует искать в той эпохе глубокой древности, когда люди начали жить в более компактных социальных группах. На костных останках древних людей сохранились ясные следы туберкулезных поражений. Данные египтологии показывают, что туберкулез в Древнем Египте имел широкое распространение среди населения и считался болезнью, характерной для бедных людей, и в особенности для порабощенных народов. От Древнего Египта сохранились до нашего времени мумии со следами туберкулеза позвоночника. В Китае туберкулез в качестве самостоятельной болезни был известен уже в VI веке до нашей эры.

Догадки об инфекционном характере туберкулеза также восходят к древности. В сборнике законов Ману (1400 лет до н. э.) имеются данные о наблюдениях, указывающих на то, что туберкулез передается от человека человеку.

В древний период истории медицины клинические признаки туберкулеза не были уточнены. Не было и термина «туберкулез». Болезненный процесс, который в настоящее время называется туберкулезом, входил в общее понятие о чахотке, сухотке (больной со дня на день все более худел, истощался, терял силу). Несмотря на это, было дано довольно четкое описание клинической картины туберкулеза легких. Наиболее полное учение о чахотке принадлежало Галену. Он объяснял изменения в легких воспалительным процессом, который, в свою очередь, обуславливается порочным смешением соков организма. При этом в легких образуются нарывы, после опорожнения которых остаются трудно заживающие полости. Полость зарубцуеться только в том случае, когда ее стенки перестанут выделять гной.

В средние века продолжались исследования, связанные с изучением туберкулеза и его инфекционной природы. Наибольший вклад принадлежит итальянскому ученому Джероламо Фракастро (1546), который даже пытался рекомендовать меры обеззараживания в отношении этой болезни.

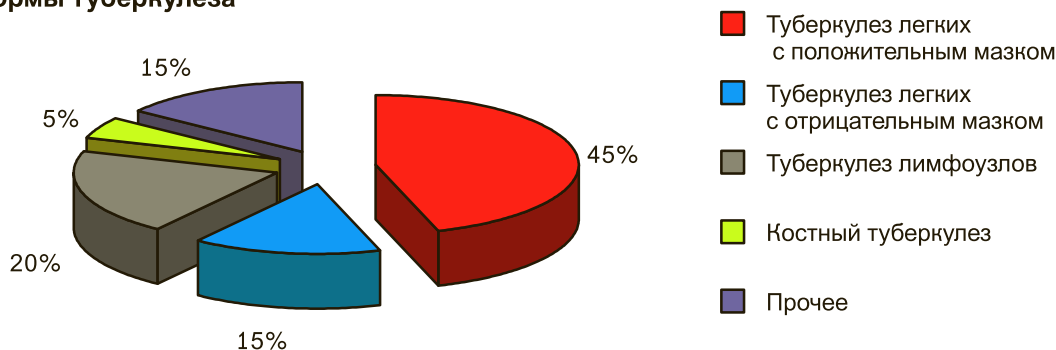
Инфекционный характер туберкулеза был весьма убедительно доказан французским ученым Villemin (1865), который своими опытами неопровержимо доказал, что туберкулез является инфекционным заболеванием, а также и то, что туберкулез у людей и у животных – это одна и та же болезнь, вызываемая одним и тем же возбудителем. В дальнейшем это было подтверждено многими исследователями.

На основе множества опытов и наблюдений и опираясь на работы многих исследователей туберкулеза, 24 марта 1882 г. немецкий ученый Роберт Кох обнаружил возбудителя туберкулеза.

Открытие Кохом возбудителя болезни – микобактерии туберкулеза – вызвало большое количество исследований морфологических, биологических и патогенных свойств возбудителя и положило начало новому этапу в изучении туберкулеза, а также и в борьбе с ним. Путем многочисленных экспериментов были изучены пути проникновения микобактерий в организм человека. Входными воротами туберкулезной инфекции являются дыхательные пути, т. е. основной путь распространения – воздушно-капельный, или как сейчас принято говорить – аэрозольный. Но есть опасность заражения энтерально (через желудочно-кишечный тракт), а также через поврежденную кожу и слизистые оболочки, из чего следует необходимость гигиены среды обитания (Хоменко, Рабухин и др.).

Итак, туберкулез является инфекционным заболеванием, вызываемым микобактериями туберкулезного комплекса. Микобактерии способны поражать любой орган, однако чаще всего заболевание имеет легочную локализацию (рис. 1). Туберкулез легких чаще других форм туберкулеза приводит к смерти пациента.

Формы туберкулеза

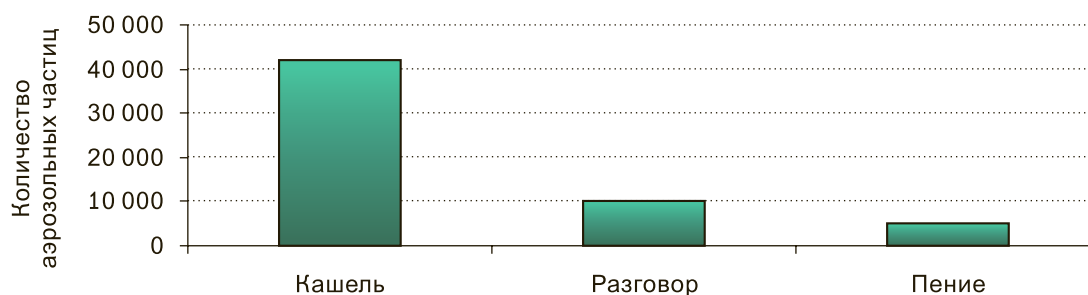


Формы туберкулеза

Рис. 1

(По данным Rieder H.L. *Tubercule* 1985; 66: 179–186)

Несмотря на то что известны случаи энтерального заражения туберкулезом и заражения через поврежденные кожные покровы и слизистые оболочки, основным путем распространения инфекции является воздушно-капельный путь. Больные туберкулезом с бактериовыделением образуют при кашле, разговоре или пении аэрозоль с инфицирующим агентом – микобактерией туберкулеза в аэрозольном ядре (рис. 2).



Образование аэрозоля при кашле, разговоре, пении
(Loudon R.G. et al. *Am Rev Respir Dis* 1968; 98: 297–300)

Рис. 2

Образовавшиеся аэрозольные частицы имеют различные размеры. Наиболее крупные быстро оседают. Частицы размером 5 мкм, содержащие в себе возбудитель инфекции, могут сохраняться во взвешенном состоянии несколько часов. При вдыхании они проникают в глубокие отделы легких через мелкие бронхи, и содержащиеся в них микобактерии могут, внедрившись в легочную ткань, образовать первичный очаг заболевания.

Один бациллярный больной за год может инфицировать около 10 человек. При средней продолжительности жизни такого больного, в случае отсутствия лечения в течение двух лет, он инфицирует до 20 человек и более. Риск инфицирования зависит от:

- массивности бактериовыделения у больного;
- времени контакта с больным;
- близости контакта и объема помещения, в котором происходит контакт с бациллярным больным.

Наиболее опасными с точки зрения инфицирования окружающих являются пациенты с бактериовыделением, выявляемым методом микроскопии мазков мокроты (рис. 3).

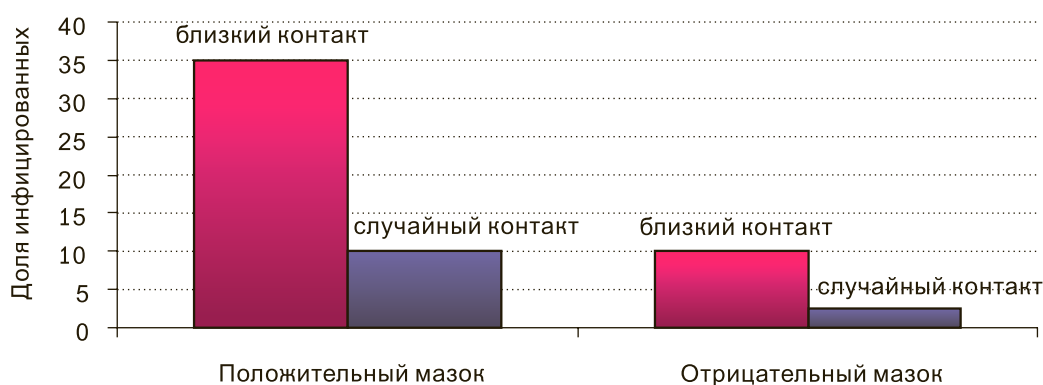


Рис. 3 Инфицирование детей в зависимости от типа контакта и бактериологического статуса больного. Британская Колумбия и Саскатчван (Канада), 1966–1971 (Gizyowski S. et al. Bull Int Union Tuberc 1975; 50: 90–106)

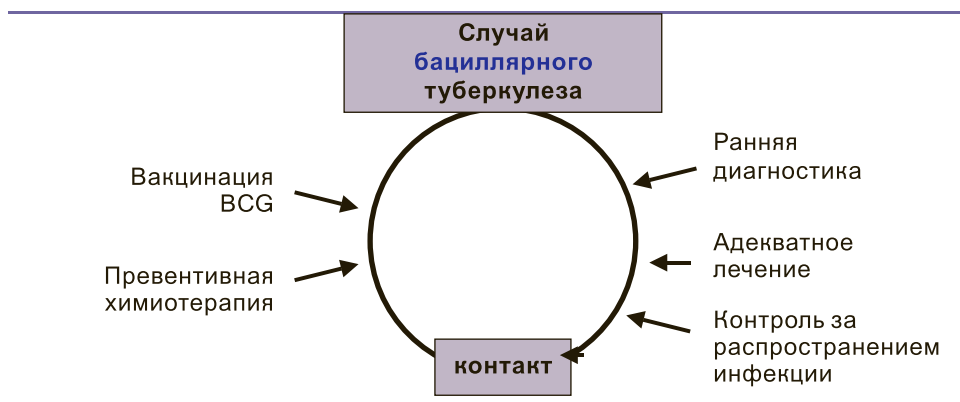
В цепи распространения туберкулеза первым этапом является передача инфекции от бациллярного больного здоровому человеку при близком контакте. На этом этапе передачу инфекции может предотвратить раннее выявление и эффективное лечение бациллярного больного, а также эффективные санитарно-эпидемические меры, предотвращающие распространение инфекции (рис. 4).

Однако заболевание развивается не у всех инфицированных туберкулезом. Человек, инфицированный микобактериями туберкулеза, имеет так называемый латентный туберкулез. При этом туберкулезом заболевают приблизительно 10% инфицированных, из них 5% – в течение первых 2 лет после инфицирования, другие 5% – в течение всей оставшейся жизни.

Факторами, увеличивающими вероятность развития заболевания, являются время, прошедшее с момента инфицирования, а также иммунный статус инфицированного, в том числе наличие ВИЧ-инфекции.

К другим факторам риска развития заболевания относятся:

- возраст;
- пол;
- недостаточность питания;
- сопутствующие заболевания (силикозы, диабет и другие);



Цепь передачи инфекции

Рис. 4

- генетическая предрасположенность;
- наличие постоянного контакта с бациллярным больным туберкулезом;
- отсутствие у инфицированного химиопрофилактики.

Вакцинация BCG и/или превентивная химиотерапия не защищают человека от инфицирования, но снижают риск возникновения или тяжесть протекания заболевания (рис. 4).

Наличие ВИЧ-инфекции значительно увеличивает риск развития заболевания туберкулезом у человека, инфицированного микобактериями туберкулеза. Если среди ВИЧ-негативных, инфицированных туберкулезом, заболевание развивается в 5–10% случаев на всем протяжении жизни, то у ВИЧ-положительных, инфицированных туберкулезом, этот показатель достигает 60% (в течение жизни) или 5% в год (*Sutherland I. Br Comm Dis Rep 1990: 10*).

Распространение ВИЧ-инфекции в значительной степени способствует росту эпидемии туберкулеза. Влияние распространения ВИЧ-инфекции на эпидситуацию по туберкулезу может быть прямым или опосредованным.

Прямое влияние заключается в следующем:

- активация/реактивация туберкулезной инфекции в случае заражения, предшествовавшего заражению ВИЧ;
- прогрессирование заболевания туберкулезом в случае, когда заражение произошло после инфицирования ВИЧ.

Опосредованное влияние состоит в передаче туберкулезной инфекции членам общества, не инфицированным ВИЧ (*Sutherland I. Br Comm Dis Rep 1990: 10*).

Открытие в 40-х гг. XX столетия противотуберкулезных препаратов дало надежду на победу над этим тяжелым заболеванием. Действительно, применение химиотерапии позволило снизить смертность и заболеваемость от туберкулеза в несколько раз.

Однако на протяжении последних десятилетий во всем мире наблюдается рост этого заболевания. Наиболее серьезными причинами распространения туберкулеза в наши дни являются возрастание доли случаев лекарственно устойчивого туберкулеза, а также распространение СПИДа.

Возникновение устойчивых к антибактериальным препаратам микроорганизмов – закономерное явление, обусловленное приспособлением живых организмов к окру-

жающей среде. К возникновению и распространению лекарственно устойчивых микобактерий туберкулеза приводят такие факторы, как воздействие антибактериальных препаратов в недостаточных для бактерицидного действия дозах и/или недостаточная продолжительность курсов лечения, а также применение монотерапии.

Заболевание туберкулезом, вызванное как моно-, так и полирезистентными микобактериями туберкулеза, протекает особенно тяжело. Стоимость лечения таких больных очень высока – примерно в 10 раз выше, чем стоимость лечения больных туберкулезом, выделяющих МБТ, чувствительные к действию препаратов первого ряда. Лечение больных лекарственно устойчивым туберкулезом часто значительно затруднено или оказывается неэффективно в условиях ограниченного доступа к препаратам резервного ряда. Кроме того, препараты второго ряда не во всех случаях являются такими же эффективными, как и препараты первого ряда. Смертность от лекарственно устойчивого туберкулеза достигает 50%.

Борьбу с туберкулезом осложняет также ВИЧ-инфекция, которая является пусковым механизмом для развития туберкулеза, поскольку у ВИЧ-инфицированного происходит сбой иммунитета. По некоторым статистическим данным, риск возникновения заболевания туберкулезом у ВИЧ-инфицированных увеличивается примерно в 170 раз.

В настоящее время число ВИЧ-инфицированных стремительно возрастает, при этом, согласно статистике, 10% ВИЧ-инфицированных заболевают туберкулезом. Среди причин смерти больных СПИДом около 50% составляет туберкулез.

Таким образом, рост лекарственно устойчивого туберкулеза и распространение ВИЧ-инфекции способствуют росту смертности от туберкулеза.

1.2. Эпидемиология туберкулеза

В настоящее время, по определению Всемирной организации здравоохранения, туберкулез представляет собой глобальную угрозу.

Смертность от инфекционных заболеваний занимает 1-е место в мире среди причин смерти, при этом микобактерии туберкулеза являются причиной смерти людей в большей степени, чем какой-либо другой возбудитель инфекции.

По данным зарубежных исследователей, каждый день ежечасно от туберкулеза в мире умирает столько же человек, сколько гибнет при катастрофе самолета «Боинг-747».

В настоящее время туберкулезом болеют больше людей, чем когда-либо прежде: в 2003 г. выявлено 8,4 миллиона новых случаев туберкулеза; ежегодно от туберкулеза (излечимой болезни) умирают 2–3 миллиона человек или 5000 человек ежедневно.

Около трети населения нашей планеты инфицированы микобактериями туберкулеза.

Однако угрозу обществу представляет не столько увеличение общего числа больных туберкулезом, сколько бациллярные больные.

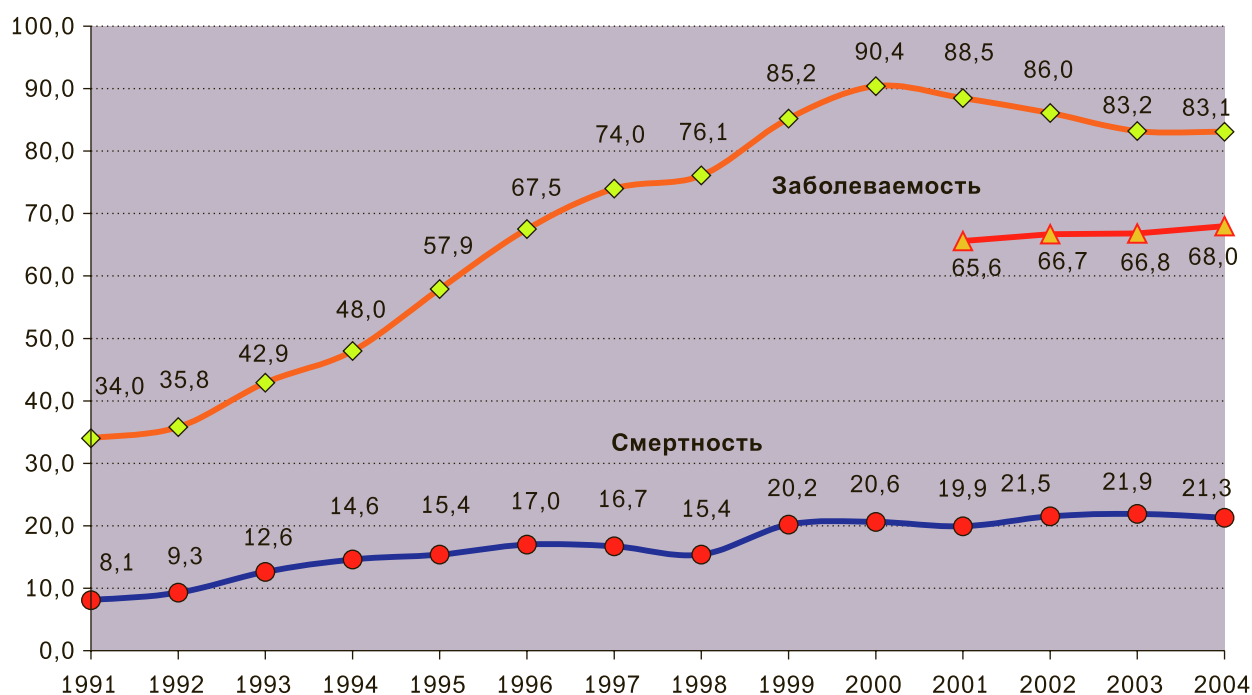
Особую опасность представляют бациллярные больные, выделяющие лекарственно устойчивые формы микобактерий туберкулеза. За последние годы удельный вес таких больных значительно увеличился: в литературе появились сообщения об увеличении числа больных туберкулезом с тяжелыми формами заболевания, вызванными

ми заражением взрослых и детей лекарственно устойчивыми микобактериями, что затрудняет проведение эффективного лечения, способствует развитию необратимых хронических форм и обуславливает высокую летальность. Увеличивается распространенность первичной лекарственной устойчивости микобактерий, то есть число случаев лекарственно устойчивого туберкулеза у больных, никогда не получавших противотуберкулезные препараты.

Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России на сегодняшний день является напряженной.

Ежегодно в РФ выявляется значительное количество новых больных, выделяющих микобактерии туберкулеза; увеличивается число запущенных и осложненных форм туберкулеза.

В 2004 г. заболеваемость туберкулезом в РФ (верхняя кривая заболеваемости на рис. 5) составила 83,1/100 000 населения (территориальный показатель заболеваемости). Показатель заболеваемости постоянного населения (нижняя кривая заболеваемости на рис. 5) составил 68,0/100 000 населения. Показатель смертности в 2004 г. имел уровень 21,3 на 100 тыс. населения.



Заболеваемость и смертность от туберкулеза в Российской Федерации (на 100 000 населения) **Рис. 5**

Эпидемическая ситуация по туберкулезу в РФ начала ухудшаться с начала 90-х гг., что связано с целым рядом объективных и субъективных причин. Численность впервые выявленных больных туберкулезом по сравнению с 1990 г. увеличилась к 2004 г. в 2,5 раза, более чем в 2 раза возросла смертность от туберкулеза, выросла заболеваемость туберкулезом среди детского населения (рис. 5). Увеличилась доля больных с распространенным, запущенным и осложненным туберкулезом. Растет число лекарственно-устойчивых форм микобактерий у впервые выявленных больных.

Заболеваемость туберкулезом значительно варьирует в различных регионах России (табл. 1, рис. 6).

**Заболееваемость туберкулезом в округах Российской Федерации
(на 100 000 населения)**

Территории	2001	2002	2003
Центральный федеральный округ	67,0	65,4	63,8
Северо-Западный федеральный округ	67,0	65,4	62,8
Южный федеральный округ	90,4	86,2	80,6
Приволжский федеральный округ	82,1	80,0	74,7
Уральский федеральный округ	103,3	104,1	98,0
Сибирский федеральный округ	127,8	125,5	126,1
Дальневосточный федеральный округ	119,5	119,2	119,7
Российская Федерация	88,2	86,3	83,2

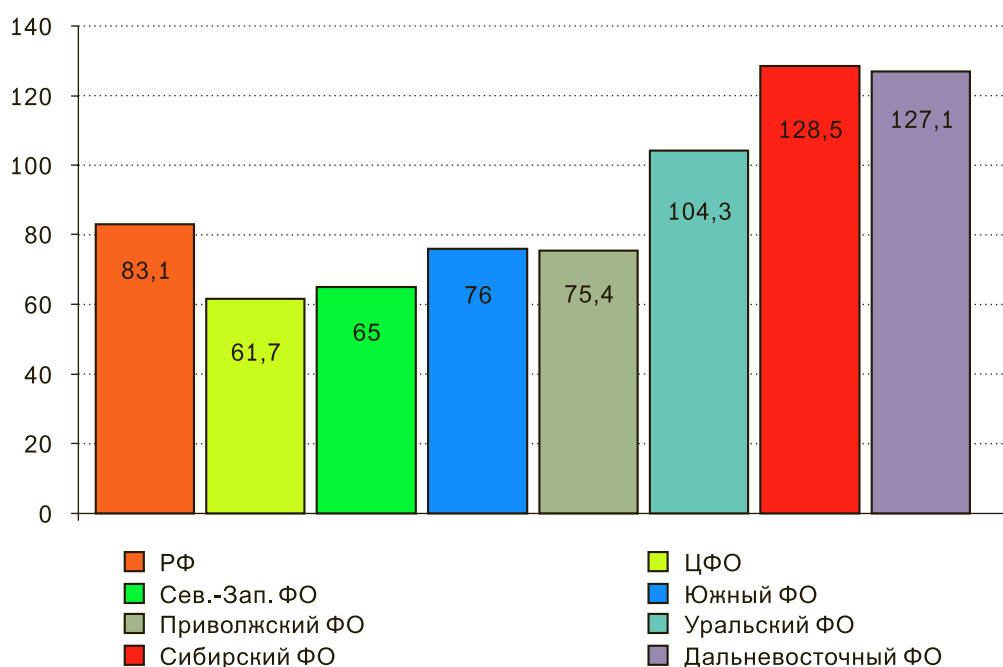
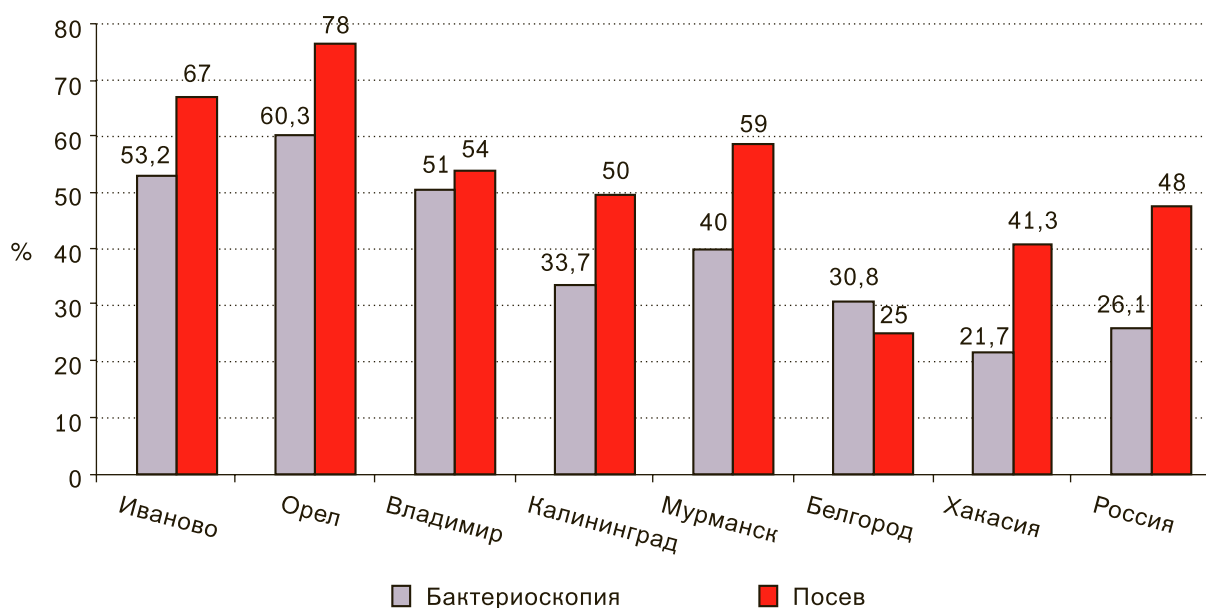


Рис. 6 Заболеваемость туберкулезом (все формы) в федеральных округах России в 2004 г. (на 100 000 населения)

Удельный вес бактериовыделителей среди впервые выявленных больных туберкулезом легких представлен на рис. 7. По данным официальной статистики, в 2004 г. в РФ число впервые выявленных бациллярных больных составило 43 311 человек, из них методом бактериоскопии было выявлено 25 733 человека.

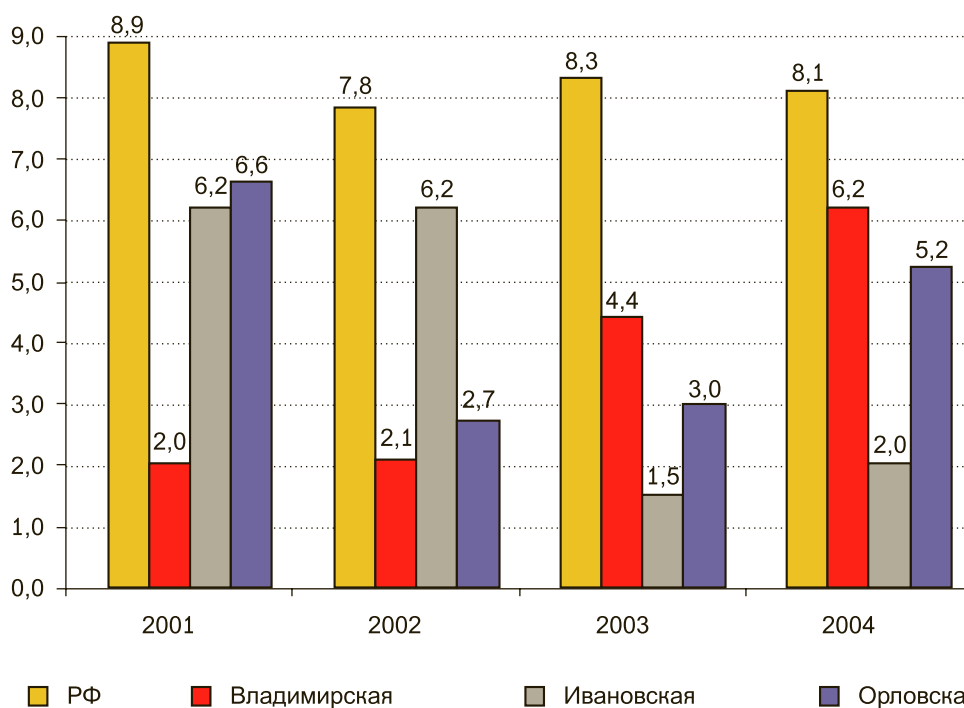
За последние годы число больных, выделяющих микобактерии туберкулеза, устойчивые к противотуберкулезным препаратам, стало быстро распространяться. В частности, в пилотных регионах РФ зарегистрированы достаточно высокие показатели первичной лекарственной устойчивости: примерно четвертая часть от всех впервые выявленных и обследованных на лекарственную устойчивость больных туберкулезом являлись носителями штамма *M. tuberculosis*, резистентного как минимум к одному противотуберкулезному препарату.



Удельный вес бактериовыделителей среди впервые выявленных больных туберкулезом легких (гражданский сектор) в 2003 г. Рис. 7

Понимая важность проблемы лекарственно-устойчивого туберкулеза, Минздрав России своим указанием ввел с 1999 г. в официальную статистическую отчетность учет больных туберкулезом, имеющих множественную лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам. За всю историю существования в России официальной статистики по туберкулезу такой показатель ранее не учитывался.

Показатели множественной лекарственной устойчивости у впервые выявленных больных туберкулезом в целом по России и в отдельных регионах РФ представлены на рис. 8.



Множественная лекарственная устойчивость у впервые выявленных больных туберкулезом в различных регионах РФ Рис. 8

2 Стратегии борьбы с туберкулезом

Глобальными целями борьбы с туберкулезом являются:

- снижение заболеваемости, смертности и распространения инфекции,
- предупреждение развития ЛУ МБТ.

Главной задачей противотуберкулезной программы должно стать снижение частоты инфицирования туберкулезом.

Для этого мероприятия противотуберкулезной программы должны быть направлены на то, чтобы:

- каждый бактериовыделитель был своевременно выявлен и направлен на лечение;
- каждый небациллярный больной туберкулезом также должен быть выявлен и направлен на лечение, пока он не стал заразным;
- неинфицированные лица не должны стать инфицированными.

Для решения задач борьбы с туберкулезом в 1982 г. Всемирной организацией здравоохранения была предложена стратегия DOTS как основная стратегия борьбы с туберкулезом.

В настоящее время стратегию DOTS приняли около 120 стран мира. В России стратегия DOTS официально была принята в 1994 г., после чего началась ее апробация в пилотных регионах РФ.

Стратегия DOTS основывается на пяти основных принципах:

- Постоянная поддержка программы борьбы с туберкулезом со стороны правительства и региональных органов управления здравоохранения.
- Выявление больных туберкулезом среди лиц, обратившихся в медицинское учреждение с симптомами, подозрительными в отношении туберкулезной инфекции, с использованием рентгенографии и микроскопического исследования мокроты.
- Применение стандартных режимов химиотерапии больных с контролируемым приемом препаратов (пациент принимает противотуберкулезные препараты обязательно в присутствии и под контролем медработника).
- Регулярное, непрерывное обеспечение всеми необходимыми противотуберкулезными препаратами.
- Стандартная система регистрации и отчетности для проведения оценки результатов как лечения больного, так и работы программы борьбы с туберкулезом в целом.

Опыт внедрения стратегии DOTS во многих странах мира показал, что она обеспечивает:

- раннее выявление и лечение наряду со строгим наблюдением за выявленными случаями ТБ и результатами их лечения;
- снижение смертности от ТБ;
- профилактику лекарственно-устойчивого ТБ;
- оптимальное расходование материальных средств.

Стратегия DOTS обеспечивает проведение стандартного лечения больных краткосрочными курсами химиотерапии под непосредственным наблюдением.

Приоритетом стратегии DOTS является направление ресурсов на выявление различных больных и их лечение.

Задачей является выявление не менее 70% всех существующих бациллярных больных и излечение 85% бациллярных больных.

Краеугольным камнем данной стратегии является проведение химиотерапии несколькими противотуберкулезными препаратами в течение не менее 6 месяцев под непосредственным наблюдением медицинского работника.

Одним из основных принципов DOTS является выявление случаев туберкулеза *по обращаемости*. При этом используется микроскопия мокроты как быстрый, эффективный и наименее затратный метод.

При достаточных ресурсах, направляемых на Программу борьбы с туберкулезом, используются и другие диагностические методы. Однако при расширении спектра применяемых методов необходимо учитывать возможности лечебной сети провести эффективное лечение всех выявленных больных.

Отметим, что анализ эффективности массовых флюорографических обследований показал, что имеющиеся в этом случае большие экономические затраты не всегда оправдывают себя в связи с низким процентом выявления больных туберкулезом, высокой долей ошибочных диагнозов и трудностями с привлечением бессимптомных больных к лечению.

Необходимость доступности обследования всех пациентов с симптомами, подозрительными в отношении туберкулеза, требует, чтобы, помимо специализированной противотуберкулезной службы, в выявлении туберкулезной инфекции принимала активное участие *первичная сеть медицинской помощи*. Работая в тесном контакте с учреждениями противотуберкулезной службы, учреждения общей лечебной сети должны выявлять больных туберкулезом и направлять их в противотуберкулезные учреждения.

Важнейшим условием обеспечения эффективной работы по выявлению бациллярных больных туберкулезом является наличие в стране национальной *сети лабораторий* различной ведомственной подчиненности, выполняющих микроскопию мокроты для выявления кислотоустойчивых микобактерий. Данную сеть лабораторий должна возглавлять референс-лаборатория, осуществляющая контроль качества проводимых микроскопических исследований.

Эффективная программа обеспечения качества исследований необходима для своевременного и эффективного удовлетворения потребностей противотуберкулезных программ в лабораторных методах диагностики туберкулеза. В связи с этим в противотуберкулезных программах, наряду с лекарственным обеспечением и организацией контролируемой терапии, первостепенное внимание уделяется вопросам обеспечения качества микробиологических исследований. Для реализации программы обеспечения качества микробиологических исследований необходимо объединение всех лабораторий, участвующих в диагностике туберкулеза, независимо от их ведомственной подчиненности в единую лабораторную сеть. Координация мероприятий по обеспечению качества в лабораториях сети осуществляется референс-лабораторией.

Стратегия DOTS получает все большее распространение в мире. В Европейском регионе число стран, применяющих стратегию в полном объеме, возросло с 6 в 1996 г. до 40 в 2002 г. (рис. 9).

В 1996 г. для организации эффективного лечения больных с МЛУ была разработана *стратегия DOTS+*. Для реализации этой стратегии, как и при реализации DOTS, используется выявление больных и контроль эффективности химиотерапии микробиологическими методами, а также аналогичная технология проведения контролируемого лечения. Для лечения больных применяются стандартные схемы с примене-

нием 4 и более противотуберкулезных препаратов второго ряда. Особое внимание в этой программе уделяется качеству исследований лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза.

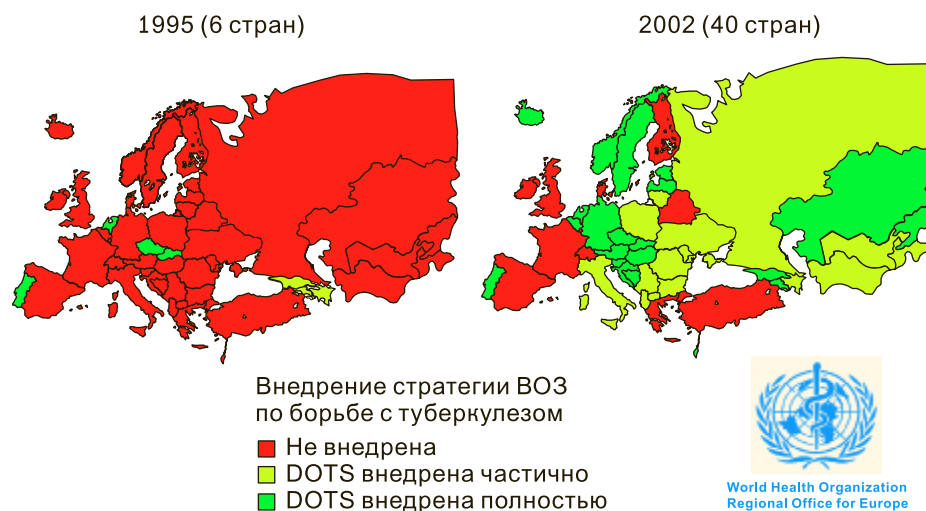


Рис. 9 Распространение стратегии DOTS в Европейском регионе ВОЗ

Таким образом, **основными целями стратегий DOTS и DOTS+** являются контроль за туберкулезом; предупреждение передачи инфекции здоровым людям; уменьшение новых случаев заболеваемости и смертности; обеспечение адекватного и эффективного лечения больных туберкулезом с наименьшими экономическими затратами. При этом важнейшую роль играют микробиологические методы диагностики туберкулеза, с помощью которых осуществляется как диагностика, так и контроль за лечением туберкулеза.

Начиная с 1995 г., учитывая напряженную эпидемическую ситуацию по туберкулезу, в России стартовали пилотные проекты борьбы с туберкулезом в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Опыт реализации пилотных проектов лег в основу Программы борьбы с туберкулезом, разработанной с учетом рекомендаций ВОЗ и адаптированной к российским условиям. Законодательной базой этой программы стали:

1. Федеральный закон 2001 г. № 77-ФЗ «О предупреждении распространения туберкулеза в Российской Федерации» (собрание законодательства РФ, 2001 г., № 26, ст. 2581).
2. Федеральная целевая программа «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера (2002–2006 гг.)», включающая подпрограмму «Неотложные меры борьбы с туберкулезом в России», утвержденную постановлением Правительства РФ от 13.11.2001 № 790.
3. Приказ Минздрава России 2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации», в котором, наряду с прочими, утверждены:
 - Инструкция по организации деятельности бактериологических лабораторий противотуберкулезных учреждений.
 - Инструкция по унифицированным методам микроскопических исследований для выявления кислотоустойчивых микобактерий туберкулеза в клинико-диагностических лабораториях общей лечебной сети.
 - Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза.

3.1. Свойства возбудителя туберкулеза

Возбудитель туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis* был открыт немецким ученым Робертом Кохом 24 марта 1882 г.

Микобактерии туберкулеза относятся к роду *Mycobacterium*. Характерной особенностью микроорганизмов, относящихся к этому роду, является наличие чрезвычайно устойчивой к внешним воздействиям гидрофобной клеточной стенки. Ее высокая гидрофобность в значительной степени обусловлена наличием остатков миколовых кислот в ее пептидогликолипидном слое. Особенность структуры клеточной стенки обуславливает способность микобактерий к кислотоустойчивому окрашиванию, а также их более высокую по сравнению с другими бактериями толерантность к воздействию кислот и щелочей.

Таким образом, микобактерии (к которым относятся и микобактерии туберкулеза) являются кислото-, щелоче- и спиртоустойчивыми и объединены общим признаком – способностью стойко сохранять воспринятую окраску даже после воздействия кислот и кислого спирта. Данное свойство имеет первостепенное значение для микобактерий, так как на нем основаны практически все методы микробиологического выявления и идентификации этих микроорганизмов.

Способность к кислотоустойчивому окрашиванию используется в клинической микобактериологии при специфической окраске диагностического материала при микроскопии, устойчивость к кислотам и щелочам – при селективной обработке диагностического материала с целью элиминации нетуберкулезной микрофлоры перед посевом.

Необходимо отметить, что способность к кислотоустойчивому окрашиванию не является исключительным свойством микобактерий туберкулеза: это свойство в той или иной степени присуще и другим, в том числе сапрофитным, микобактериям, а также другим бактериям и живым объектам, например представителям родов *Corinobacterium* и *Nocardia*, спорам *B. cereus*.

Способность микобактерий к **кислотоустойчивому окрашиванию** – это устойчивость к обесцвечиванию кислым спиртом или минеральными кислотами в высоких концентрациях (например, 25% серная кислота) после проведения окраски микобактерий анилиновыми красителями (основным фуксином или аурамином О) в 5% растворе фенола (то есть карболовым фуксином или карболовым аурамином).

Кислотоустойчивость микобактерий туберкулеза связана с большим содержанием липидов в их цитоплазме, а также с целостностью их клеточной структуры и определяется двумя важнейшими факторами: во-первых, наличием в цитоплазме кислотоустойчивых липидов типа миколовой кислоты и ее производных (миколовая кислота является единственным обладающим кислотоустойчивостью веществом у микобактерий туберкулеза), а во-вторых – особыми свойствами клеточной оболочки, затрудняющими обратный выход красителя при воздействии кислоты и алкоголя.

Таким образом, кислотоустойчивость микобактерий туберкулеза имеет двойственную природу и обусловлена, во-первых, удержанием красителя внутри бактериальной клетки и, во-вторых, связыванием красителя с остатками миколовых кислот клеточной стенки. Связывание красителя с пептидогликолипидами клеточной стенки увеличивает ее гидрофобность и способствует удержанию красителя в цитоплазме, что определяет яркость окраски.

Кислотоустойчивость выявляется с помощью только специальных методов окраски с использованием карболовых производных анилиновых красителей. Одним из таких методов является метод окраски по Цилю–Нильсену.

Другой особенностью микобактерий туберкулеза является их длительный цикл развития. Если время деления *Escherichia coli in vitro* составляет около 20 минут, то для *Mycobacterium tuberculosis* на плотных средах оно достигает 24 часов. Это свойство патогенных микобактерий обуславливает, с одной стороны, длительные сроки их микробиологической диагностики, а с другой – продолжительность развития инфекции и длительность курсов химиотерапии.

Род *Mycobacterium* включает в настоящее время около 100 видов, как патогенных, так и непатогенных. Большинство из представителей этого рода относятся к сапрофитным микроорганизмам, и лишь незначительное их число имеет клиническое значение.

К патогенным видам относятся возбудители туберкулеза у человека и животных, а также возбудитель проказы. Остальные представители рода *Mycobacterium* относятся либо к так называемым *атипичным микобактериям*, либо являются *сапрофитами*, которые широко распространены в природе. Атипичные микобактерии, классифицируемые как нетуберкулезные, вызывают в организме людей и животных те или иные патологические изменения и по биологическим качествам и клинической значимости занимают среднее место между типичными микобактериями туберкулеза и сапрофитными микобактериями.

Возбудителями туберкулеза у человека наиболее часто (в 92% случаев) являются микобактерии туберкулеза человеческого вида *Mycobacterium tuberculosis*. Микобактерии бычьего вида (*Mycobacterium bovis*) и микобактерии промежуточного вида (*Mycobacterium africanum*) вызывают развитие туберкулеза у человека соответственно в 5 и 3% случаев.

Необходимо отличать микобактерии туберкулеза от сапрофитных микобактерий.

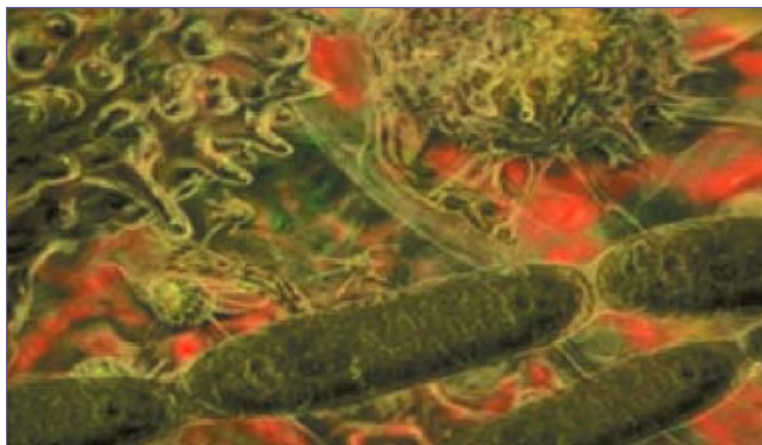
Кислотоустойчивые сапрофитные микобактерии можно выделить как из внешней среды, так и из материала здорового человека, а также и из патологического материала. Присутствие сапрофитных микобактерий в мокроте, слюне, промывных водах желудка и бронхов, моче, кале и т. д. может быть не связано с наличием заболевания и служить источником серьезных диагностических ошибок. Обнаружение кислотоустойчивых сапрофитов в мокроте больных может привести к ошибочному диагнозу туберкулеза.

Типичные представители возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis* – имеют вид тонких, прямых или слегка изогнутых, гомогенных или зернистых палочковидных форм длиной от 1 до 10 мкм (микрон) и шириной от 0,2 до 0,6 мкм с незначительно закругленными концами. Они неподвижны, не образуют эндоспор, конидий и капсул (рис. 10).

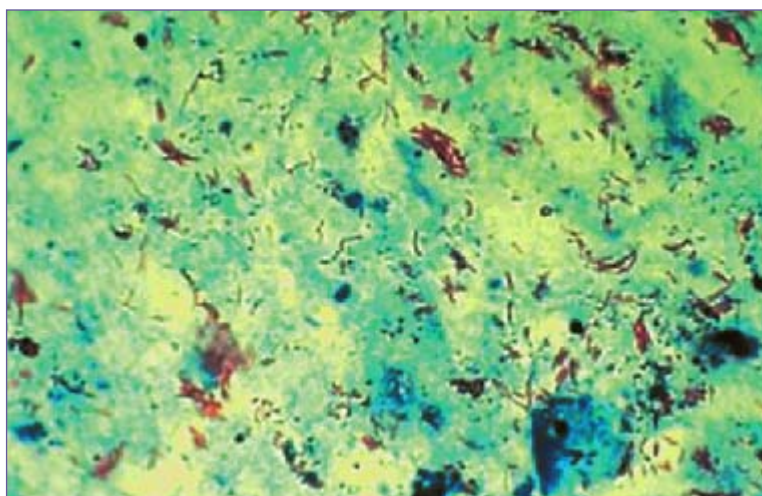
Обычно в патологическом материале микобактерии туберкулеза наблюдаются либо поединично, в виде маленьких групп по 2–3 палочки, а иногда небольшими группами, в которых палочки расположены беспорядочно (рис. 11).

Микобактерии туберкулеза характеризуются выраженным многообразием форм существования, большим полиморфизмом и широким диапазоном изменчивости биологических свойств.

Полиморфизм микобактерий не позволяет делать заключение о принадлежности обнаруженных при микроскопии кислотоустойчивых микобактерий к тому или иному виду, патогенному или сапрофитному.



Электронно-микроскопическое исследование МБТ **Рис. 10**



КУМ при окраске по Цилю–Нильсену. Увеличение $\times 1000$ **Рис. 11**

Морфология и размеры микобактериальных клеток, а также их способность к кислотоустойчивому окрашиванию подвержены значительным колебаниям и во многом зависят от возраста микроорганизма и особенно от условий его существования и состава питательной среды (рис. 12).

Описаны многочисленные морфологические варианты микобактерий: гигантские формы с колбовидно утолщенными разветвлениями, нитевидные, мицелиеподобные и булавовидные, дифтероидные и актиномикотические формы.

Микобактерии туберкулеза могут быть длиннее или короче, толще или тоньше обычных, гомогенны или зернисты. Иногда они представляют собой цепочки или отдельные скопления кокковидных зерен.

Многочисленными исследованиями доказана способность микобактерий образовывать фильтрующиеся формы, «видимые, но не растущие» формы с ослабленной жизнеспособностью, некислотоустойчивые формы. Однако биологическая и патогенетическая роль этих форм окончательно не выяснена.

Микобактерии туберкулеза обладают значительной устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды – холоду, теплу, влаге, свету.

В естественных условиях, при отсутствии солнечного света, их жизнеспособность может сохраняться в течение нескольких месяцев (и даже лет), при рассеянном свете возбудители погибают через 1–1,5 мес. В уличной пыли микобактерии сохраняются в течение 10 дней, на страницах книг – до 3 месяцев, в воде – до 5 месяцев.

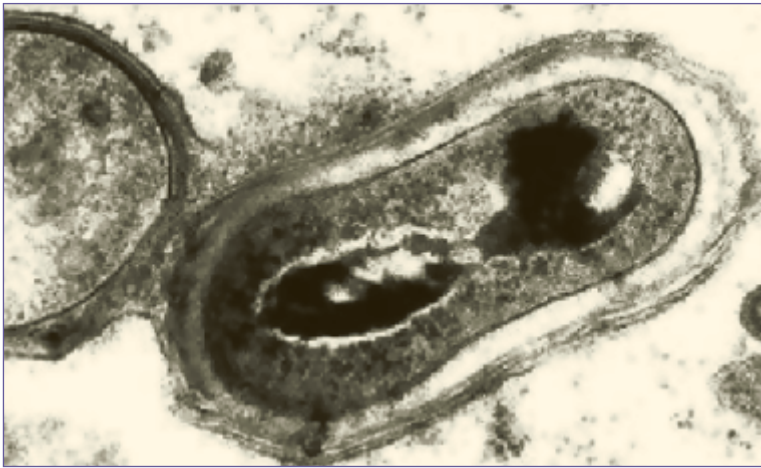


Рис. 12 Измененная МБТ в макрофаге из туберкулезной гранулемы (электронно-микроскопическое исследование)

По данным Edwards et al. (Bull Hlth Organ 1952; 5: 333–336), титр жизнеспособных бактерий *BCG* снижается с 10^7 до 5×10^1 под воздействием прямого солнечного света за 60 минут, под воздействием рассеянного солнечного света – за 240 минут.

В лабораторных условиях культуры микобактерий могут сохраняться без пересева до 1 года, а при лиофилизации в замороженном виде остаются жизнеспособными до 30 лет.

Однако некоторые виды физического и химического воздействия приводят к гибели микобактерий.

Например, культура микобактерий, облученная солнечным светом, погибает в течение 1,5 часов. Ультрафиолетовые лучи убивают микобактерии через 2–3 минуты. При кипячении микобактерии разрушаются через 45 минут ($t = 100^\circ$). Надежной дезинфекции в отношении микобактерий туберкулеза можно добиться, применяя препараты, выделяющие свободный активный хлор (3–5% растворы хлорамина, 10–20% растворы хлорной извести и др.), которые вызывают гибель микобактерий туберкулеза в течение 3–5 часов.

Учитывая то обстоятельство, что возбудитель туберкулеза является неспорозным и имеет палочковидную форму, рекомендуется в названии возбудителя придерживаться термина «микобактерии туберкулеза» (*mycos* – гриб, *bacterium* – палочка). Не следует называть возбудитель туберкулеза бациллой, так как бациллами называются микроорганизмы, способные образовывать споры.

3.2. Таксономия микобактерий

Возбудитель туберкулеза относится к группе Микобактерии, содержащей единственный род *Mycobacterium*. В настоящее время число видов микобактерий приближается к 100. Огромное большинство видов микобактерий относятся к сапрофитным микроорганизмам, широко распространенным в окружающей нас среде и не имеющим клинического значения.

Группа облигатных паразитов среди микобактерий численно незначительна, однако ее практическая значимость велика и определяется включением в нее микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, являющихся возбудителями туберкулеза у человека и животных. К роду микобактерий относится и возбудитель проказы – *M. leprae*.

В последнее время значительно возросло число видов микобактерий, вызывающих заболевание человека и животных, – так называемые микобактериозы. Как пра-

вило, эти заболевания вызывают условно-патогенные микроорганизмы, переход которых из категории сапрофитных к патогенным и развитие заболеваний, вызванных ими, обусловлены распространением иммунодефицитных состояний.

Среди атипичных микобактерий, вызывающих заболевания у птиц и земноводных, встречаются микобактерии, которые могут вызывать заболевания у человека, причисляемые к микобактериозам.

Однако, несмотря на увеличивающуюся клиническую значимость нетуберкулезных микобактерий, до настоящего времени неизвестны случаи их передачи от человека к человеку, что позволяет охарактеризовать их эпидемическую значимость как незначительную.

В 50-х гг. XX века на основании скорости роста и способности различных видов микобактерий к пигментообразованию была разработана система классификации микобактерий по Раньону.

Подобная классификация оказалась чрезвычайно удобной для проведения идентификации до вида.

Однако с выявлением новых видов микобактерий и появлением все большего числа промежуточных форм, отнесение которых к той или иной подгруппе вызывало значительные затруднения, а также в связи с развитием лабораторных технологий все более актуальным становилось разделение микобактерий по их клинической значимости.

В будущем развитие молекулярно-генетических технологий позволит создать более точную таксономию рода микобактерий. Однако для медицинских целей наиболее удобным является разделение микобактерий по их клинической значимости.

В настоящее время, наряду с классификацией Раньона, используется разделение клинически значимых микобактерий на комплексы:

- комплекс *M. tuberculosis* – микобактерии туберкулезного комплекса – это комплекс микобактерий, вызывающих туберкулез (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*),
- комплекс *M. avium* (*M. avium*, *M. intracellulare*),
- комплекс *M. fortuitum*,
- комплекс *M. terrae*.

Такая классификация позволяет объединить виды микобактерий одинаковой клинической значимости. Более тонкая характеристика их до видов в большинстве клинических случаев не требуется.

4 Лабораторная диагностика туберкулеза

4.1. Характеристика диагностических методов

Все методы диагностики заболеваний можно разделить на *прямые*, позволяющие выявить непосредственно этиологический агент заболевания, и *косвенные*, которые выявляют последствия воздействия этиологического агента на организм больного.

В случае туберкулеза к *прямым* методам относятся традиционные методы микробиологической диагностики (микроскопия и посев) и ПЦР-диагностика, позволяющая определять наличие ДНК возбудителя в диагностическом материале.

К *косвенным* методам относятся результаты клинического обследования; обследования лучевыми методами, фиксирующими последствия воздействия микобактерий на ткани органов пациентов; определение иммунного ответа организма.

Все применяемые методы диагностики характеризуются такими показателями, как диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность.

Диагностическая чувствительность определяется как доля правильно определенных пациентов, страдающих данным заболеванием, от всех обследованных пациентов с заболеванием.

Диагностическая специфичность определяется как доля правильно определенных здоровых пациентов среди всех обследованных здоровых пациентов.

Диагностическая специфичность косвенных методов невелика. Анализ эффективности массовых *флюорографических обследований*, проводившихся в Российской Федерации на протяжении многих лет, показал, что имеющиеся в этом случае большие экономические затраты не всегда оправдывают себя в связи с *низким процентом выявления больных туберкулезом, высокой долей ошибочных диагнозов и трудностями с привлечением бессимптомных больных к лечению*. Кроме того, этот вид обследования не охватывает социальные группы, наиболее подверженные заболеванию туберкулезом, что приводит к *снижению чувствительности метода* при массовом скрининге.

Микробиологические методы характеризуются высокой специфичностью. Видовая идентификация выделенной культуры микобактерий позволяет исключить этиологические агенты нетуберкулезной этиологии более чем в 99 случаях из 100. Специфичность микроскопии для выявления КУМ ниже, однако, в странах с заболеваемостью более 50/100 000 населения – выявленные КУМ в 95% случаев окажутся микобактериями туберкулеза.

Диагностическая чувствительность метода посева достигает 80–90%, метода микроскопии ниже – не более 50% от всех больных туберкулезом. Однако если говорить о наиболее инфекционных больных, диагностическая чувствительность микроскопии в этом случае достигает 90%.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР), внедряемая для диагностики туберкулеза в последние годы, показала высокую специфичность (99,8%) и чувствительность (более 85%) в лабораторных испытаниях.

Однако при применении этого метода в клинике и специфичность, и чувствительность оказались значительно ниже. Это объясняется высокими требованиями к условиям проведения анализа, исключаящими перекрестный перенос фрагментов молекул ДНК (РНК); сложностями, связанными с экстракцией ДНК (РНК) из инфекционного материала; а также необходимостью обеспечить высокий уровень подготовки персонала. В рядовых клинических лабораториях добиться выполнения всех требований к осуществлению метода удается не всегда. Кроме того, с учетом вышесказанного стоимость аппаратуры и тест-наборов делает этот метод до-

рогостоящим. В настоящее время он не нашел широкого распространения и ни в одной стране не стал альтернативой микробиологическим методам. Этот метод применяется как дополнительный.

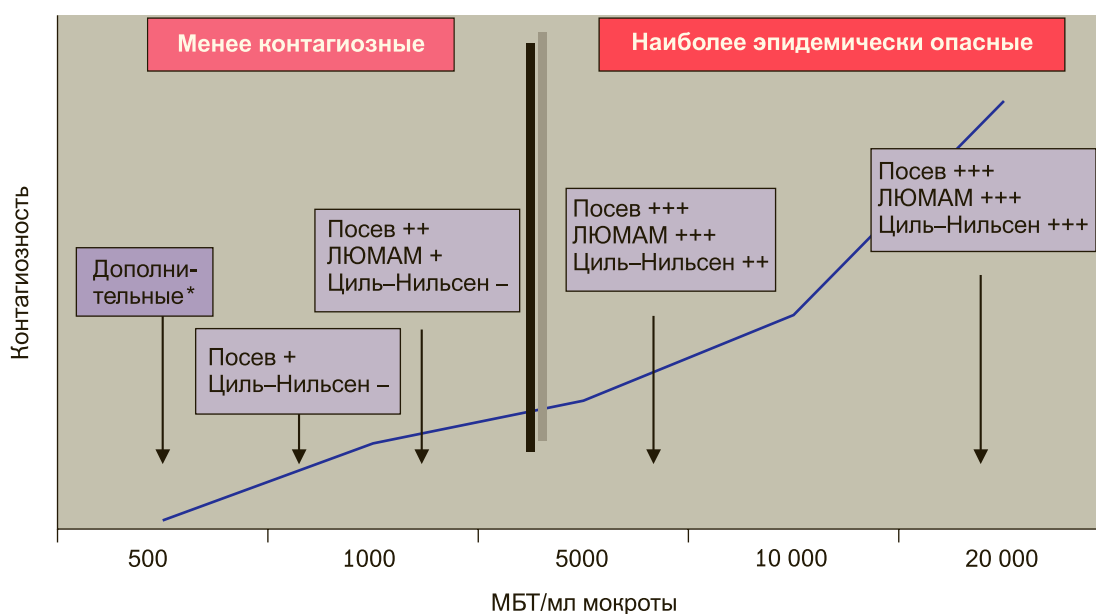
4.2. Микробиологические методы диагностики туберкулеза

В современной напряженной эпидемической ситуации с туберкулезом микробиологические исследования играют важную роль в диагностике заболевания, контроле бактериовыделения в процессе лечения, выборе рациональных схем и коррекции химиотерапии, оценке ее эффективности, микробиологическом подтверждении излечения больного после окончания курса лечения.

В последние годы в связи с ростом показателей заболеваемости микробиологические методы исследования являются одними из основных методов в диагностике туберкулеза.

Чувствительность различных методов микробиологической диагностики туберкулеза представлена на рис. 13.

Основными методами выявления возбудителя туберкулеза являются традиционные микробиологические методы – микроскопия мазка и культуральные исследования (посев).



* Дополнительные методы – ИФА, ПЦР, биопроба и другие.

Чувствительность различных методов микробиологической диагностики туберкулеза **Рис. 13**

При достаточных ресурсах, направляемых на Программу борьбы с туберкулезом, используются и другие диагностические методы.

Как указывалось выше, в последние годы в практику лабораторной диагностики туберкулеза все шире внедряются новые методы, которые основываются на молекулярно-генетических технологиях.

Молекулярно-генетические методы с успехом применяются для подтверждения принадлежности выявленных методом микроскопии КУМ к микобактериям туберкулеза, а также для предварительной диагностики случаев с МЛУ МБТ. Однако в этом

случае окончательный диагноз лекарственной устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам ставится, тем не менее, на основании микробиологических тестов на лекарственную чувствительность.

Кроме того, высокая стоимость таких методов, как ПЦР-диагностика, высокие требования к оснащению лабораторий и профессиональной подготовке персонала ограничивают применение этих методов в периферийных лабораториях и небольших лабораториях среднего уровня.

Таким образом, в последние годы, в условиях напряженной эпидемической ситуации по туберкулезу и в связи с уменьшением объема проводимых массовых флюорографических обследований населения, в РФ значительно возросла роль традиционных методов микробиологической диагностики.

Первичное выявление больных туберкулезом микробиологическими методами в РФ осуществляется как в учреждениях противотуберкулезной службы, так и в клинико-диагностических лабораториях общей лечебной сети.

4.2.1. Методы микроскопического исследования

Как уже говорилось выше, способность микобактерий к кислотоустойчивому окрашиванию позволяет обнаруживать их в мазках из диагностического материала с высокой специфичностью. Для этого мазки обрабатывают растворами карболовых производных анилиновых красителей. Наиболее распространенными являются карболовые производные основного фуксина или люминесцентного красителя аурамина.

Наиболее распространенным методом для выявления кислотоустойчивых микобактерий является метод окраски мазков по Цилю–Нильсену.

Этот метод широко применяется в клинико-диагностических лабораториях общей лечебной сети для окраски мазков, приготовленных непосредственно из диагностического материала (метод прямой микроскопии), и является достаточно эффективным.

В методе Циля–Нильсена в качестве красителя используется основной карболовый фуксин. При одновременном воздействии нагревания и сильного протравливающего вещества, дестабилизирующего клеточную стенку, – фенола (карболовой кислоты), на котором готовится основное красящее вещество фуксин, облегчается проникновение анилинового красителя в микобактериальную клетку и особенно в структуры ее клеточной стенки, состоящей из липидов и миколовых кислот. Обычные анилиновые красители не воспринимаются микобактериями, и последние не окрашиваются.

Такая трудная окрашиваемость микобактерий туберкулеза связана с тем, что в их состав входит значительный процент жировосковых веществ; особенно много их содержится в оболочке, поэтому для окраски микобактериальной клетки требуется первоначально разрыхлить ее оболочку.

Для проявления способности к кислотоустойчивому окрашиванию требуется целостность микобактериальной клетки и ее внешней оболочки. Карболовый фуксин проникает внутрь клетки, а также связывается с остатками миколовых кислот, входящих в состав пептидогликолипидной внешней оболочки микобактериальной клетки. Связывание карболового фуксина с миколовыми кислотами повышает гидрофобность клеточной оболочки и препятствует выходу красителя из клетки. Краситель, содержащийся внутри клетки, обеспечивает яркость окраски, окраска внешней оболочки имеет бледно-красный цвет.

Последующее обесцвечивание мазка серной кислотой в высокой концентрации или солянокислым спиртом приводит к обесцвечиванию всех некислоустойчивых микроорганизмов. Только микобактерии, обладающие выраженной кислото- и спиртоустойчивостью, стойко удерживают краситель и остаются окрашенными в малиново-красный цвет.

Микобактерии туберкулезного комплекса характеризуются высокой степенью кислотоустойчивости. Сапрофитные виды микобактерий, как правило, значительно менее устойчивы к обесцвечиванию, чем вирулентные штаммы. Поэтому, для того чтобы отличить микобактерии туберкулезного комплекса от менее кислотоустойчивых сапрофитных микобактерий, предпочтительнее всего использовать для обесцвечивания мазка 25% серную кислоту. Последующая (после 25% серной кислоты) обработка мазка 96° этиловым спиртом не является обязательной при проведении процедуры кислотоустойчивого окрашивания, однако обеспечивает полное удаление с мазка кристаллов и остатков краски. Указанный способ двойной обработки позволяет добиться надежных результатов обесцвечивания окрашенного мазка и избежать гипердиагностики КУМ.

Обесцвеченный мазок докрашивают метиленовым синим. Таким образом, при окраске по Цилю–Нильсену кислотоустойчивые микобактерии выглядят ярко-красными на синем фоне препарата.

Для исследования мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену, используют световой бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом ($\times 90$ или $\times 100$) и окуляром $\times 7$ – 10 .

Обычно исследуют 100 полей зрения, что достаточно для выявления в мазке единичных микобактерий. В том случае, если результат такого исследования оказывается отрицательным, для подтверждения рекомендуется просмотреть еще 200 полей зрения. Результаты регистрируют указанием количества обнаруженных кислотоустойчивых бактерий – КУМ.

Чтобы обнаружить микобактерии туберкулеза при проведении микроскопии методом Циля–Нильсена, в 1 мл мокроты должно содержаться от 5000 и более микробных клеток.

Вероятность получения отрицательных результатов исследования мазков, приготовленных из проб мокроты, содержащих различные концентрации микобактерий, представлена в табл. 2.

Количество мокроты, наносимой на предметное стекло при приготовлении мазка, составляет примерно 0,01 мл. Это количество мокроты распределяется на площади 200 мм².

Поскольку площадь поля при микроскопии с масляной иммерсией составляет примерно 0,02 мм², то для исследования всего мазка нужно просмотреть 10 000 таких полей. Если просмотреть 100 полей, то можно считать, что исследован всего 1% площади мазка (см. табл. 3).

Если в пробе мокроты находится 5000 микобактерий на 1 мл, то весь мазок будет содержать 50 микроорганизмов. Если эти 50 микобактерий равномерно распределены среди 10 000 полей мазка, то на каждые 200 полей придется по одной микобактерии. Если просмотрено 100 полей, вероятность обнаружения этой микобактерии составит 50% (см. табл. 3).

Таблица 2

Частота (вероятность) отрицательных результатов исследования мазков, приготовленных из проб мокроты, содержащих различные концентрации микобактерий, определяемые путем посева (подсчетом колоний), %

Содержание микобактерий в 1 мл пробы мокроты	Номер эксперимента			Средняя (%)
	1	2	3	
	отрицательный результат (%)			
1500	–	85	92	88,5
3000	84	83	77	81,3
15 000	25	28	6	19,6
30 000	16	30	6	17,3
150 000	0	0	5	1,6
300 000	0	0	0	0,0
Число исследованных мазков	42	100	289	–

Таблица 3

Сравнительный анализ световой и люминесцентной микроскопии

	Вся площадь мазка – 200 мм ²	
	по Цилю–Нильсену (увеличение ~×1000, иммерсия)	флюоресцентная (увеличение ~×300)
Площадь 1 поля зрения	0,02 мм ²	0,06 мм ²
Площадь 100 полей зрения	1% мазка	3% мазка
Кол-во КУМ в 1 мл	5000	
Объем, нанесенный на мазок	0,01 мл	
Количество КУМ на мазок	50	
Количество КУМ в 200 полях зрения	1	3

Таким образом, для того чтобы найти в мазке хотя бы 3 кислотоустойчивые микобактерии (что обычно рекомендуется как необходимый минимум для признания данного мазка положительным), необходимо просмотреть 600 полей зрения. При просмотре 300 полей вероятность обнаружения трех микобактерий составит примерно 50%.

Для обнаружения одной кислотоустойчивой микобактерии в 10 полях (или 10 в 100 полях) необходимо присутствие 1000 таких микобактерий в мазке (10 000 полей) или 100 000 (10⁵) в 1 мл мокроты. Для обнаружения одной микобактерии в каждом поле их должно быть 10⁶ в 1 мл мокроты.

Количество КУМ, обнаруженных в мазках, и вероятность получения положительного результата в зависимости от содержания микобактерий в 1 мл пробы мокроты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Число кислотоустойчивых микобактерий, обнаруженных в мазках, концентрация культивируемых микобактерий в пробах мокроты и вероятность получения положительных результатов

Число обнаруженных микобактерий	Концентрация микобактерий в 1 мл пробы	Вероятность получения положительного результата
0 в 100 и более полях	менее 1000	менее 10%
1–2 в 300 полях	5000–10 000	50%
1–9 в 100 полях	около 30 000	80%
1–9 в 10 полях	около 50 000	90%
1–9 на поле	около 100 000	96,2%
10 или более на поле	около 500 000	99,95%

Из вышесказанного следует сравнительно низкая чувствительность метода микроскопии. Действительно, этот метод позволяет выявить лишь **50–60%** от всех больных туберкулезом. Однако в случае проведения диагностики у больных с массивным бактериовыделением, представляющих собой наибольшую эпидемическую опасность, чувствительность метода превышает **90%**. Специфичность же этого метода очень высока – **98%** и выше.

В мокроте больных с активными формами туберкулеза легких (особенно при наличии у больных полостей распада легочной ткани) обычно содержится значительное количество кислотоустойчивых бактерий, что позволяет выявить их при бактериоскопии.

Чувствительность метода микроскопии можно повысить, если просматривать несколько мазков от одного пациента.

Поэтому при подозрении на туберкулез легких необходимо проводить бактериоскопию мазков из трех различных образцов мокроты, собранных в течение 3 дней (табл. 5).

Таблица 5

Диагностическая отдача повторной микроскопии мазка среди больных с подозрением на легочный туберкулез в провинции Шандонг в Китае
(ВУ ЗЛ и ВАНГ АК, *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 1086)

1-я мокрота	(5439)	84,5 проц. пол.
2-я	(5105)	12,2
3-я	(4757)	3,2
4-я	(4590)	0,1
5-я	(4326)	0

В первой порции мокроты от больного туберкулезом КУМ обнаруживают, как правило, в 80–90% случаев. Еще 5–25% выявляются при исследовании второй порции мокроты. До 5% бациллярных случаев выявляются при исследовании третьего мазка. Дальнейшие исследования мокроты могут дополнительно выявить единичные случаи.

Однако исследование более чем 3 порций мокроты применяется в исключительных случаях. Обычно в противотуберкулезных программах число исследований для диагностики устанавливают с учетом возможности лабораторной сети справиться с нагрузкой, как правило в количестве 2 или 3.

В России число исследуемых мазков для диагностики туберкулеза установлено Приказом МЗ РФ № 109 как 3 мазка.

Наиболее результативным является исследование утренней порции мокроты. Поэтому исследование трех образцов мокроты, собранных утром на протяжении трех последующих дней, представляет собой предпочтительную схему обследования. Однако возможны и другие схемы обследования пациентов с подозрением на туберкулез.

Отрицательный результат бактериоскопического исследования не исключает диагноз туберкулеза, так как в мокроте некоторых пациентов содержится меньше микобактерий, чем может выявить микроскопия.

Отрицательный результат микроскопии может быть также в случае необоснованного назначения исследования. Данные, приведенные в табл. 6, показывают, что вероятность наличия туберкулеза с положительным мазком у пациента с кашлем более 14 дней значительно выше, чем у пациентов с кашлем менее чем в течение 14 дней.

В связи с этим обследованию методом микроскопии подлежат лица только при наличии у них длительного кашля с мокротой!

Таблица 6

Наличие туберкулеза легких с положительным мазком в зависимости от длительности кашля пациента

(Д.Р. Нагпол и др., ВОЗ/ТБ/Информация для лаборантов / 68.63)

Длительность кашля	Количество человек	Кол-во случаев ТБ легких с положительным мазком
<14 дней	241	1
>14 дней	381	43

В настоящее время в РФ массовые флюорографические осмотры населения, как правило, не проводятся и основная масса впервые заболевших туберкулезом выявляется по обращаемости, то есть среди лиц, обратившихся за медицинской помощью из-за появившихся различных клинических симптомов.

В первую очередь микроскопическому обследованию подлежат обратившиеся в медицинские учреждения лица с явными симптомами заболевания:

- наличие продолжительного (более 3 недель) кашля, сопровождающегося выделением мокроты, мокроты с кровью и болью в груди,
- наличие субфебрильной или фебрильной температуры, профузных ночных потов, симптомов интоксикации,
- потеря веса.

Помимо этого, микроскопические исследования мазков, окрашенных методом Циля–Нильсена, проводятся при первичном обследовании лиц, подозреваемых на наличие у них туберкулезного заболевания:

- контактировавшие с больными, имеющими положительный результат бактериоскопического исследования и соответствующие симптомы заболевания;
- имеющие рентгенологические изменения в легких, подозрительные в отношении туберкулеза;
- при активном обследовании лиц, входящих в группы риска по заболеванию туберкулезом.

Целесообразный подбор пациентов для обследования (при наличии у них симптомов, подозрительных в отношении туберкулезной инфекции) позволяет значительно повысить эффективность микроскопического исследования.

Еще одной причиной низкой эффективности микроскопии для выявления КУМ является *низкое качество* диагностического материала.

В случае если вместо мокроты в лабораторию доставлена слюна, вероятность обнаружения в ней КУМ даже у бациллярного больного невелика (табл. 7). Однако она не равна нулю. Поэтому не рекомендуется отказываться от исследования доставленного в лабораторию материала, каким бы он ни был.

Однако лаборатория должна отмечать факт исследования слюны в лабораторном журнале и в форме ответа врачу, поскольку в случае отрицательного результата анализа такого материала, как слюна, лечащий врач не должен принимать его во внимание и должен повторить исследование. Лаборатория также должна принять меры для снижения доли слюны среди поступающих в лабораторию образцов диагностического материала. Этот вопрос можно решить путем обучения сборщиков мокроты, а также информирования и разъяснительной работы с лечащими врачами.

Таблица 7

**Зависимость положительного результата микроскопии мазка
от вида исследуемого образца**

(Амбулаторная служба L. Pollak & R. Urbanczik,
Bol Inform Inst Nac Tuberc (Caracas) 1969; 2: 5–8)

Вид образца	Всего	%	Положительные	%
Слюна	1125	32,9	21	1,8
Слизь	1707	49,9	68	3,5
Слизисто- гнойная	583	17,2	220	37,7

Плохая подготовка мазков мокроты, ошибки в их окрашивании и неисправный микроскоп также могут быть причиной отрицательного результата бактериоскопического исследования.

Помимо метода Циля–Нильсена, для бактериоскопии мазка применяется окраска флюорохромами для люминесцентной микроскопии.

Метод люминесцентной микроскопии является более эффективным по сравнению с методом Циля–Нильсена. Однако в тех случаях, когда мазок подвергается окраске флюорохромными красителями и исследуется в люминесцентном микроскопе, необходимо иметь в виду, что качественная и эффективная окраска флюорохромными красителями требует обязательного соблюдения кислотности (*pH*) мазка, а также освобождения микобактерий от окружающей их слизи, которая препятствует проникновению красителя в микробную клетку. Несоблюдение этих условий приводит к снижению эффективности люминесцентной микроскопии и получению ложноотрицательных результатов исследования.

В связи с этим *метод люминесцентной микроскопии не рекомендуется применять для исследования нативной мокроты*, мазки для люминесцентной микроскопии необходимо готовить из осадка, полученного путем обработки материала детергентом с последующим отмыванием либо нейтрализацией и центрифугированием при 3000 g в безопасной центрифуге. В дополнение к такой центрифуге необходимо создание в

лаборатории специальных условий безопасности (автономная вентиляция, снабженная НЕРА-фильтрами на выходе, и ее регулярное обслуживание).

Поэтому данный метод обычно используется только в специализированных бактериологических лабораториях, которые, помимо микроскопического, выполняют еще и культуральное исследование, при этом мазок и посев производятся обязательно из одной и той же порции материала.

Суть люминесцентной микроскопии заключается в том, что объекты (клетки), окрашенные специальными красителями (флюорохромами), дают излучение в видимом спектре света под действием облучения их ультрафиолетом.

При обработке микобактерий флюорохромными красителями (аурамин, родамин и др.) последние связываются с воскоподобными структурами микробной клетки. При облучении окрашенных клеток возбуждающим источником света (определенный спектр ультрафиолетового излучения) они начинают светиться оранжевым или ярко-красным светом на черном или темно-зеленом фоне.

В силу высокой контрастности видимого изображения (цветные светящиеся объекты на темном фоне) при исследовании такого мазка можно снизить общее увеличение микроскопа в несколько раз, что позволяет расширить поле зрения в 4–10 раз и уменьшить время, необходимое для просмотра мазка. Наряду с этим за счет значительно большей глубины резкости и контрастности микроскопической картины повышается комфортность микроскопического исследования, а также расширяются пределы метода.

Это делает метод люминесцентной микроскопии особенно ценным при исследовании олигобациллярного материала. Чувствительность люминесцентной микроскопии, особенно в сочетании с методом обогащения диагностического материала (микроскопия осадка), незначительно уступает по чувствительности методу посева.

Люминесцентная микроскопия позволяет выявить от 500 микробных клеток в 1 л мокроты, что значительно увеличивает диагностическую эффективность метода.

Основное преимущество люминесцентной микроскопии состоит в том, что этот метод позволяет проводить исследование при меньших увеличениях микроскопа и, следовательно, просматривать большую площадь мазка в одном поле зрения (см. табл. 3). Окрашенные флюорохромными красителями препараты обычно исследуются при увеличении $\times 250$ – 450 , тогда как окрашенные фуксином – при увеличении $\times 1000$. Применение малых увеличений позволяет за одно и то же время тестировать методом люминесцентной микроскопии большее количество полей зрения, чем при использовании обычного микроскопа проходящего света.

Кроме того, окраска клеток смесью аурамина и родамина является специфической для кислотоустойчивых микобактерий, которые окрашиваются в виде золотистых палочек. Сапрофиты окрашиваются в зеленоватый цвет.

Другим важным преимуществом метода люминесцентной микроскопии является способность обнаруживать измененные микобактерии, утратившие под влиянием ряда неблагоприятных факторов, в частности интенсивной химиотерапии, свойство кислотоустойчивости и не выявляющиеся в связи с этим при окраске по методу Циля–Нильсена.

Благодаря возможности использования для люминесцентной микроскопии объектов с малым увеличением, поле зрения оказывается во много раз больше, чем

при использовании масляной иммерсии: размер поля в первом случае при объективе $\times 25$ составляет примерно $0,34 \text{ мм}^2$, а в последнем – всего около $0,02 \text{ мм}^2$. Таким образом, при использовании люминесцентной микроскопии на просмотр той же площади мазка затрачивается значительно меньше времени, чем при обычной микроскопии мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену.

Так, если за рабочий день микроскопист просматривает примерно 30–40 мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену, то с помощью люминесцентной микроскопии он просмотрит за то же время более 200 мазков.

Поскольку методом люминесцентной микроскопии за то же время можно просканировать в 15 раз больше полей, чем при микроскопии мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену, вероятность обнаружения кислотоустойчивых бактерий при использовании первого метода значительно повышается, особенно если в мазке содержится мало микобактерий. Это было подтверждено сравнительным исследованием, которое показало, что за 1 мин люминесцентная микроскопия позволяла выявить больше положительных и не больше ложноположительных результатов, чем микроскопия мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену, за 4 мин.

Сравнение положительных результатов люминесцентной микроскопии и микроскопии мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену, с результатами посева выявило некоторое преимущество люминесцентной микроскопии: из всех препаратов, оказавшихся положительными по результатам посева, 67,3% были положительными по данным люминесцентной микроскопии и 66,1% по данным микроскопии с использованием окраски по Цилю–Нильсену (Томан, 1980).

Считается, что недостатком люминесцентной микроскопии является то обстоятельство, что при ее использовании повышается вероятность получения ложноположительных результатов. Однако такой фактор, как использование для люминесцентной микроскопии объектива с меньшим увеличением (по сравнению с обычным микроскопом проходящего света) не оказывает существенного влияния на возможность получения ложноположительных результатов. Гораздо большее значение имеет сочетание запирающих и возбуждающих светофильтров, то есть цвет свечения, а также наличие или отсутствие фонового свечения, которые влияют на общий цвет свечения, что и может явиться основной проблемой.

Следует отметить, что в литературе описаны специально проведенные исследования, которые показали, что существовавшие опасения по поводу возможной неспецифичности флюоресцентного метода оказались напрасными (Томан, 1980).

Согласно этим исследованиям, метод люминесцентной микроскопии и метод Циля–Нильсена практически не различаются по числу ложноположительных результатов. Приблизительно 97% положительных результатов, полученных любым методом микроскопии, были однозначно подтверждены результатами посева.

Тем не менее **во всех сомнительных случаях в качестве контроля должна использоваться микроскопия мазка, окрашенного по методу Циля–Нильсена.**

К недостаткам метода люминесцентной микроскопии относится сравнительно высокая стоимость полной микроскопической установки и ее эксплуатации. Однако в центральных или других крупных лабораториях, где нагрузка превышает норму трех лаборантов, работающих с тремя обычными микроскопами, дешевле пользоваться вместо этого одним люминесцентным микроскопом.

Другой недостаток метода люминесцентной микроскопии состоит в том, что работа с оптическим оборудованием и уход за ним требуют специальных технических навыков.

4.2.2. Роль микроскопических исследований для выявления туберкулеза

Выявление микобактерий в диагностическом материале от больных имеет решающее значение для постановки диагноза «туберкулез». Бактериоскопический метод исследования является простым и экономичным способом, указывающим на наличие или отсутствие кислотоустойчивых бактерий и позволяющим при положительном результате исследования мазка мокроты устанавливать диагноз «туберкулез легких».

При проведении микроскопического исследования допустимы 2 метода – **метод прямой микроскопии**, когда мазок приготавливается непосредственно из диагностического материала, и **метод микроскопии мазка из осадка**, подготовленного из обработанного деконтаминантами материала для культурального исследования.

Центрифугирование, концентрирующее образец, увеличивает чувствительность метода микроскопии. Однако некоторые исследования показали, что правильный выбор гнойных комочков мокроты для приготовления мазков позволяет достичь не меньшей эффективности, чем та, что достигается при обработке и центрифугировании мокроты. Таким образом, хорошо обученный и мотивированный лаборант и правильно подобранные контейнеры для сбора мокроты (плоские и прозрачные) могут эффективно компенсировать отсутствие в лаборатории скоростной безопасной центрифуги.

В РФ метод микроскопического исследования мазков, приготовленных из нативной мокроты и окрашенных по Цилю–Нильсену, широко используется в тех лабораториях, где производится только микроскопическое исследование материала (клинико-диагностические лаборатории общей лечебной сети).

Если материал подвергается микробиологическому исследованию в лаборатории более высокого уровня, то микроскопическое исследование проводят параллельно с культуральным исследованием из одной пробы полученного материала. При этом мазки обычно готовят из осадка диагностического материала, что позволяет получать оптимальные результаты микроскопического исследования. Осадок представляет собой обогащенную фракцию диагностического материала и значительно чаще позволяет получить положительные результаты (при этом осадок может быть окрашен как флюоресцентными красителями, так и по методу Циля–Нильсена).

Необходимо отметить, что при микроскопическом исследовании мазка из диагностического материала **нельзя определить видовую принадлежность** выявленных кислотоустойчивых микобактерий и специфически **идентифицировать возбудитель туберкулеза**.

Метод микроскопии позволяет дать заключение лишь о наличии или отсутствии в препарате кислотоустойчивых микроорганизмов, что объясняется существованием в природе большого числа микроскопически неотличимых от микобактерий туберкулеза нетуберкулезных кислотоустойчивых бактерий.

Кислотоустойчивость при микроскопическом исследовании в сочетании с морфологическим показателем (палочковидные формы) способствует выявлению микобактерий, не доказывая, однако, что речь идет о микобактериях туберкулеза. При микроскопическом исследовании препаратов морфологически очень трудно отличить кислотоустойчивые сапрофитные микобактерии от туберкулезных.

Поэтому метод микроскопии позволяет в короткий срок дать ответ клиницистам только о наличии в мокроте больного кислотоустойчивых микобактерий (КУМ), к которым относятся и микобактерии туберкулеза.

При значительной заболеваемости туберкулезом вероятность того, что обнаруженные КУМ являются микобактериями туберкулеза, превышает 95–98%.

Вероятность того, что выявленные КУМ являются микобактериями туберкулеза, зависит также от полученного для исследования материала и от способа его получения. Например, при исследовании мочи вероятность, что обнаруженные КУМ являются сапрофитными микобактериями, значительно выше, чем при исследовании мокроты.

Следует также отметить, что кислотоустойчивость микобактерий не является фиксированным и обязательным свойством клетки и что в начальной фазе своего развития культура микобактерий может содержать некислотоустойчивые формы.

Поэтому микроскопическое исследование материала с целью выявления КУМ не дает полной уверенности в наличии либо отсутствии в диагностическом материале возбудителя туберкулеза ни при положительном, ни при отрицательном результате бактериоскопии. В связи с этим, как правило, микроскопический метод сопровождается более чувствительным и результативным методом исследования – методом посева.

Тем не менее микроскопические исследования играют очень важную роль в выявлении и диагностике туберкулеза.

Диагностика туберкулеза легких бактериоскопическим методом проста, достаточно эффективна, экономически выгодна, так как не требует особого оборудования и химических реактивов.

Преимуществом бактериоскопического метода исследования является также быстрота получения результата.

Данный метод позволяет в короткие сроки выявить наиболее эпидемически опасных больных туберкулезом.

4.2.3. Культуральные методы

Культуральный метод – метод посева диагностического материала на питательные среды – является основным методом выделения микобактерий туберкулеза.

Культуральный метод, так же как и метод микроскопии, относится к прямым диагностическим методам.

Его специфичность превышает специфичность микроскопических методов, а чувствительность значительно выше: **он позволяет выявить МБТ при наличии в 1 мл исследуемого диагностического материала нескольких десятков жизнеспособных особей.**

Кроме того, очень важным *преимуществом* метода культурального исследования перед методом микроскопии является то, что он позволяет выделить культуру возбу-

дителя, которая может быть подробно исследована с определением ее видовой принадлежности, спектра лекарственной устойчивости, вирулентности, молекулярно-генетических характеристик и других свойств.

К недостаткам метода можно отнести его высокую стоимость, сложность обработки диагностического материала, а также медленный рост микобактерий туберкулеза, обуславливающий необходимость длительного ожидания результатов исследования (от 14 дней до 12 недель).

Сравнительная характеристика метода микроскопии с окрашиванием по Цилю–Нильсену и культурального метода представлена в табл. 8.

Таблица 8

Сравнительная характеристика методов микроскопии и посева

Микроскопия по Цилю–Нильсену	Посев
Чувствительность	
40–60% 5000–10 000 КУМ/мл	80% 100–1000 КУМ/мл
Специфичность	
95–98%	99%
Простота выполнения	
Высокая	Средняя
Сложность оборудования	
Сравнительно низкая	Средняя
Стоимость исследования	
Низкая	В 2–3 раза выше
Скорость выполнения	
0,5–1 час	3–4 недели (до 2,5 месяцев – отрицательный результат)
Показания к применению	
А. Выявление больных (скрининг)	А. Больные с респираторными симптомами, клиникой туберкулеза и изменениями на рентгенограммах и 3 отрицательными результатами микроскопии
Б. Контроль химиотерапии. Подтверждение излечения	Б. Внелегочный туберкулез
В. Диагностические исследования	В. Диагностика у детей
	Г. Идентификация <i>M. bovis</i>
	Д. Обследование ВИЧ/СПИД пациентов
	Е. Определение лекарственной устойчивости: <ul style="list-style-type: none"> ■ мониторинг ■ неудачи лечения ■ ВИЧ/СПИД

Приведенные в табл. 8 данные показывают значительно большую чувствительность культурального метода по сравнению с методом микроскопии, а также высокую специфичность.

Однако стоимость культурального метода (включая оборудование, обеспечивающее саму технологию посева и безопасность работы, а также более высокий уровень подготовки персонала) значительно выше, чем для метода микроскопии с окрашиванием по Цилю–Нильсену.

Время, затрачиваемое на получение результата при посеве, также значительно выше, чем при прямой микроскопии: при использовании плотных яичных сред оно составляет в среднем 21–28 дней для положительного результата и до 20 недель для отрицательного результата.

Использование жидких сред и автоматических анализаторов позволяет значительно снизить время культивирования, однако оно все равно достигает 7–14 дней. При этом стоимость оборудования, реактивов и расходных материалов возрастает многократно.

В связи с высокой стоимостью культуральных исследований, в большинстве противотуберкулезных программ их использование ограничивается случаями, когда:

- при наличии симптомов туберкулеза результаты трех микроскопических исследований оказались отрицательными;
- есть необходимость исследовать лекарственную чувствительность штамма-возбудителя (в связи с высоким уровнем распространенности лекарственной устойчивости – для всех новых случаев и случаев повторного лечения; в случае контакта пациента с больным с МЛУ-туберкулезом, неудачи лечения, а также при проведении исследования распространенности лекарственной устойчивости);
- при необходимости определить вид возбудителя (при высоком уровне распространения нетуберкулезных микобактерий или микобактерий бычьего вида);
- при диагностике внелегочного туберкулеза, туберкулеза у детей и ВИЧ-инфицированных пациентов.

В Российской Федерации, согласно Приказу № 109, подтверждение диагноза для всех случаев туберкулеза, так же как и контроль эффективности лечения (ежемесячно), осуществляется методом посева.

Для культуральной диагностики применяются как жидкие, так и плотные питательные среды. Основными плотными питательными средами являются яичные среды *Левеништейна–Йенсена* и *Финна-2*, главными ростовыми компонентами которых являются L-аспарагин и глутамат натрия, которые имеют исключительную ростовую ценность для микобактерий туберкулеза.

Перед посевом диагностический материал подвергают деконтаминации, основной целью которой является удаление нетуберкулезной микрофлоры. В этом случае используют свойство повышенной устойчивости микобактерий туберкулезного комплекса к кислотам и щелочам.

Идеальный деконтаминант должен убивать всю нетуберкулезную микрофлору, полностью сохраняя жизнеспособность микобактерий туберкулезного комплекса. К сожалению, идеального деконтаминанта не существует: убивая нетуберкулезные микроорганизмы, любой из известных деконтаминантов уничтожает и часть популяции туберкулезных микобактерий. Поэтому необходимо строгое соблюдение методов пробоподготовки (прописей деконтаминации) и постоянный мониторинг ее эффективности по доле проростов среди посевов диагностического материала.

Оптимальный уровень проростов составляет 2–5%. При превышении 5% уровня деконтаминация недостаточна, или помещение лаборатории загрязнено посторонней микрофлорой, или не соблюдается температурный режим в термостатной комнате (в термостатах), или время доставки материала из места его сбора в лабораторию слишком велико. При уровне проростов менее 2% деконтаминация избыточна и, вместе с посторонней микрофлорой, теряются и культуры микобактерий туберкулезного комплекса. Деконтаминация избыточна также и в том случае, если в лаборатории не выделяют нетуберкулезные микобактерии.

После посева пробирки помещают в термостат для инкубации при температуре 37 °С. Рост микобактерий туберкулеза чаще наблюдается на 3–6-й неделе, однако возможен более ранний и более поздний рост, в связи с чем посеvy просматривают каждые 7–10 дней и выдерживают в термостате до 10–12 недель. Регистрация результатов посева при наличии роста микобактерий туберкулеза проводится с указанием количества обнаруженных колоний.

Огромное внимание в микробиологической диагностике туберкулеза уделяется определению **лекарственной чувствительности** микобактерий туберкулеза к антибактериальным препаратам, поскольку лекарственная устойчивость возбудителя является одним из существенных факторов, ограничивающих эффективность химиотерапии.

Причины развития лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза могут быть следующими: неадекватные схемы лечения больных, несоблюдение дозировок и режима лечения, низкое качество препаратов, неправильное использование антибактериальных препаратов в общей лечебной сети.

Невыполнение требования стратегии DOTS об обеспечении контролируемой медицинским работником химиотерапии приводит к перерывам в лечении и преждевременной остановке приема препаратов, что, в свою очередь, способствует развитию лекарственной устойчивости МБТ.

Принято разделять два вида лекарственной устойчивости МБТ: **первичная** (начальная) и **вторичная** (приобретенная).

Первичная лекарственная устойчивость – это устойчивость, выявленная у штаммов, выделенных от никогда ранее не лечившихся от туберкулеза (или лечившихся в течение менее 1 месяца) больных до начала лечения. Распространенность устойчивости этого типа отражает уровень распространенности лекарственно устойчивых штаммов на данной территории.

Второй вид устойчивости – **вторичная**, или **индуцированная**, устойчивость, которая развивается в результате неэффективной химиотерапии и характеризует эффективность противотуберкулезных программ.

В основе лекарственной устойчивости МБТ лежат изменения в генотипе штаммов микобактерий, меняющие чувствительность бактериальной клетки к противотуберкулезным препаратам.

Для первичной ЛУ характерна высокая стабильность и наследственная закрепленность, независимо от контакта с антибиотиком. Этот вид лекарственной устойчивости наблюдается у больных при заражении устойчивыми штаммами от больных туберкулезом. Вторичная ЛУ возникает в результате приема определенных концентраций антибактериальных препаратов.

Таким образом, согласно современной международной классификации ЛУ МБТ подразделяют на лекарственную устойчивость среди впервые выявленных боль-

ных туберкулезом (новые случаи) и лекарственную устойчивость среди ранее леченных больных.

Для определения лекарственной устойчивости МБТ в лабораторной практике обычно применяются широко апробированные стандартные методы, наиболее распространенными из которых являются *метод пропорций* и *метод абсолютных концентраций*.

В микробиологических лабораториях большинства стран мира используется *метод пропорций* (метод определения процента устойчивой популяции).

Данный метод основан на сравнении количества выросших колоний на среде с препаратом и на среде без препарата с различными концентрациями бактериальной суспензии. Это дает возможность вычислить процент жизнеспособной популяции при определенной концентрации препарата и определить соотношение устойчивых и чувствительных особей МБТ в исследуемой культуре. Штамм считается устойчивым к препаратам первого ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу) в том случае, если число выросших колоний на среде с препаратом составляет более 1%.

В лабораториях России широкое применение нашел *метод абсолютных концентраций*, который официально утвержден Приказом МЗ РФ № 109. Этот метод основан на определении концентрации противотуберкулезного препарата, ингибирующей рост культуры микобактерий при выращивании их на средах с различным содержанием препаратов.

Для обоих методов используется международная питательная среда Левенштейна–Йенсена, результаты учитываются на 21-й день (для метода абсолютных концентраций) или на 28-й день (для устойчивых штаммов при методе пропорций) и 40-й день (для чувствительных штаммов при методе пропорций) после посева микобактериальной суспензии. Во многих странах применяется модифицированный метод пропорций, когда учет устойчивости и чувствительности МБТ осуществляется на 28-й день.

Основным *недостатком* традиционных методов определения ЛУ МБТ являются длительные сроки получения результатов, обусловленные медленным ростом микобактериальной популяции.

Длительность лабораторного исследования в целом и длительность определения лекарственной чувствительности возбудителя в частности крайне важна как для лечения больного, так и контроля за распространением туберкулезной инфекции.

За последнее десятилетие современный диагностический арсенал значительно расширился за счет ускоренных культуральных и молекулярно-генетических методов идентификации видов микобактерий, а также тестирования лекарственной чувствительности возбудителя.

В настоящее время для сокращения сроков выращивания микобактерий туберкулеза и ускоренного определения лекарственной устойчивости широко применяются методы с использованием жидких питательных сред и автоматизированных систем: BACTEC 460 (Becton Dickinson), BACTEC – MGIT 960 (Becton Dickinson), BACTEC 9000 MB (Becton Dickinson), MB/BacT/Alert 3D (BIOMerieux), VersaTREK.

Например, для ускоренного выявления возбудителя туберкулеза и автоматизированного определения ЛУ МБТ на баканализаторе BACTEC – MGIT 960 (рис. 14) используются пробирки с жидкой питательной средой, в состав которых включен кислородный флуоресцентный сенсор, обеспечивающий индикацию роста. В процессе развития микобактерий в питательной среде снижается концентрация кислорода, что приводит к увеличению степени флуоресценции индикатора. Ярко-оранжевая ок-

раска, проявляющаяся при освещении пробирок MGIT ультрафиолетом, свидетельствует о положительном результате посева.

Использование данной автоматизированной системы дает возможность получать результаты по выявлению возбудителя и тестированию лекарственной резистентности намного быстрее, чем при использовании традиционных методов и плотных питательных сред.



Рис. 14 Автоматизированная система BACTEC – MGIT 960

Сочетание культивирования на автоматическом анализаторе с молекулярно-генетическими тестами позволяет провести выявление микобактерий в диагностическом материале, определение их видовой принадлежности и наличие устойчивости/чувствительности к рифампицину (маркеру МЛУ) в течение 7–10 дней.

Однако широкое применение культурального метода с использованием автоматизированных систем может быть затруднено из-за дорогостоящего оборудования и питательных сред.

Таким образом, существующие традиционные бактериологические методы определения лекарственной чувствительности МБТ требуют значительных затрат времени, в то время как автоматизированные методы являются дорогостоящими.

Трудности, связанные с организацией в лаборатории ускоренной диагностики туберкулеза нередко возникают из-за недостаточного финансирования. Поскольку не всегда удастся приобрести дорогостоящие автоматизированные системы, то возникает необходимость использования более дешевых методик.

В заключение отметим следующее:

Микробиологические исследования являются одними из наиболее важных диагностических тестов при заболеваниях органов дыхания, способствующих своевременной диагностике инфекционного заболевания и позволяющих ориентировать врача на правильный диагноз, а также определить выбор лекарственных препаратов для адекватной антибактериальной терапии.

Подписано к печати 05.02.2008 г.
Гарнитура Miniature. Печать офсетная. Бумага мелованная. Формат 60×90 1/8.
Усл. печ. л. 5. Тираж 2400 экз.

ООО «Издательство «Триада». ИД № 06059 от 16 октября 2001 г.
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 504, тел./факс: (4822) 42-90-22, 35-41-30. E-mail: triada@stels.tver.ru
<http://www.triada.tver.ru>

Заказ 250
Отпечатано в филиале ОАО «ТОТ» Ржевская типография (г. Ржев, ул. Урицкого, д. 91)



