

УДК 504.055(043.5)

А.А. Ковалёва

*ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова
НАМН Украины», г. Харьков*

ПРОБЛЕМА ТУБЕРКУЛЁЗА И НЕКОТОРЫЕ ПОДХОДЫ К УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЕГО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Рассмотрены общая тенденция эпидемиологической ситуации по туберкулёзу, скрининговые методы выявления этого заболевания, вопрос достоверности бактериоскопического исследования мазков мокроты, причины и следствия ошибок. Предложен вариант количественной оценки результата бактериоскопии.

Ключевые слова: туберкулёз лёгких, бактериоскопия мазков мокроты, кислотоустойчивые микобактерии.

Заболеваемость туберкулёзом фактически вышла из-под контроля во всём мире и приобрела характер глобальной опасности. По далеко не полным статистическим данным ВОЗ, от туберкулёза ежегодно погибает 3 млн человек, на сегодня это одна из опаснейших и самых распространённых в мире инфекционных социально значимых болезней. «Туберкулёзный кризис» в полной мере развернулся и усугубляется на фоне экологических катастроф, политических и социальных неурядиц, а также мирового экономического кризиса последних лет. Несомненно, сочетание СПИДа с туберкулёзом при неуклонном понижении иммунной защиты популяции людей в целом уже в обозримом будущем будет иметь резко негативные последствия.

С 1995 г. Украина официально считается страной, охваченной эпидемией туберкулёза. Согласно данным ВОЗ, наша страна резко опережает другие европейские государства как по уровню заболеваемости, так и по её распространённости [1].

В условиях эпидемии, под воздействием экологических факторов, при несоблюдении международных протоколов химиотерапии и химиофилактики существенно изменяются и основные биологические свойства возбудителей. За последние годы количество заболеваний туберкулёзом, вызванных атипичными по морфологическим характеристикам возбудителями с сохранившимися вирулент-

ными и патогенными признаками, неуклонно возрастает. При этом несвоевременно выявленные больные продолжают в течение длительного времени элиминировать микобактерии, оставаясь активным источником инфекции. Ситуация осложняется тем, что общепринятыми методами не всегда возможно своевременно бактериологически определить и культурально выделить возбудителя патологического процесса. Необходимость существенного усовершенствования методов детекции атипичных микобактерий несомненна. В последние годы для обнаружения возбудителя достаточно широко используются методы генетического и иммунологического анализа, к сожалению, они пока ещё не всегда доступны. Невзирая на численность методов многофакторного исследования, интерпретация результатов всегда неоднозначная, а нередко и противоречивая. «Золотым стандартом» лабораторной диагностики туберкулёза на сегодня остаётся микробиологическое исследование – бактериоскопия и посев на питательные среды. Необходимы постоянный мониторинг лекарственной чувствительности микобактерий, а также более совершенные питательные среды для их изучения, стабильного, длительного сохранения наиболее интересных изолятов.

Названное обуславливает необходимость настойчивого и целенаправленного поиска эффективных, надёжных и доступных прак-

© А.А. Ковалёва, 2012

тическому бактериологу методов и средств индикации и детекции возбудителей туберкулёза и его атипичных форм.

В последние 30–40 лет для выявления туберкулёза широко использовалось массовое обследование с помощью флюорографии. В Украине это так называемое «активное выявление» больных широко применяется до настоящего времени, однако получаемое рентгенологическое изображение далеко не всегда специфично для туберкулёза, а эффективность метода крайне низка (по данным разных авторов, от 0,004 до 0,03 %) [2]. Подавляющее большинство развитых стран уже на протяжении около 20 лет флюорографию массово не используют.

Микроскопия мазка мокроты является наиболее доступным и достаточно эффективным методом выявления источников туберкулёзной инфекции. Этот метод чаще всего используется для диагностики заболевания у лиц с подозрением на лёгочную патологию, а также для установления источников инфекции среди лиц с жалобами на кашель, обратившихся в лечебные учреждения по самым различным поводам. Микроскопию мокроты используют также для оценки динамики патологических изменений в процессе лечения и с целью контроля его эффективности [3–5].

Основное внимание следует обращать на взрослых, пришедших в лечебные учреждения с жалобами на длительно сохраняющийся кашель. Именно среди них следует проводить тщательный скрининг, применяя прежде всего метод бактериоскопического исследования мазка мокроты и проводя её культуральное исследование.

Количество кислотоустойчивых микобактерий, обнаруженных при микроскопическом исследовании, является очень важным показателем, поскольку во многих случаях коррелирует со степенью эпидемической опасности больного и тяжестью заболевания. Поэтому результат микроскопического исследования должен быть охарактеризован не только качественно, но обязательно и количественно.

При правильном приготовлении мазка количество бактерий в препарате с высокой вероятностью будет соответствовать их количеству в мокроте. Количественные взаимоотношения между этими двумя показателями

были изучены многими исследователями [6–9]. Приведём следующий пример.

Количество мокроты в мазках на предметном стекле составляет около 0,01 мл. Мокрота в мазке распределена на поверхности стекла площадью приблизительно 200 мм² (10×20 мм). Поскольку площадь поля зрения микроскопа при использовании объектива с иммерсией составляет около 0,02 мм², для исследования всего мазка необходимо исследовать 10 000 таких полей зрения при увеличении в 1000 раз (в 100 раз иммерсионный объектив и в 10 раз окуляр). Правда, размеры поля зрения при флюоресцентной микроскопии в 15 раз больше, если используется объектив с увеличением в 25 раз и окуляр с увеличением в 10 раз.

При скрининге по одной линии мазка (20 мм) можно просмотреть 100–120 микроскопических полей зрения, или около 1 % площади всего мазка. Приведённые расчёты относятся к мазкам размерами 10×20 мм. Таким образом, если в 1 мл образца мокроты содержится около 5000 бактерий, то во всём мазке (если он приготовлен в соответствии со стандартом) будет находиться около 50 бактерий. При условии равномерного распределения по всем 10 000 полям зрения на 200 полей зрения придётся всего одна кислотоустойчивая бактерия. При исследовании 100 полей зрения достоверность выявления туберкулёзных микобактерий будет составлять всего 50 %. Следовательно, для того, чтобы обнаружить три кислотоустойчивые микобактерии (минимальное количество, которое рекомендовано ВОЗ для того, чтобы результат анализа считать положительным), придётся исследовать около 600 полей зрения. При исследовании примерно 300 полей зрения достоверность выявления трёх кислотоустойчивых микобактерий составит около 50 % [10–12].

Для того, чтобы была возможность обнаруживать одну бактериальную клетку в каждом 10 полях зрения (или 10 бактериальных клеток в 100 полях зрения), необходимо, чтобы во всём мазке (1000 полей зрения) было около 1000 таких бактерий, что эквивалентно содержанию 100 000 (10⁵) бактерий в 1 мл мокроты (табл. 1).

Количество кислотоустойчивых микобактерий в мазках, концентрация микобактерий

Таблиця 1. Порядок видачі результатів бактериоскопічного дослідження при окрашиванні мазків по методу Циля–Нильсена

Кількість мікобактерій в мазку	Кількість полів зору (п/з)	Результат	Оцінка ступеня обсеменення і форма відповіді
Відсутні	300	Отрицательний	Не виявлено в 300 п/з
4–9	100	Положительний (недостаточне кількість)	Вказати точне число виявлених мікобактерій (4–9 на 100 п/з)
10–99	100	Положительний	1+ (10–99 в 100 п/з)
1–10	В п/з	»	2+ (1–10 в 50 п/з)
> 10	В п/з	»	3+ (> 10 в 20 п/з)

в мокроті і достовірність отримання позитивного результату бактериоскопічного дослідження були встановлені авторами [9]. Отримані ними результати показали, що достовірність виявлення кислотоустойчивих бактерій в мазках тем вище, чем більше цих мікроорганізмів присутствует в біологічному матеріалі. Зменшення кількості бактерій в мокроті нижче визначеного рівня знижує достовірність того, що ці бактерії будуть перенесені з мокроты в матеріал мазка, і, відповідно, достовірність їх виявлення при бактериоскопічному дослідженні приближається до нуля.

Аналіз даних, отриманих нами і авторами [9], показує 50%-ну достовірність виявлення кислотоустойчивих мікобактерій в мазках при наявності около 6000 мікроорганізмів в 1 мл мокроты. Аналогічні результати досліджень були опубліковані раніше в роботах [7, 8].

Хоча учені утверждають, що при оптимальній лабораторній техніці позитивні результати бактериоскопії мазка можуть бути отримані при наявності 100–1000 кислотоустойчивих мікобактерій в 1 мл мокроты [13], на практиці позитивні відповіді мікроскопії мазка можна отримати при наявності не менше 10 000 мікобактерій в 1 мл мокроты.

Для виявлення по одній бактеріальній клітці в кожному полі зору в 1 мл зразка біологічного матеріалу повинно міститися 10^6 кислотоустойчивих мікобактерій. Звичайно ж зразки матеріалу, в яких виявляються мікобактерії при світловій бактериоскопії, містять не менше 10^5 мікробних тіл в 1 мл.

Понятно, що лаборанту переглянути всі поля зору неможливо фізично, тем більше в умовах великої навантаження і нехватки часу. Згідно рекомендаціям ВОЗ, необхідно дослідити не менше 100 полів зору і для цього достатньо 5 хвилин. Якщо при такому дослідженні мікобактерії не виявлені, матеріал оцінюють як негативний.

Згідно «Інструкції по бактериологічній діагностиці туберкульозної інфекції» [14], при окрасці мазків по методу Циля–Нильсена слід переглянути не менше 300 полів зору в течение 15 хвилин, перш ніж дати відповідь. Рекомендований порядок видачі результатів представлений в табл. 1.

При дослідженні якісно відібраного біологічного матеріалу такий розрахунок цілком уместен. Однак досвідчені лаборанти і мікроскопісти враховують якість матеріалу по мікроскопічній картині, передішньому діагнозу, цілі направлення пацієнта на дослідження (діагностика захворювання або контроль лікування). Тому далеко не в кожному випадку спеціаліст в стані впевнено видавати негативний або позитивний відповідь після дослідження лише 300 полів зору. На практиці часто досліджується 600 і більше полів зору, що є більш достовірним і надійним.

Відповідно до вказаного наказом позитивний відповідь можна дати при виявленні чотирьох кислотоустойчивих мікобактерій. Не визначено, як слід поступати в тих випадках, якщо при дослідженні було виявлено від 1 до 3 кислотоустойчивих мікобактерій: вважати результат позитивним або негативним. До того

же при выявлении от 4 до 9 микобактерий в 100 полях зрения следует отмечать их точное количество. Пока не совсем ясно, в какой форме записать результат, если 4–9 микобактерий обнаружено при исследовании большего количества полей зрения.

Следовательно, рекомендации по оценке результатов бактериоскопического исследования, обозначенные в названном приказе, должны быть пересмотрены с учётом отмеченных расчётов соответствия содержимого кислотоустойчивых микобактерий в мазках и материале, особенностей приготовления препаратов, формы записи результатов. На наш взгляд, более целесообразно использовать оценку бактериоскопического исследования, приведённую в табл. 2.

- ошибки в маркировке стёкол или регистрации материала;
- повторное использование контейнеров для сбора мокроты или предметных стёкол после положительных мазков;
- недостаточно отфильтрованный фуксин;
- контаминация иммерсионного масла;
- неадекватное обесцвечивание;
- контаминация воды микобактериями-сапрофитами окружающей среды.

Получение таких ложноположительных результатов влечет за собой ряд негативных клинических и социальных последствий, в числе которых

- излишняя и даже совсем ненужная терапия для пациента и дополнительный расход химиопрепаратов, возможность проявле-

Таблица 2. Оценка результатов бактериоскопического исследования и форма записи ответа

Количество микобактерий	Минимальное число полей зрения, обязательных для пересмотра	Результат	Форма записи результата
Отсутствуют	300	Отрицательный	Не обнаружено в 300 п/з
1–9	300	Положительный (недостаточное количество)	«←» в 300 п/з*
10–99 в 100 п/з	100	Положительный	1+**
1–10 в каждом п/з	50	»	2+**
> 10 в каждом п/з	20	»	3+**

Примечание. * Отметить точное количество микобактерий; ** соответствие градаций: точное число – единичные микобактерии в препарате; 1+ – единичные кислотоустойчивые бактерии в поле зрения; 2+ – умеренное количество микобактерий; 3+ – значительное количество микобактерий.

Информативность и чувствительность однократного исследования мазка из материала колеблется в широких пределах и составляет 22–43 %. Однако при многократных исследованиях частота выявления микобактерий существенно возрастает. Например, при исследовании двух–трёх мазков мокроты, полученной на протяжении двух дней у больных активным туберкулёзом лёгких, число положительных ответов увеличивается до 50–70 % [15].

Исследователям и практикам следует также помнить, что не так редко встречаются ложноположительные и ложноотрицательные результаты [1–4]. Среди причин, с которыми могут быть связаны ложноположительные результаты при окраске мазка, наиболее часто встречаются следующие:

• побочного действия препаратов; если такой же результат получен при повторном исследовании, например, в конце 2-го месяца лечения, то проводится необоснованное продление интенсивной фазы;

- пациенты теряют доверие к медперсоналу и лабораторной службе.

Среди возможных причин ложноотрицательных результатов – ошибки в маркировке или регистрации материала, плохое качество собранной мокроты или использование вместо мокроты других материалов, чрезмерное обесцвечивание препаратов при окраске, некачественная микроскопия и просмотр менее чем 100 полей зрения. Указанное ведёт к тому, что больные туберкулёзом не получают своевременно необходимого лечения, страдают пациенты, неконтро-

лируемо розповсюджується інфекція і др. Якщо ложноотрицательний результат отримано при повторному дослідженні (в кінці 2-го місяця), то інтенсивна фаза лікування не продовжується, хоча це необхідно, в ітоже лікування неефективне.

В випадку виявлення змінених форм кислотоустойчивих бактерій позитивний відповідь повинен бути підтверджено доповненими методами досліджень.

Персонал лабораторій повинен бути відповідальним образом навчений, досвідчений, його роботу необхідно контролювати, щоб підготувати, окрасити і дослідити мазки мокроты на наявність кислотоустойчивих мікобактерій проводилося точно і на-

дійсно. Якісний контроль за цією роботою обов'язковий.

Возможно, ми злишніе детально виклали загальновідомий матеріал, багаторазово і во всіх деталях описаний в підручниках, методических розробках і інформаційних листах, міжнародних і вітчизняних протоколах обстеження і лікування хворих туберкульозом, однак сам факт, як правило, пізньої діагностики цього важкого захворювання, частіше всього з атипичним перебігом, ховається під різними «масками», свідчить про далеко не повне і правильне використання навіть елементарних і найбільш доступних методів лабораторної діагностики (наприклад, бактеріоскопії).

Список літератури

1. *Фещенко Ю. І.* Менеджмент у фтизіатрії / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник, А. В. Лірник. – К. : Здоров'я, 2007. – С. 680.
2. Виявлення заразних форм туберкульозу легень в лікувальних закладах загально-медичної мережі : посібник для лікарів. – К. : Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України, 2002. – С. 18.
3. Лабораторна діагностика туберкульозу та контроль за якістю бактеріоскопічних досліджень / Г. М. Ліпкан, В. Г. М'ясніков, Т. Л. Скакун [та ін.]. – К. : Медицина, 2006. – С. 15–30.
4. Методические рекомендации по контролю качества лабораторной диагностики туберкулеза методом прямой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю–Нильсену. – Донецк, 2004. – С. 14–16.
5. *Скакун Т.* Лабораторна діагностика туберкульозу в клініко-діагностичних лабораторіях методом мікроскопії : навчальний посібник для медичних працівників лікувально-профілактичних установ загальної лікувальної мережі / Т. Скакун, І. Заїка, К. Кіскініс. – ВООЗ, 2006. – С. 9–11.
6. *De Carvalho E.* Was leistet die mikroskopische Untersuchung, das Kulturverfahren und der Tierversuch bei der Ermittlung kleinster Tuberkelbazillenmengen im Untersuchungsmaterial? [How useful are microscopy, culture methods, and animal experiments in determining the smallest amounts of tubercle bacilli in samples?] Zeitschrift für Tuberkulose. – 1932. – Vol. 63. – P. 305–317.
7. *Cruikshank D. B.* Bacteriology: Modern practice of tuberculosis: Vol. 1 / D. B. Cruikshank, T. H. Sellors, J. L. Livingstone // London, Butterworths, 1952. – P. 53–77.
8. *Hobby G. L.* Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis / G. L. Hobby, M. P. Grinspun, L. G. Rojas // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1973. – Vol. 4. – P. 94–104.
9. *David H. L.* Bacteriology of the mycobacterioses / H. L. David. – Atlanta, GA, US Department of Health, Education and Welfare, Communicable Disease Center, 1976. – P. 147.
10. *Smithwick R. W.* Laboratory manual for acid-fast microscopy / R. W. Smithwick. – Atlanta, US Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, 1976.
11. Technical guide: sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low-income countries, 5th ed. – Paris, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000.
12. American Thoracic Society, Scientific Assembly on Tuberculosis. Diagnostic standards and classification of tuberculosis and mycobacterial diseases. – N.Y., Am. Lung Association, 1974.
13. *Wolinsky E.* Conventional diagnostic methods for tuberculosis / E. Wolinsky // Clinical Infectious Diseases. – 1994. – Vol. 19. – P. 396–401.
14. Приказ МЗ України от 06.02.2002 № 45.

15. American Thoracic Society and Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children // Am. J. Respiratory and Critical Care Medicine. – 2000. – Vol. 161. – P. 1376–1395.

Г.О. Ковальова

ПРОБЛЕМА ТУБЕРКУЛЬОЗУ І ДЕЯКІ ПІДСТУПИ ДО УДОСКОНАЛЕННЯ ЙОГО ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ

Розглянуті загальна тенденція епідеміологічної ситуації з туберкульозу, скринінгові методи виявлення цього захворювання, питання достовірності бактеріоскопічного дослідження мазків мокротиння, причини та наслідки помилок. Запропонований варіант кількісної оцінки результату бактеріоскопії.

Ключові слова: туберкульоз легень, бактеріоскопія мазків мокротиння, кислотостійкі мікобактерії.

А.А. Kovaleva

PROBLEM OF TUBERCULOSIS AND SOME APPROACHES TO IMPROVEMENT OF HIM LABORATORY DIAGNOSTICS

In the article is considered the general tendency of epidemiological situation by tuberculosis, screening methods for detection of this disease, question of reliability bacterioscopic smear sputum, causes and consequences of errors. The proposed version of quantitative estimation results of bacterioscopy.

Key words: tuberculosis, bacterioscopy of smear sputum, acid-resisting.

Поступила 13.03.12