**Эпидемическая ситуация по туберкулёзу в России**

Эпидемическая ситуация по туберкулёзу в нашей стране осложнилась в начале 90-х годов. Численность впервые выявленных больных туберкулёзом по сравнению с 1990-м годом увеличилась к 2003 году более чем в 2 раза, в 1,5 раза возросла смертность по причине туберкулёза.

В структуре клинических форм стало больше пациентов, страдающих распространёнными, запущенными и осложнёнными формами, а так же больных, выделяющих лекарственно-устойчивые микобактерии туберкулёза, снизилась эффективность лечения больных туберкулёзом. При этом сохраняются резко выраженные различия в разных регионах страны, в первую очередь в отношении туберкулёза органов дыхания.

Основные мероприятия по реализации стратегии противотуберкулёзной помощи населению РФ определены под программой «Неотложные меры борьбы с туберкулёзом в России» федеральной целевой программы "Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера".

**Токсическое воздействие микобактерий**

В альвеолах пораженного участка легкого, помимо клеточных элементов, скапливается экссудат с большим содержанием фибрина. Токсическое воздействие микобактерий на окружающую их легочную и некоторые другие ткани столь велико, что в центре бугорка, как правило, образуется зона погибших клеток, зоны некроза, которые носят при туберкулезе казеозный (творожистый) характер.

В последующем на месте эпителиоидного бугорка развивается фиброзный рубец. Если казеозный некроз сохраняется, то вокруг очага развивается фиброзная капсула. Исследования последних лет показали, что в условиях раннего применения противотуберкулезных препаратов поражения в легких могут рассасываться с восстановлением нормальной легочной ткани.

При массовом инфицировании, в результате длительного контакта с бациллярным больным или при попадании микобактерий в ослабленный организм, в ткани легкого развивается воспалительный процесс с преобладанием экссудативной реакции и развитием участков специфической (туберкулезной) пневмонии, с выраженной наклонностью к творожистому некрозу и с последующими гнойным расплавлением омертвевших участков. Жидкий гной прорывается в близлежащий бронх. Вместо гноя в воспаленную ткань проникает из бронха воздух.

Так формируется полость в легком – каверна (от латинского cavium – пещера) или участок деструкции – разрушения. Образование каверны – переломный момент в жизни больного туберкулезом. При неблагоприятных условиях микобактерии, распространяясь из каверны по бронхам, вызывают поражение здоровых до того участков легочной ткани. Заболевание переходит в заключительную фазу – легочную чахотку (по-гречески – фтизу), которая и дала название медицинской специальности, изучающей туберкулез, – фтизиатрии.

В различные периоды развития туберкулезной инфекции преобладают либо клеточные элементы воспаления с последующим формированием фиброза, либо экссудативное воспаление пневмонических зон и участков распада.

**Характеристика туберкулёзных бактерий**

Туберкулезные бактерии подразделяются на три типа: humanus (человеческий), bovinus (бычий), avium (птичий). Туберкулезные бактерии типа humanus тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 2,5–3,5 µ, толщиной 0,3 µ.

Они отличаются значительным полиморфизмом: встречаются палочки длиной до и больше, а также со вздутиями на концах или же короткие, иногда в форме кислотоустойчивых зерен и кислотоподатливых зерен Муха.

Туберкулезная палочка может переходить в фильтрующиеся формы. Некоторые формы теряют кислотоустойчивость, но остаются грамположительными (зерна Муха и др.). Палочки типа bovinus в мазках из чистых культур короче и толще, чем бактерии типа humanus, а тип avium более полиморфен.

Туберкулезная бактерия – аэроб. Она растет на жидких средах в виде пленки по поверхности, при достаточном доступе кислорода. Она требовательна к питательным средам. Для культивирования применяют картофельные и яичные среды с глицерином, а также синтетические среды. На всех средах рост медленный, в течение 2–4 недель. Культура на плотной среде растет в виде сухих крупинок кремового цвета. Устойчивость туберкулезных бактерий особенно велика к высушиванию и действию дезинфицирующих веществ. Сухой жар (100°) они выносят в течение часа, но при воздействии прямых солнечных лучей быстро погибают. Находясь в мокроте, они остаются жизнеспособными при 60° в течение часа, но погибают при пятиминутном кипячении.

Туберкулезные палочки не выделяют экзотоксина. Белковая субстанция, получаемая в виде экстракта из убитых тел бактерий, носит название туберкулина. Зараженный организм проявляет повышенную чувствительность к туберкулину. Все типы туберкулезных бактерий патогенны для лабораторных животных, из которых наибольшей чувствительностью обладает морская свинка.

**Техника люминесцентной микроскопии**

**Микроскопию** проводят при увеличении 250х (например, увеличение объектива 25х, окуляра – 10х). Для детального изучения морфологии необходимо просмотреть их при увеличении 400х. Микобактерии окрашиваются в виде золотистых палочек.

Для детального изучения можно также применять иммерсионную систему. Для иммерсионных объективов используют не люменсцирующее вазелиновое масло. Предметные стекла должны быть без царапин. Для люминесцентной микроскопии используют люминесцентные микроскопы, при микроскопии достаточно просмотреть 30 полей зрения, в связи, с чем на каждый Мазок тратится значительно меньше времени.

Для микобактерий туберкулеза характерно золотисто-желтое свечение, в то время как, кислотоустойчивые сапрофиты при окраске смесью аурамина и родамина имеют свечение зеленоватого опенка. Ярко-красное свечение на зеленом фоне или золотисто-желтое – на темно-зеленом фоне характерно при окрашивании мазков по «Адамчику». Однако этот признак нельзя считать обязательным. Кислотоустойчивые сапрофиты отличаются большим полиморфизмом, поэтому следует учитывать и этот факт при бактериоскопии мочи и гной содержащего материала.

**Количественная оценка результатов микроскопии**

При просмотре мазков, окрашиваемых для люминесцентной микроскопии, как правило, используется меньшее увеличение (250–630), по сравнению с увеличением, используемым при просмотре мазков по методу Циль-Нельсена (1000). Таким образом, число кислотоустойчивых бактерий (КУБ), найденных при люминесцентной микроскопии мазка (увеличение 250), будет значительно больше, чем подобный результат мазка, полученный при окраски мазка по методу Циль-Нельсену (увеличение 1000). Увеличение рассчитывается методом умножения показателей величин окуляра и объектива.

Например: при микроскопии мазков, окрашенных по методу Циль-Нельсену увеличение составляет 1000 (объектив 100 и окуляр 10), при люминесцентной микроскопии 250 (объектив 25 и окуляр 10) чаще 280 (объектив 40, окуляр 7).

Чтобы избежать заблуждений, при выдаче положительных результатов, предлагается провести количественный пересчет, выявленных микобактерий в зависимости от использованного метод микроскопии и увеличения.

В последние годы довольно широкое распространение получил метод люминесцентной микроскопии. Он основан на различии свечения микроскопируемого объекта в ультрафиолетовом или коротковолновом спектре видимого света. В основе применения этого метода для дифференциации микобактерии туберкулеза лежит способность липидов этих бактерий воспринимать люминесцентные красители и затем светиться при облучении ультрафиолетовыми лучами. В зависимости от применяемых красителей микобактерии туберкулеза дают четкое ярко-красное свечение на зеленом фоне или золотисто-желтое – на темно-зеленом фоне. Этим методом можно исследовать любой материал, кроме мочи, в которой могут быть сапрофиты, трудно дифференцируемые при такой окраске. Последние имеют зеленоватый или апельсиновый оттенок. Наиболее широко распространены методы окраски акридиновым оранжевым по Адамчику и окраски аурамином-родамином.

При микроскопии мазков по люминесцентному методу высокая контрастность микроскопической картины дает возможность проводить исследования при малых увеличениях (объектив х40, окуляр х10). При такой микроскопической системе увеличивается одномоментно просматриваемое поле зрения (по сравнению с иммерсионной микроскопией). Это позволяет выявлять единичные микобактерии и делает люминесцентный метод особенно ценным при исследовании олигобациллярного материала. Люминесцентная микроскопия значительно сокращает время, затрачиваемое на нахождение единичных микобактерии туберкулеза, позволяет быстро просмотреть весь препарат и, следовательно, повысить число находок.

**Окраска мазков по Цилю-Нильсену**

Приготовленные, как описано выше, мазки покрывают фильтровальной бумагой и наносят 1,5–2,0 мл карболового фуксина па один мазок, затем медленно нагревают предметное стекло с мазком над пламенем горелки по появления пара.

При этом не допускают кипение фуксина и высушивание материала. Мазок с прогретым раствором оставляют на 5 минут. Затем удаляют фильтровальную бумагу и аккуратно смывают остатки краски со стекла проточной водой.

Обесцвечивание проводят 25% раствором серной кислоты (2 мл на мазок) в течение З минут. Затем стекло промывают проточной водой и дополнительно обрабатывают 96% этиловым спиртом (2 мл на мазок) в течение 5 минут. Гашение фона достигается обработкой 0,3% раствором метиленового синего в течение 30–60 секунд.

Приготовление растворов

(Все растворы готовятся с использованием дистиллированной воды)

1). Насыщенный спиртовой раствор фуксина: основной фуксин – 3 г растворяют в – 100 мл 96% этилового спирта.

2). Рабочий раствор фуксина: кристаллы фенола 5 г медленно нагревают до расплавления, доливают 90 мл воды, затем в полученный раствор фенола добавляют 10 мл насыщенного раствора фуксина.

3). 25% серная кислота: в 300 мл воды доливают 100 мл 98% (концентрированной) серной кислоты. Данная манипуляция проводится с крайней осторожностью!

4). 0,3% метиленовый синий: 0,3 г метиленового синего растворяют в 100 ил воды.

Для исследования окрашенных мазков используют бинокулярный микроскоп с иммерсионным объективом (х90 или х100 объектив, 7–10 окуляр). Исследуют не менее 100 микроскопических полей зрения в течение 5 минут. Ели МБТ не обнаружены, исследуют еще 100 полей зрения. Микобактерии выглядят как тонкие, прямые или слегка изогнутые палочки длиной 1–4 мкм и диаметром 0,2–0,5 мим, рубинового цвета, иногда с выраженной зернистостью.

Для культивирования микобактерии туберкулеза используют различные питательные среды: плотные, полужидкие, жидкие (синтетические и полусинтетические). Однако ни одна из них не обладает качествами, предъявляемыми к ним современной бактериологической диагностикой туберкулеза. В связи с этим для повышения результативности культурального метода рекомендуется применять посев патологического материала одновременно на несколько (2–3) питательных сред. Для выделения чистых культур микобактерии туберкулеза чаще всего применяют различные по составу плотные питательные среды. В качестве стандартной среды для первичного выделения возбудителя и определения его лекарственной чувствительности ВОЗ рекомендована среда Левенштейна – Йенсена. Это плотная яичная среда, на которой хороший рост микобактерии туберкулеза получают на 15–25-й день после посева бактериоскопически положительного материала.

В последние годы широкое распространение в нашей стране получила яичная среда II, предложенная Э.Р. Финном (среда Финна-II). Она отличается от среды Левенштейна – Йенсена тем, что вместо b-аспарагина в ней используется глутамат натрия. На этой среде рост микобайтерий туберкулеза появляется на несколько дней раньше, чем на среде Левенштейна – Йенсена. Процент выделения культур на этой среде на 6–8% выше, чем на среде Левенштейна – Йенсена.

Для повышения вероятности получения роста микобактерии рекомендуется засевать патологический материал на 2–3 различные по составу питательные среды одновременно. В настоящее время, кроме безаспарагиновой среды Финна-И, в практику внедряется еще одна безаспарагиновая среда, разработанная В.А. Аникиным. По данным Московского НИИ туберкулеза, применение сред, сбалансированных по солевому составу и источникам азотистого питания иначе, чем среда Левенштейна – Йенсена, культуральная диагностика туберкулеза улучшается в среднем на 6,7%. Это особенно важно при таких формах туберкулеза, при которых возбудитель паразитирует в условиях ацидоза и анаэробиоза, в частности, при туберкулезе мочеполовых органов.

Для повышения результативности культурального метода наряду с применением одновременно нескольких различных по составу питательных сред для посева рекомендуется повторное многократное исследование материала, так как в настоящее время отмечается состояние олигобациллярности у большинства больных даже со свежевыявленными деструктивными поражениями в легких. Олигоба-циллярность проявляется не только малым количеством возбудителей в диагностическом материале, но и транзиторностью, эпизодичностью их выделения. Поэтому часто посев даже на 3 различные питательные среды не обеспечивает полной информации о состоянии бактериовыделения.

Для повышения информативности культурального метода практикуется повторное многократное исследование материала от больных. По данным Центрального НИИ туберкулеза, методика 3-кратного первичного комплексного исследования бактериоскопическими и культуральными методами у впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких дает дополнительно 3,4% положительных результатов, а у больных хроническим деструктивным туберкулезом, лечившихся до поступления в стационар, – 5,8% по сравнению с данными одноразового исследования. Однако, по данным ряда авторов, и 3-кратные посевы недостаточны для выявления истинной картины бактериовыделения. Так, установлено, что при обследовании нелечившихся больных максимальный прирост информации о бактериовыделении можно получить при 6-кратных повторных посевах материала, при этом количество положительных результатов возрастает на 36–37% по сравнению с данными 3-кратного посева. У больных после 3-месячного лечения ценность многократного исследования патологического материала методом посева возрастает и при 6-кратном исследовании показатель прироста положительных результатов может достигать 70%, а после 6 мес. лечения он возрастает до 82%.

Таким образом, кратность исследования и состав питательных сред имеют важное значение для культуральной диагностики туберкулеза.

В связи с тем что в процессе интенсивной химиотерапии происходит повреждение различных метаболических систем микробной клетки, ряд микроорганизмов в микобактериальной популяции утрачивает способность нормально развиваться на питательных средах. Отмечается снижение жизнеспособности микобактерий, что может проявляться отсутствием роста на общепринятых питательных средах, а также возникновением способности расти только на осмотически сбалансированных (полужидкие или даже жидкие) питательных средах. Так, по данным И.Р. До рожковой, в процессе интенсивной противотуберкулезной химиотерапии часть микобактериальной популяции, утрачивая способность расти на плотных питательных средах, в то же время приобретает свойство расти на полужидких питательных средах, образуя микроколонии в верхнем наиболее аэрируемом участке питательной среды. Эта потребность в повышенной аэрации четко проявляется также при культивировании микобактерий в жидких питательных средах с увеличенной аэрацией, которая достигается при культивировании посевов во вращающемся термостате (Н.М. Макаревич).

После посева и закрытия пробирок материал должен быть распределен по всей поверхности питательной среды, для этого пробирки наклоняют. Пробирки должны находиться в горизонтальном положении в течение 24–48 ч, после чего их следует перевести в вертикальное положение.

Посевы нужно просматривать еженедельно. При этом обязательно регистрируются параметры: а) появление роста – срок появления, начиная со дня посева; б) интенсивность роста – число колоний, этот показатель имеет большое диагностическое и прогностическое значение, особенно если посевы производятся в динамике; в) загрязнение посева посторонней микрофлорой или грибами; г) отсутствие роста.

При первичном посеве бактериоскопически отрицательного материала на плотные среды средняя продолжительность роста составляет 20–46 дней. Отдельные штаммы растут 60 и даже 90 дней. Это заставляет выдерживать посевы в термостате в течение 3 мес., еженедельно проверяя появление роста.

Обычно вирулентные культуры микобактерий туберкулеза растут на плотных питательных средах в виде R-форм колоний различной величины и вида. Колонии сухие, морщинистые, цвета слоновой кости, но в случае диссоциации могут встречаться и влажные, слегка пигментированные колонии, розовато-желтый пигмент которых резко отличается от оранжевого или желтого пигмента сапрофитных или атипичных микобактерий. Последние обычно растут в S-форме. Следует отметить, что на среде Финна-II колонии микобактерий туберкулеза могут быть более влажными.

После курса химиотерапии от больных туберкулезом могут выделяться гладкие колонии с влажным ростом (S-формы). Гладкие колонии характерны также для Mycobacterium bovis, которые также патогенны для человека.

Положительный ответ дают только после микроскопии мазка из выросших колоний, окрашенного по Цилю–Нильсену. В мазках обнаруживаются ярко- и темно-красные палочки, лежащие одиночно или группами, образующие переплетения в виде «войлока» или «кос», часто видны темные зерна, особенно в длительно растущих культурах. В молодых культурах микобактерий туберкулеза (особенно выделенные от больных, длительно леченных химиопрепаратами) часто отличаются большим полиморфизмом, вплоть до появления коротких, почти кокковидных форм.

Интенсивность роста обозначают по 4-балльной системе: + единичные колонии; ++ от 20 до 100 колоний; +++ от 100 до 200 колоний; мм несосчитываемое число колоний (сливной рост). В двух последних случаях имеется обильное бактериовыделение, которое является показателем активности процесса и / или неэффективности лечения.

Если морфология колоний или палочек вызывает сомнения в их туберкулезной природе или культуры выделены из материала, который может содержать кислотоустойчивые сапрофиты (моча, гной из ушей и др.), мазки дополнительно обесцвечивают спиртом (в течение 45–60 мин) или жавелевой водой (в течение 1–2 ч). Следует учитывать, что молодые культуры микобактерий туберкулеза могут обесцвечиваться спиртом и жавелевой водой, так как они еще слабо кислотоустойчивы. В таких случаях культуры следует выдержать еще несколько дней (5–10) в термостате и вновь повторить микроскопическое исследование, чтобы убедиться в их кислотоустойчивости.

Авирулентные сапрофитные и атипичные микобактерий обычно грубее, толще, иногда менее интенсивно окрашены и, как правило, не образуют жгутообразных сплетений (корд-фактор отсутствует). Однако некоторые виды атипичных микобактерий (фотохромогенные) могут расти в R-форме. Многие атипичные и сапрофитные микобактерий имеют кислотоустойчивые зерна, весьма сходные с таковыми у вирулентных микобактерий туберкулеза.

В тех случаях, когда выделяются культуры, вызывающие сомнения в плане их принадлежности к микобактериям туберкулеза, их изучают, используя комплекс специальных исследований, позволяющих дифференцировать типичные микобактерий туберкулеза от нетуберкулезных (атипичных) микобактерий и кислотоустойчивых сапрофитов.

Как отмечалось выше, в случае появления на питательных средах роста колоний и установления с помощью микроскопии окрашенных по Цилю–Нильсену мазков факта, что выросшая культура относится к кислотоустойчивым микобактериям, производится количественная оценка результатов посева. С этой целью применяют различные схемы оценки (одна из них приведена выше). В Центральном НИИ туберкулеза используют количественную оценку бактериовыделения методом посева по 3 степеням: 1) скудное – на плотных питательных средах вырастает 1–20 колоний во всех пробирках, использованных для данного посева; 2) умеренное – от 21 до 100 колоний во всех пробирках; 3) обильное – обнаруживается рост более 100 колоний во всех пробирках.

Таксономическая характеристика – Четыре группы микобактерий

Первая группа – фотохромогенные микобактерии

Вырастают в темноте беспигментными (в термостате) в течение 3–6 недель, но после освещения дневным или электрическим светом приобретают пигмент желтого или желто-оранжевого цвета. К ним относятся: М. kansasii, М. simiае, М. balnеi. Наибольшее значение в легочной диагностике имеют М. kansasii.

М. kansasii (М. lucitlavum) выделены и описаны Булер и Поллак в 1953 г. как возбудитель заболеваний людей. На яичной среде растут в виде шероховатых или гладких колоний, температурный оптимум 37°С.

Морфологические бактерии умеренной длины. Описаны 2 варианта М. kansasii: оранжевый (auranticum) и белый (album). Отличаются они только способности образовывать пигмент, который зависит от наличия каротиноидов. Остальные свойства указанных вариантов – одинаковы.

При введении морским свинкам вызывают инфильтраты и уплотнения регионарных лимфоузлов. Встречаются в водоемах. Природный источник не установлен.

Вторая группа – скотохромогенные микобактерии

Образуют желто-оранжевый пигмент при росте в темноте, растут медленно 30–60 дней. К ним относятся М. aquae (М. gordonae), М. scrofulaceum.

М. scrofulaceum выделены Приссик, Массой (1958) из гноя лимфатического узла ребенка с лимфаденитом. На яичной среде растут в виде оранжевого цвета гладких или шероховатых колоний. Морфологически короткие или длинные палочковидные формы. Растут при 25–37°С. Вызывают у детей поражения лимфоузлов и легких.

М. aquae (М. gordonae, Tab-water scotochromogen – скотохромогены водопроводной воды). Выделены и описаны Бойялил с сотр. (1962). На яичной среде растут в виде оранжевых колоний при 25–37°С. Морфологически палочковидная форма умеренной длины (приблизительно 0,5 мкм). Обнаружены в водоемах. Для лабораторных животных не патогенны.

Третья группа нефотохромогенные микобактерии

Данные микобактерии не образующие пигмента или имеющие бледно-желтую окраску, которая не усиливается под воздействием света. Растут в течение 2–3-х или 5–6-ти недель. К ним относятся М. avium, М. xenopi, М. terrae, М. gastri, М. intracellulare, М. hattey, М. bruiiense. Последние описаны Куттино, Мак Кабе, Раньон (1965). М. avium дают рост на среде Левенштейна-Йенсена в виде пигментированных колоний при 37°С и 45°С. Морфологически – средней длины палочки. Патогенны для человека и для ряда лабораторных животных, а также для домашних животных (например, свиней). Встречаются в воде, в почве.

М. xenopi (М. littorale). Описаны Швабахер (1959). Выделены от жабы. Молодые культуры растут в виде непигментированных колоний; позднее появляется пигмент желтого цвета. Морфологически – длинные нитевидные палочки. Растут при 40°–45°С, патогенны для человека.

М. terrae (Radish bacillus) бациллы редьки. Описаны Вайном (1966). Растут на среде Левенштейна-Йенсена в виде бес пигментных колоний. Оптимум роста 37 °С. Морфологически – палочка умеренной длины. Чаще всего для человека не патогенна. Встречается в окружающей нас природе.

Четвертая группа – быстрорастущие микобактерии

Растут в виде пигментных или бес пигментных колоний, чаще в виде R-формы. Хороший рост дают в течение 2–5 дней при 25°С. К этой группе относятся потенциально патогенные микобактерии М. fortuitum и такие сапрофиты, как М. phlei, М. sniegmatis и др.

М. fortuitum (М. minetti, М. giae) выделены и описаны Круз (1933), Пенсо (1952). Рост в субкультурах на личной среде появляется на 2–4-й день в виде «розетки». Морфологически – короткие палочки. На среде Левенштейна–Йенсена могут поглощать краску и окрашиваться в зеленый цвет. Условно – патогенные для человека. Сапрофитные микобактерии широко распространены в природе.