

**СОВРЕМЕННАЯ
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ
ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА**

Минск БГМУ 2018

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФТИЗИОПУЛЬМОЛОГИИ

**СОВРЕМЕННАЯ
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ
ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА**

Учебно-методическое пособие



Минск БГМУ 2018

УДК 616-002.5-07(075.8)
ББК 55.4я73
С56

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве
учебно-методического пособия 22.02.2018 г., протокол № 6

А в т о р ы: канд. мед. наук, доц. М. И. Дюсьмикеева; врач-бактериолог Республиканской референс-лаборатории Республиканского научно-практического центра пульмонологии и фтизиатрии О. М. Залуцкая; канд. мед. наук, доц., зав. каф. фтизиопульмонологии Г. Л. Бородина; канд. мед. наук, доц. П. С. Кривонос; канд. мед. наук, доц. Ж. И. Кривошеева

Р е ц е н з е н т ы: д-р мед. наук, чл.-корр. Национальной академии наук Беларуси Г. Л. Гуревич; канд. мед. наук, доц. каф. пульмонологии и фтизиатрии Белорусской медицинской академии последипломного образования И. В. Коваленко

Современная бактериологическая диагностика туберкулеза : учебно-методическое пособие / И. И. Дюсьмикеева [и др.]. – Минск : БГМУ, 2018. – 30 с.

ISBN 978-985-21-0024-3.

Рассматриваются современные методы лабораторной диагностики туберкулеза. В частности, подробно излагаются методики забора диагностического материала для исследования на туберкулез, микроскопическое исследование для выявления кислотоустойчивых бактерий, культуральное исследование, в том числе с использованием автоматизированных систем для диагностики туберкулеза, а также молекулярно-генетические методы диагностики туберкулеза.

Предназначено для студентов 4–6-го курсов лечебного, медико-профилактического и педиатрического факультетов, врачей-интернов, клинических ординаторов.

УДК 616-002.5-07(075.8)
ББК 55.4я73

ISBN 978-985-21-0024-3

© УО «Белорусский государственный
медицинский университет», 2018

МОТИВАЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕМЫ

Тема занятия: Методы лабораторной диагностики туберкулеза. Методы определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза.

Общее время занятия: 4 часа.

Туберкулез (ТБ) — инфекционное заболевание, которое вызывается микобактерией туберкулеза (МБТ), характеризуется развитием специфических гранулем в различных органах и полиморфной клинической картиной. Наиболее часто поражаются легкие, лимфатическая система, кости, суставы, мочеполовые органы и нервная система. При отсутствии лечения болезнь прогрессирует и может закончиться летальным исходом.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около трети населения планеты — два миллиарда человек — инфицированы МБТ и подвержены риску заболевания туберкулезом.

Туберкулез в Республике Беларусь в последние два десятилетия продолжает оставаться распространенным заболеванием, наносящим значительный ущерб здоровью населения и экономике страны. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Республике Беларусь в последние годы характеризуется высоким уровнем множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя (МЛУ/ШЛУ-ТБ). Это является серьезной угрозой для борьбы с туберкулезом в связи с трудностью лечения МЛУ/ШЛУ-ТБ и высокой стоимостью химиотерапии.

Своевременная бактериологическая диагностика туберкулеза является актуальной задачей в плане скорейшей верификации диагноза, определения лекарственной чувствительности МБТ и проведения профилактических мероприятий, направленных на предотвращение распространения туберкулеза, в том числе с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, среди населения. Для достижения этой цели используются современные методы обследования пациентов и лабораторной диагностики туберкулеза.

Цель занятия: изучить методы детекции и идентификации микобактерий туберкулеза, а также определения их лекарственной чувствительности к противотуберкулезным лекарственным средствам.

Задачи занятия:

- изучить основные свойства возбудителя туберкулеза;
- усвоить правила сбора диагностического материала для исследования на наличие МБТ;
- научиться правильно интерпретировать результаты микроскопического, культурального и молекулярно-генетического методов исследования на наличие МБТ;
- усвоить основные принципы и методы определения лекарственной чувствительности МБТ.

Требования к исходному уровню знаний. Повторить из курса микробиологии с вирусологией и иммунологией:

- таксономическое положение возбудителя туберкулеза;
- морфологическую и биохимическую характеристику возбудителя туберкулеза;
- механизмы формирования лекарственной устойчивости.

Контрольные вопросы из смежных дисциплин:

1. Морфологическая и биохимическая характеристика микобактерий.
2. Методика окраски мазка мокроты по Цилю–Нильсену.
3. Методика флуоресцентной микроскопии.
4. Питательные среды для культурального исследования на выявление МБТ.
5. Лабораторные методы определения лекарственной чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и химиопрепаратам.
6. Молекулярно-генетические методы выявления микроорганизмов в биологическом материале.

Контрольные вопросы по теме занятия:

1. Возбудитель туберкулеза: основные морфологические, тинкториальные и биохимические свойства МБТ.
2. Правила сбора диагностического материала для исследования на МБТ.
3. Микроскопическое исследование мокроты с окраской мазков по Цилю–Нильсену для выявления кислотоустойчивых бактерий.
4. Микроскопическое исследование мокроты с окраской мазков флуорохромами для выявления кислотоустойчивых бактерий.
5. Культуральное исследование на плотных питательных средах для детекции МБТ.
6. Ускоренные методы детекции МБТ с использованием автоматизированных систем: методика, интерпретация результатов.
7. Методы идентификации микобактерий.
8. Определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза на плотной питательной среде и с использованием автоматизированных систем: методика, интерпретация результатов.
9. Молекулярно-генетические методы, используемые для детекции МБТ и определения их лекарственной чувствительности: принцип, интерпретация результатов.

Задания для самостоятельной работы:

1. Провести микроскопию мазка мокроты, окрашенного по Цилю–Нильсену, а также количественную оценку результата.
2. Провести бактериоскопию мазка мокроты, окрашенного флуорохромами.

3. Оценить морфологию и массивность роста микобактерий туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий на питательной среде Левенштейна–Йенсена.

4. Проанализировать результаты бактериологического исследования у курируемых пациентов.

5. Проанализировать результаты определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза с использованием бактериологических и молекулярно-генетических методов у курируемых пациентов.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУБЕРКУЛЕЗА. НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ МИКОБАКТЕРИИ

ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУБЕРКУЛЕЗА

24 марта 1882 года немецкий ученый Роберт Кох на заседании Берлинского физиологического общества сделал доклад «Этиология туберкулеза», в котором представил убедительные данные об открытии им возбудителя туберкулеза. В 1905 г. за «исследования и открытия, касающиеся лечения туберкулёза» Р. Кох удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине. В 1982 г. 24 марта объявлен официальным Всемирным днем борьбы с туберкулезом.

Возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) относится к порядку *Actinomycetales*, семейству *Mycobacteriaceae*, роду *Mycobacterium*, объединяющему патогенные и условно-патогенные виды. В соответствии с определителем бактерий Берджи, *M. tuberculosis* относится к группе 21 Микобактерии, содержащей единственный род *Mycobacterium*.

Клетки микобактерий прямые или слегка изогнутые, имеют размеры 0,2–0,7 × 1,0–10 мкм. Микобактерии не образуют спор, жгутиков, мицелия и капсул. Вирулентные штаммы МБТ обладают так называемым корд-фактором (от англ. cord — жгут, веревка), который формирует образование микроколоний в виде жгутов или кос МБТ. Наряду с другими кислыми липидами он определяет способность возбудителя туберкулеза повреждать макрофаги и препятствовать завершению фагоцитозу. Вирулентные МБТ после фагоцитоза макрофагами не разрушаются, напротив, размножаются в них и могут вызвать гибель фагоцита. В результате возникший туберкулезный очаг не подвергается обратному развитию и прогрессирует.

Микобактерии туберкулеза размножаются чрезвычайно медленно: время деления клетки составляет 18–24 часа (для сравнения у *E. coli* — 20 минут). Колонии МБТ на яичных питательных средах обычно появляются через 21–56 дней, в жидких питательных средах рост регистрируется через 5–42 дня. Оптимальная для МБТ температура +36 ± 1 °С, рН среды — 6,8–7,2.

Клеточная стенка микобактерий содержит значительное количество липидов, что придает ей сильные гидрофобные свойства. Вследствие этого микобактерии устойчивы к кислотам, щелочам и спиртам, различным факторам внешней среды. В почве, воде, жилых помещениях, в некоторых продуктах (молоко, масло, сыр) бактерии остаются жизнеспособными около года, в книгах — до 3 месяцев, в уличной пыли — до 8–12 дней, в воде — до 5 месяцев. МБТ, поглощенные макрофагами в процессе фагоцитоза, сохраняют свою жизнеспособность длительное время. При определенных условиях они могут вызвать заболевание после многих лет бессимптомного персистирования. Прямые солнечные и ультрафиолетовые лучи убивают МБТ в течение нескольких минут.

КЛАССИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ. НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ МИКОБАКТЕРИИ

В настоящее время род *Mycobacterium* насчитывает более 100 видов, и их количество продолжает расти. Несколько видов микобактерий входят в так называемый *M. tuberculosis complex*. Это *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*. Остальные микобактерии широко распространены в окружающей среде как сапрофиты, но в некоторых случаях могут быть этиологическими факторами тяжелой патологии, чаще у людей, имеющих хронические заболевания и нарушения иммунитета различной природы. Микобактерии, не входящие в туберкулезный комплекс, называют нетуберкулезными микобактериями (НТМ).

Определение эпидемиологической значимости НТМ сложно, поскольку они повсеместно распространены в окружающей среде. Резервуаром заражения НТМ являются почва и водоемы, в том числе аквариумы, а также сельскохозяйственные предприятия. В городских условиях источником заражения могут служить водопроводная вода, бассейны. Пути передачи инфекции достоверно не установлены. Наиболее вероятными являются контактно-бытовой, пищевой и аэрозольный. В литературе описаны случаи нозокомиальных вспышек инфекции, вызванной НТМ. Ряд исследователей предполагают возможность ингаляционной передачи инфекции, вызванной НТМ, от человека к человеку, но этот факт остается до сих пор не доказанным. Считается, что пациенты с микобактериозом не представляют опасности для окружающих, поэтому не подлежат изоляции.

НТМ естественно устойчивы к большинству противотуберкулезных лекарственных средств (ПТЛС), поэтому лечение микобактериозов представляет определенные трудности. В последнее время установлено известное терапевтическое действие в отношении НТМ циклосерина, канамицина, этамбутола, рифампицина и некоторых антибиотиков.

Возникающие при заражении патологические изменения в органах и клинические проявления микобактериоза весьма разнообразны. НТМ способны вызвать патологию, сходную по клиническим и рентгенологическим проявлениям с туберкулезом и неспецифическими воспалительными заболеваниями легких, поэтому у части пациентов диагностируется МЛУ-ТБ, другая часть пациентов с микобактериозами наблюдается по поводу неспецифических воспалительных заболеваний легких. Заболевание протекает хронически с выраженной склонностью к фиброзу, развитию эмфиземы и возникновению кровохарканья. Образующиеся каверны в легких часто тонкостенные и не сопровождаются бронхогенным обсеменением.

Микобактерии могут инфицировать послеоперационные раны кожи и подкожной клетчатки любой локализации, постинъекционные абсцессы. Наиболее частая причина инфицирования — использование недостаточно обработанного медицинского инструментария (*M. abscessus*), материалов и инструментов, загрязненных водопроводной водой (*M. xenopi*).

В 1954 г. А. Timple и Е. Runyon предложили классификацию НТМ, которую обычно называют классификацией Runyon. Согласно этой классификации, НТМ по скорости роста, морфологии колоний и способности к пигментообразованию делят на 4 основные группы, которые представлены в табл. 1.

Таблица 1

Классификация нетуберкулезных микобактерий по Runyon

Группа I Фотохромато- генные (не пигментирован- ные при выращи- вании в темноте, но приобретающие пиг- ментацию после вы- держивания на свету)	Группа II Скотохромо- тогенные (образующие пигмент в темноте)	Группа III Нехромогенные (не образующие пигмент или имеющие бледно- желтую окраску, которая не усиливается на свету)		Группа IV Быстрорас- тущие
<i>M. asiaticum</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simae</i>	<i>M. gordonae</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. avium- intracellulare</i> <i>M. braderi</i> <i>M. celatum</i> <i>M. gastri</i> <i>M. genavense</i>	<i>M. haemo- philum</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. terrae</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. mucog- enicum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. phlei</i>

Классификация по Runyon оказалась весьма удобной для проведения идентификации наиболее часто встречаемых видов микобактерий, однако она не учитывает степень патогенности НТМ и клинические проявления патологии, ими вызываемой. В последние годы было предложено несколько классификаций НТМ по степени патогенности, одна из которых представлена в табл. 2.

Группировка НТМ по степени патогенности для человека

Потенциально патогенные (способные вызвать заболевания человека при определенных условиях)	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>M. xenopi</i>
Сапрофиты (обнаруживаются в окружающей среде и, как правило, не опасны для человека)	<i>M. gastri</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i>

M. avium – *M. intracellulare* (*M. avium complex*, МАС) вызывают процесс, в который наиболее часто вовлекаются легкие; клиническая картина подобна легочному туберкулезу. Описаны также вызываемые МАС поражения кожных покровов, мышечной ткани и костного скелета, включая остеомиелит позвоночника. МАС входят в число возбудителей оппортунистических инфекций, осложняющих синдром приобретенного иммунодефицита.

M. fortuitum наиболее часто ассоциируется с посттравматическими и послеоперационными инфекциями кожи и мягких тканей. *M. chelonae* вызывает легочные инфекции и диссеминированные заболевания. Эти быстрорастущие микобактерии являются частой причиной внутрибольничных инфекций.

M. kansasii наиболее часто вызывает поражение легких, клиническая картина которого напоминает туберкулез легких. *M. kansasii* может вызывать диссеминированные процессы у иммунокомпromетированных пациентов. Вероятны также поражения кожи и мягких тканей, сходные с поражениями, вызываемыми *M. marinum*, развитие остеомиелитов, лимфаденитов, перикардитов и инфекций мочеполового тракта.

M. marinum вызывает бассейновую гранулему. Поражения, как правило, возникают на самых травмируемых участках — кистях, стопах, локтях и коленях.

M. scrofulaceum вызывает лимфадениты различной локализации, чаще шейных лимфатических узлов.

M. ulcerans. Язва Бурули, вызываемая *M. ulcerans*, встречается в регионах с жарким тропическим климатом, и наиболее часто — в Африке, Австралии и Мексике.

Следует подчеркнуть, что представления о патогенности тех или иных видов НТМ в последние годы претерпевают изменения, к тому же вероятно, что у человека и животных будут обнаруживать случаи патологии, вызванной НТМ, ранее считавшимися непатогенными, а также новые виды НТМ.

Выделение НТМ из патологического материала не свидетельствует о безусловной этиологической значимости данного микроорганизма, как это бывает в случае выявления МБТ. Выделение культуры НТМ может происходить вследствие ряда причин:

- заболевание микобактериозом;
- носительство НТМ, которые могут колонизировать отдельные органы и системы человека (респираторный, желудочно-кишечный тракт, мочевыделительные пути) и персистировать там, не вызывая клинических проявлений;
- случайное загрязнение материала НТМ из окружающей среды.

Для подтверждения диагноза микобактериоз необходимо получить по крайней мере две положительных результата бактериологического исследования на НТМ (один и тот же вид) из нестерильного диагностического материала (например, из мокроты) или выделить культуру НТМ из очага (абсцесс, биопсия, операционный материал) при условии получения пробы в стерильных условиях при наличии соответствующей клинической картины.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Виды диагностического материала для исследования на МБТ

Поскольку наиболее частой формой туберкулезного поражения является туберкулез органов дыхания, основным материалом исследования составляют мокрота; индуцированная мокрота (ИМ), полученная после аэрозольной ингаляции; бронхоальвеолярная лаважная жидкость (БАЛЖ); материал, получаемый при бронхоскопии, трансбронхеальной и внутрилегочной биопсии; аспират из трахеи и бронхов; ларингеальные мазки; экссудаты; мазки из торакальных ран; промывные воды желудка (преимущественно у детей). Кроме этого, можно исследовать мочу, резецированные ткани, кровь, гной из холодных абсцессов, грануляции, соскобы синовиальных оболочек, лимфатические узлы или пунктаты, их содержимое, плевральную, спинномозговую, синовиальную или асцитическую жидкость и др. Самой высокой диагностической значимостью обладают мокрота и индуцированная мокрота.

СБОР БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Важную роль в микробиологической диагностике туберкулеза играет правильный сбор биологического материала, чаще всего мокроты.

Для получения оптимальных результатов при исследовании диагностического материала необходимо соблюдать следующие условия:

- сбор материала необходимо производить до начала химиотерапии, так как даже несколько дней лечения может быть достаточно для того, чтобы убить значительное количество микобактерий или снизить их жизнеспособность и исказить результаты исследования;

- материал для исследования должен собираться рано утром;

- при исследовании мокроты желательнее собрать 2–3 пробы утренней мокроты в течение 2–3 последовательных дней. Это существенно повышает результативность исследования;

- собранный материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию; в случае невозможности немедленной доставки материал сохраняется в холодильнике при 2–8 °С не более 72 часов.

Мокрота. Важным требованием и обязательным условием сбора мокроты является непосредственный контроль медицинским работником всей процедуры сбора. Эта процедура должна осуществляться в специально оборудованном помещении (наличие приточно-вытяжной или вытяжной вентиляции, бактерицидных облучателей, ультразвуковых ингаляторов) или на улице.

При назначении микробиологического исследования мокроты с целью выявления МБТ врач или медсестра должны объяснить пациенту сущность и значение данной диагностической процедуры. Очень важно объяснить пациенту, что следует откашливать мокроту из глубоких отделов легких, а не собирать слюну или носоглоточную слизь. Пациент должен прополоскать рот перед сдачей мокроты для удаления из полости рта остатков пищи и контаминирующих бактерий.

Для получения мокроты из глубоких отделов легких пациент должен:

- сделать глубокий вдох, задержать дыхание на несколько секунд и затем медленно выдохнуть;

- сделать второй глубокий вдох, задержать дыхание на несколько секунд и затем медленно выдохнуть;

- вдохнуть в третий раз и с силой выдохнуть воздух;

- вдохнуть еще раз и затем покашлять.

Если продуктивный кашель не появился, процедуру следует повторить.

После появления продуктивного кашля пациент должен поднести к губам контейнер и аккуратно сплюнуть в него мокроту. Для исследования необходимо получить достаточное количество мокроты (3–5 мл), содержащей плотные гнойные частицы, а не слюну.

Мокрота бывает густой и слизистой или жидкой с частицами некротических тканей из пораженных участков легких. Цвет мокроты может быть грязно-белым или грязновато-светло-зеленым. Мокрота с кровью имеет красный или коричневый цвет.

Жидкая прозрачная слюна или выделения из носоглотки не являются мокротой и не имеют диагностической ценности в выявлении МБТ. Пробы некачественного материала не подлежат исследованию и отбраковываются лабораторией.

Индукцированная мокрота. Индуцированная мокрота — это секрет слизистой трахеи и бронхов, полученный после проведения раздражающих ингаляций. Исследование этого материала проводится в случае невозможности самостоятельного сбора мокроты пациентом. Как правило, сбор ИМ производится в условиях стационара у пациентов:

– с симптомами заболевания легких и бронхов при отсутствии мокроты или скудности ее выделения;

– с рентгенологическими изменениями в легких при сухом кашле и скудном выделении мокроты.

Раздражающая ингаляция проводится с помощью ультразвукового или компрессорного небулайзера. В качестве ингалируемой смеси рекомендуется стерильный гипертонический раствор поваренной соли (5–7 %).

ИМ напоминает по внешнему виду и консистенции слюну. Во избежание выбраковки материала в бланке направления и на флаконе с материалом должна быть обязательная маркировка, указывающая на то, что материал получен после аэрозольной ингаляции.

Промывные воды желудка. Промывные воды желудка исследуют преимущественно у детей младшего возраста, которые плохо откашливают мокроту и часто проглатывают ее. Во избежание смешивания проглоченной мокроты с пищей промывные воды желудка следует брать натощак: последний прием пищи должен быть не менее чем за 12 часов до взятия образца.

Сбор промывных вод желудка производится врачом-эндоскопистом с помощью назогастрального зонда.

К полученному образцу добавляют равный объем 8 % раствора пищевой соды. Материал немедленно доставляют в лабораторию и подвергают обработке, чтобы исключить повреждающее действие на микобактерии содержащихся в материале желудочных ферментов.

Другие пробы. При внелегочных формах процесса можно выделить 2 группы диагностических материалов:

1. Асептически полученный материал, обычно свободный от загрязняющей сопутствующей микрофлоры;

2. Заведомо загрязненный материал из открытых очагов поражения, в отношении которого заранее известно, что он контаминирован сопутствующей микробной флорой или собран без соблюдения правил асептики.

Асептически собранный материал. К асептически собранному материалу относятся резецированные ткани, кровь, гной из холодных абсцессов, грануляции, соскобы синовиальных оболочек, лимфатические

узлы или пунктаты, их содержимое, плевральная, спинномозговая, синовиальная или асцитическая жидкость.

Материал помещают в стерильный флакон без консервантов и немедленно доставляют в лабораторию. Если в исследуемом образце может образоваться большой сгусток (например, в плевральной или асцитической жидкости), рекомендуется добавить к биологическому материалу в момент его сбора цитрат натрия.

Кровь и спинномозговую жидкость засевают в специальные флаконы для исследования на гемокультуру непосредственно у постели пациента и немедленно доставляют в лабораторию. Оптимальный объем спинномозговой жидкости — 1–3 мл, крови — 3–5 мл.

Заведомо загрязненные материалы. Мочу (среднюю часть утренней порции, не менее 50 мл) собирают в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Мочу доставляют в лабораторию в тот же день, использование консервантов не допускается.

Менструальная кровь и каловые массы не являются адекватным диагностическим материалом для исследования на туберкулез; каловые массы рекомендуется исследовать только на нетуберкулезные микобактерии у иммунокомпрометированных пациентов.

ВИДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МБТ

На этапе диагностики для всех пациентов с подозрением на ТБ должны проводиться микробиологические и молекулярно-генетические исследования диагностического материала.

К микробиологическим методам диагностики ТБ относятся микроскопическое исследование на кислотоустойчивые бактерии (КУБ) и культуральное исследование (посев). В случае положительного результата культурального исследования (выделение культуры МБТ) проводится идентификация выделенной культуры микобактерий и тестирование лекарственной чувствительности (ТЛЧ) выделенной культуры МБТ.

К молекулярно-генетическим методам обнаружения МБТ, применяемым в Республике Беларусь, относятся исследование Xpert MTB/RIF, выполняемое с помощью аппарата GeneXpert, и LPA (метод, основанный на гибридизации с линейными зондами).

Результаты лабораторных исследований всегда следует интерпретировать в комплексе с клинико-рентгенологическими данными, а любой диагностический тест при необходимости следует повторять.

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ (ДЕТЕКЦИИ) КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ

Метод микроскопии является наиболее быстрым и простым методом детекции и оценки количества кислотоустойчивых бактерий (КУБ) в нативном материале (чаще всего в мокроте) или осадке, полученном после гомогенизации и деконтаминации диагностического материала. Преимущества микроскопии, заключающиеся в быстроте получения результата, относительной простоте, доступности исследования и экономической эффективности, делают его незаменимым для выявления пациентов с туберкулезом легких.

Микроскопическое исследование мазков мокроты, окрашенных по методу Циля–Нильсена, позволяет выявить КУБ в случае наличия их в количестве 10 000 и более в 1 мл мокроты, поэтому обнаружение КУБ в мазке с высокой вероятностью свидетельствует о значительной эпидемической опасности пациента. Однако методика микроскопического исследования не позволяет различить МБТ и НТМ. Таким образом, не представляется возможным определить видовую принадлежность выявленных КУБ, а также различить живые и мертвые клетки.

Отрицательный результат микроскопического исследования на КУБ не исключает диагноз туберкулеза, так как в материале может содержаться количество микобактерий ниже предела обнаружения методом микроскопии.

Основным диагностическим материалом для микроскопии на КУБ служит мокрота. Результаты микроскопического исследования на КУБ других биологических материалов (различных жидкостей, гноя, мочи и т. д.) имеют ограниченное значение. В мазках из осадка промывных вод желудка и других материалов могут обнаруживаться кислотоустойчивые сапрофиты, которые легко спутать с МБТ. Бактериоскопия менструальной крови не проводится в связи с крайне низкой результативностью исследований. Поэтому при необходимости выявления возбудителя туберкулеза в различных биологических материалах рекомендуется использовать культуральный метод исследования.

Проведение исследования, учет и интерпретация результатов микроскопии по Цилю–Нильсену

Методика окраски мазка по Цилю–Нильсену основана на кислотоустойчивости микобактерий. Готовят мазок мокроты или осадка диагностического материала, высушивают на воздухе, фиксируют. Мазок окрашивают фуксином при нагревании, затем обесцвечивают солянокислым спиртом и докрашивают метиленовым синим. В результате микобактерии окрашиваются в малиновый цвет и не теряют этой окраски после воздействия солянокислого спирта, а фон приобретает синий цвет.

Подсчитывают количество кислотоустойчивых бактерий в мазке. Кислотоустойчивые бактерии — тонкие малиново-красные палочки длиной 1–10 (чаще 1–4) мкм, шириной 0,2–0,7 мкм, слегка изогнутые, более или менее зернистые. Микобактерии располагаются изолированно, парами или в виде групп, хорошо видны на голубом фоне мазка.

Количество обнаруженных КУБ определяет тяжесть заболевания и степень эпидемической опасности пациента. Регистрация результатов с указанием количества обнаруженных КУБ проводится в соответствии с табл. 3.

Таблица 3

Градация результатов микроскопического исследования при окраске по Цилю–Нильсену

Количество кислотоустойчивых бактерий (КУБ)	Минимальное число иммерсионных полей зрения, обязательных для просмотра	Форма записи результатов	Интерпретация результатов исследования
КУБ не обнаружены	300	Отр.	Отрицательный
1–2 КУБ в препарате	300	Рекомендуется повторить исследование	Результат не оценивается
От 3 до 9 КУБ в 100 полях зрения	100	Указать точное количество КУБ в 100 п/з	Положительный
От 10 до 99 КУБ в 100 полях зрения	100	1+	Положительный
От 1 до 10 КУБ в 1 поле зрения	50	2+	Положительный
Более 10 КУБ в 1 поле зрения	20	3+	Положительный

Проведение исследования, учет и интерпретация результатов микроскопии при окраске мазков флуорохромными красителями

Готовят мазок мокроты или осадка диагностического материала, высушивают на воздухе, фиксируют. Методика окраски в целом соответствует методике окраске по Цилю–Нильсену, в ее основе также лежит устойчивость микобактерий к кислотам. Мазок окрашивают флуоресцентным красителем, промывают водой, затем обесцвечивают солянокислым спиртом и докрашивают раствором перманганата калия, акридинового оранжевого или метиленового синего.

Флуорохромные красители (аурамин О, родамин С и др.) связываются с воскоподобными структурами бактериальных клеток, которые при облучении ультрафиолетовыми лучами видны как флуоресцирующие палочки желтого или оранжевого цвета на темном фоне.

Микроскопическое исследование при окраске флуорохромными красителями осуществляется при значительно меньшем увеличении (обычно $\times 400$), чем то, что используется для просмотра мазков, окрашенных по Цилю–Нильсену ($\times 1000$). Поэтому поле зрения, просматриваемое под люминесцентным микроскопом, имеет значительно большую площадь, чем поле зрения светового микроскопа. При микроскопировании препарата, окрашенного флуорохромными красителями, следует просматривать не менее 40 полей зрения. Просмотренная площадь мазка при микроскопии 40 полей зрения с увеличением $\times 400$ равна площади 100 полей зрения с увеличением $\times 1000$.

Регистрация результатов с указанием количества обнаруженных КУБ проводится в соответствии с табл. 4.

Таблица 4

Градации результатов микроскопического исследования при окраске флуорохромами

Количество кислотоустойчивых бактерий (КУБ)	Минимальное число полей зрения, обязательных для просмотра	Форма записи результатов	Интерпретация результатов исследования
КУБ не обнаружены	40	Отр.	Отрицательный
От 1 до 19 КУБ в 40 полях зрения	40	Указать точное количество КУБ в 40 п/з	Положительный
От 20 до 199 КУБ в 40 полях зрения	40	1+	Положительный
От 5 до 50 КУБ в 1 поле зрения	5	2+	Положительный
Более 50 КУБ в 1 поле зрения	5	3+	Положительный

КУЛЬТУРАЛЬНОЕ (БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ) ИССЛЕДОВАНИЕ

Бактериологическое исследование является обязательным этапом в диагностике туберкулеза. Благодаря высокой чувствительности (от 20 до 100 жизнеспособных клеток в 1 мл исследуемого материала) и специфичности культуральное исследование (посев) диагностического материала на МБТ является «золотым стандартом» в диагностике туберкулеза. По сравнению с микроскопией, культуральное исследование позволяет увеличить число выявленных пациентов с туберкулезом более чем на 15–25 %. Существенным недостатком метода является длительность исследования.

При проведении обследования пациента с подозрением на туберкулез необходимо выделить культуру *M. tuberculosis* на питательной среде, идентифицировать ее, используя дифференциальные тесты *in vitro*, и провести тестирование лекарственной чувствительности МБТ. Для культиви-

рования микобактерий туберкулеза разработано множество различных питательных сред, которые делятся на три основные группы — яичные (плотные), агаровые (плотные и полужидкие) и жидкие (синтетические и полусинтетические). Культуральное исследование с целью диагностики туберкулеза проводится параллельно с использованием яичных питательных сред (Левенштейна–Йенсена, Финн II и др.) и жидкой среды (Middlebrook 7H9) в автоматизированной системе BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, США).

Обработка и посев диагностического материала

Большинство проб клинического материала, поступающего в бактериологическую лабораторию для культурального исследования на туберкулез, в различной степени контаминированы более быстро растущими бактериями, являющимися частью нормальной микрофлоры организма человека. Поэтому большинство клинических образцов следует до проведения исследования подвергнуть специальной обработке N-ацетил-1-цистеином и гидроксидом натрия (NALC-NaOH), для разжижения пробы и ее деконтаминации, т. е. удаления нежелательной микрофлоры.

Особенностью *M. tuberculosis* является способность их долгое время находиться в жидкостях во взвешенном состоянии, поэтому все жидкие материалы подлежат обязательному центрифугированию при ≥ 3000 g. Все последующие манипуляции выполняют с полученным осадком.

К образцу диагностического материала добавляют равный объем раствора NALC-NaOH, встряхивают на шейкере в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем доливают до 50 мл фосфатный буфер, встряхивают на вортексе, центрифугируют при 3000 g в течение 15 мин. Осторожно сливают всю надосадочную жидкость, не оставляя в пробирке ничего, кроме осадка. Ресуспендируют осадок в 1–3 мл фосфатного буфера, немедленно производят посев на питательную среду.

Инкубация посевов на яичных питательных средах и учет результатов

Оптимальная температура инкубации микобактерий туберкулеза составляет $36 \pm 1^\circ\text{C}$. В связи с медленной скоростью роста МБТ посевы на яичной питательной среде инкубируют в термостате в течение 8 недель с обязательным еженедельным просмотром.

Во время еженедельных просмотров регистрируют следующие параметры:

- появление видимого роста;
- интенсивность роста — суммарное число колониеобразующих единиц (КОЕ) на всех пробирках, засеянных данным материалом;
- контаминация посева неспецифической микрофлорой или грибами;
- отсутствие роста.

Интенсивность роста колониобразующих единиц (КОЕ) микобактерий оценивают по следующей шкале, рекомендуемой ВОЗ:

1–19 КОЕ — указать точное количество;

20–100 КОЕ — 1+;

100–200 КОЕ — 2+;

> 200 КОЕ — 3+.

Если в течение 8 недель колонии микобактерий не появляются, посе-
вы уничтожают автоклавированием.

Появление роста КУБ в течение 7–10 дней культивирования на
плотных питательных средах может свидетельствовать о выделении
быстрорастущих НТМ.

Во всех случаях при появлении видимого роста колоний необходимо
контролировать чистоту выросшей культуры с помощью микроскопии
мазка по Цилю–Нильсену для исключения ложноположительного резуль-
тата. Далее проводится идентификация выделенной культуры микобакте-
рий и тестирование лекарственной чувствительности МБТ.

Инкубация посевов в автоматизированной системе для диагностики туберкулеза и учет результатов

Использование автоматизированной системы для ускоренного выяв-
ления микобактерий и определения чувствительности МБТ к противоту-
беркулезным лекарственным средствам ВАСТЕС MGIT 960 позволяет
проводить детекцию роста микобактерий и определять лекарственную
чувствительность МБТ в 2–3 раза быстрее по сравнению с классическими
методами посева на плотные питательные среды.

При разработке метода использованы аэробные свойства микобакте-
рий, в связи с чем им для жизнедеятельности необходим кислород. Осно-
вой технологии MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube, пробирка для
индикации роста микобактерий) является специальная пробирка, в сили-
кон на дне которой введен флуоресцентный компонент, чувствительный
к присутствию кислорода, растворенного в бульоне. Первоначально
большое количество растворенного кислорода гасит выделение этого
вещества, и обнаруживается лишь небольшая флуоресценция. В дальней-
шем активно дышащие микроорганизмы потребляют кислород, и флуо-
ресценция становится выраженной. Пробирки помещаются в прибор
ВАСТЕС MGIT после считывания штрих-кода и инкубируются при по-
стоянной температуре 37 °С. Каждые 60 минут прибором осуществляется
их мониторинг для определения флуоресценции. Результат исследования
диагностического материала с помощью автоматизированных систем рас-
ценивается как положительный при наличии флуоресценции в засеянной
пробирке. Максимальное рекомендованное время инкубации пробирок
в приборе ВАСТЕС MGIT 960 — 42 дня. Пробирки, в которых рост микро-

бактерий не зафиксирован прибором в течение указанного времени, идентифицируются системой как отрицательные.

Поскольку жидкая среда Middlebrook 7H9, используемая в автоматизированных системах, не является селективной, после получения сообщения о наличии роста в пробирке следует убедиться в присутствии в ней микобактерий. Обычно рост МБТ проявляется появлением своеобразной зернистости или белых хлопьев на дне пробирки, при этом прозрачность столбика среды может почти не меняться. Сильная мутность среды может свидетельствовать о наличии контаминации посторонней флорой. Для исключения ложноположительного результата из содержимого «положительной» пробирки готовят мазки по Цилю–Нильсену, производят посев на кровяной агар для контроля контаминации. Далее проводится идентификация выделенной культуры микобактерий и тестирование лекарственной чувствительности МБТ.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКОБАКТЕРИЙ

Несмотря на то, что морфология колоний, наличие пигмента и ростовые характеристики дают некоторое представление о выделенной культуре микобактерий, ее идентификация с использованием специальных лабораторных методов является обязательной.

В настоящее время для идентификации микобактерий используются иммунохроматографические, молекулярно-генетические, культуральные и биохимические методы. В зависимости от материально-технической обеспеченности лаборатории рекомендуемый выбор методов видовой идентификации МБ должен осуществляться в следующем приоритетном порядке:

- 1) иммунохроматографические методы;
- 2) молекулярно-генетические методы;
- 3) биохимические и культуральные методы.

Иммунохроматографическая идентификация комплекса *M. tuberculosis*

Микобактерии туберкулезного комплекса продуцируют, то есть выделяют в питательную среду более 30 различных белков, один из преобладающих — МРТ64 (МРВ64). Было установлено, что НТМ не продуцируют этот белок, таким образом, обнаружение МРТ64 (МРВ64) в пробе свидетельствует о принадлежности исследуемого штамма к комплексу *M. tuberculosis*.

Иммунохроматографию можно отнести к группе реакций с мечеными антителами. В реакции используют моноклональные антитела к искомому антигену, адсорбированные на микрочастицах (окрашенный латекс или частицы коллоидного золота), и моноклональные антитела к тому же

антигену, иммобилизованные в виде полосы на хроматографической бумаге. Кроме того, в этой реакции имеется внутренний контроль (антивидовые антитела, также закрепленные в виде полосы на хроматографической бумаге). Тест-системы, основанные на данном принципе, обладают высокой специфичностью.

Для выполнения теста подготовленный исследуемый материал (суспензия микобактерий или положительная жидкая культура) в небольшом количестве (100 мкл) вносится в стартовое окно тест-системы. Здесь происходит взаимодействие антигена с антителами, адсорбированными на частицах, и начинается движение образовавшихся комплексов за счет капиллярности бумаги. Дойдя до антител, расположенных на бумаге в окне учета результата, эти комплексы связываются, при этом частицы латекса или коллоидного золота проявляются в виде линии голубого (латекс) или (коричневого) цвета.

Интерпретация результатов теста проводится через 15 минут после внесения суспензии микобактерий в стартовое окно. Наличие полосы в окне учета результата свидетельствует о принадлежности исследуемого штамма к комплексу *M. tuberculosis*, отсутствие — о принадлежности исследуемого штамма микобактерий к НТМ. Поскольку частицы, нагруженные антителами, берутся в избытке, часть их движется дальше и связывается в окне внутреннего контроля реакции. Полоса в этом окне свидетельствует о правильной работе тест-системы.

Молекулярно-генетическая идентификация микобактерий

Дифференциацию микобактерий туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*) и идентификацию наиболее часто выделяемых из диагностического материала НТМ можно проводить с использованием молекулярно-генетических методов исследования, в частности, GenoType MTBC, GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain LifeScience, Германия).

Процедура проведения теста состоит из трех этапов: выделение ДНК из культур, выросших на плотной или жидкой среде, мультиплексная амплификация с биотинилированными праймерами, реверс-гибридизация ДНК исследуемого штамма со специфическими для вида микобактерий ДНК-зондами, иммобилизованными на нитроцеллюлозном стрипе. Учет результатов проводится путем сопоставления проявившихся на стрипе зондов с таблицей интерпретации.

Применение молекулярно-генетических методов позволяет проводить идентификацию микобактерий в течение 1–2 рабочих дней, что является одним из главных достоинств методов. Молекулярно-генетические методы являются достаточно затратными с экономической точки зрения,

требуют использования квалифицированного персонала, но применение автоматизированных систем значительно снижает риск заболевания персонала.

Биохимические и культуральные методы идентификации микобактерий

Идентификация с использованием культуральных и биохимических методов исследования никогда не должна базироваться на единичных тестах или характеристиках, так как отдельные штаммы могут давать отклонения от ожидаемых результатов тестирования, присущих данному виду. Сочетание характерных признаков с результатами биохимических и культуральных тестов позволяет провести идентификацию микобактерий комплекса *M. tuberculosis* с высокой точностью.

Культуральная характеристика *M. tuberculosis*. Типичные культуры *M. tuberculosis*, выросшие на плотных питательных средах, — восковидные, сухие, морщинистые, растут в виде *R*-колоний (от англ. rough — грубый, шершавый), не пигментированы (кремового цвета или цвета слоновой кости). Реже могут выделяться гладкие *S*-колонии с влажным ростом (от англ. smooth — гладкий). Нетуберкулезные микобактерии могут варьировать по форме и пигментации колоний.

Ниациновый тест — основной тест, используемый для идентификации *M. tuberculosis*. Ниацин (производное никотиновой кислоты) продуцируют все микобактерии, однако у *M. tuberculosis* в результате блокирования ряда метаболических путей никотиновая кислота накапливается в больших количествах, во много раз превышающих ее содержание в клетках микобактерий других видов. Для выполнения теста в пробирку с суспензией культуры микобактерий помещают индикаторную полоску. Положительный результат — экстракт окрашивается в желтый цвет разной интенсивности, отрицательный результат — нет окрашивания жидкости.

Нитратредуктазный тест. Принцип метода заключается в определении активности нитратредуктазы по количеству нитрита, восстановленного из нитрата, что сопровождается цветной реакцией. Реакция восстановления нитратов дает возможность дифференцировать *M. tuberculosis*, у которых нитратредуктазная активность наиболее выражена из всех микобактерий, от других микобактерий, у которых этот фермент отсутствует.

Для выполнения теста в пробирку с суспензией культуры микобактерий добавляют раствор нитрата натрия, инкубируют в течение 2 часов при 37 °С. После этого в пробирку добавляют по каплям раствор соляной кислоты, сульфаниламида, *N*-нафтилэтилендиамина. Положительный результат — красное окрашивание (оттенки от розового до темно-красного). Отрицательный результат — нет окрашивания.

Тест с пара-нитробензойной кислотой (ПНБ-тест). Пара-нитробензойная кислота оказывает ингибирующее действие на рост МБТ. Для выполнения теста готовят яичную среду с ПНБ, засевают суспензию микобактерий в пробирку с ПНБ и контрольную пробирку, не содержащую ПНБ. Пробирки инкубируют при 37 °С в течение 28 суток.

Если в обеих пробирках отмечается обильный рост, то исследуемый штамм принадлежит к НТМ. Если в контрольной пробирке отмечается обильный рост, а в пробирке с ПНБ — отсутствие роста или рост единичных колоний, то исследуемый штамм принадлежит к комплексу *M. tuberculosis*.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Определение лекарственной чувствительности МБТ фенотипическими методами проводится на яичной среде Левенштейна–Йенсена и в жидкой среде с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960. Тестирование лекарственной чувствительности НТМ не проводится в связи с отсутствием стандартизированных методик исследования.

Тест на лекарственную чувствительность МБТ на среде Левенштейна–Йенсена

Принцип метода абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна–Йенсена заключается в детекции ингибирования роста штамма МБТ при выращивании его на питательных средах, содержащих определенные концентрации противотуберкулезных лекарственных средств (ПТЛС).

Для выполнения теста готовят набор сред на основе среды Левенштейна–Йенсена, каждая из которых содержит определенную концентрацию ПТЛС. Готовят суспензию МБТ, стандартизируют ее по оптической плотности, засевают в пробирки с ПТЛС и контрольную пробирку, не содержащую ПТЛС. Пробирки с посевами инкубируют в течение 4 недель, после чего проводят учет результатов.

Штамм микобактерий считается чувствительным к ПТЛС в случае присутствия в популяции менее 1 % резистентных микобактерий, то есть роста 20 КОЕ и менее на среде с ПТЛС при обильном росте в контроле. Штамм микобактерий считается устойчивым к ПТЛС в случае присутствия в популяции более 1 % резистентных микобактерий, то есть роста более 20 КОЕ на среде с ПТЛС при обильном росте в контроле. В случае скудного роста в контроле исследование необходимо повторить.

Тест на лекарственную чувствительность МБТ с использованием ВАСТЕС MGIT 960

Тестирование лекарственной чувствительности МБТ в системе ВАСТЕС MGIT 960 проводится с использованием метода пропорций, то есть определения пропорции устойчивых клеток в популяции. ТЛЧ выполняется с использованием набора AST (тестирование чувствительности к антибиотикам), который состоит из контрольной пробирки, по одной пробирке для каждого ПТЛС, а также держателя со штрихкодом, в который помещаются пробирки. Порядок пробирок в держателе AST должен всегда быть единообразным. Пробирка контроля роста всегда должна находиться слева от всех пробирок набора.

Для размещения пробирок в приборе проводится считывание штрихкода держателя AST, таким образом, прибор автоматически сравнивает рост микобактерий в пробирках с ПТЛС с ростом в контрольной пробирке.

Если ПТЛС активно в отношении изолята микобактерий (лекарственная чувствительность), рост микобактерий будет ингибирован, и в пробирке, содержащей ПТЛС, будет подавлена флюоресценция, в то время как в контроле того же образца, не содержащем ПТЛС, уровень флюоресценции увеличится.

Если ПТЛС неактивно в отношении изолята микобактерий (лекарственная устойчивость), рост микобактерий и соответствующее увеличение флюоресценции будет наблюдаться в обеих пробирках: содержащей ПТЛС и контрольной, не содержащей ПТЛС.

Система ВАСТЕС MGIT 960 отслеживает эти модели роста и автоматически интерпретирует результаты как чувствительность или устойчивость. Изолят определяется как устойчивый, если 1 % или более популяции микобактерий растет в присутствии критической концентрации ПТЛС.

Длительность исследования составляет 7–14 дней (до 21 дня для пипразинамида).

При интерпретации результатов определения лекарственной чувствительности МБТ у пациентов в случае несовпадения данных, полученных с использованием автоматизированных систем и метода абсолютных концентраций, принимают во внимание результаты обоих методов. В данном случае рекомендуется проведение повторного тестирования или исследование с использованием молекулярно-генетических методов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МБТ

Молекулярно-генетическая диагностика — одно из наиболее современных и динамично развивающихся высокотехнологичных направлений диагностики инфекционных заболеваний, в том числе туберкулеза. Использование молекулярно-генетических методов позволяет значительно сократить время исследования при подозрении на туберкулез.

Самый распространенный метод молекулярно-генетической диагностики — метод ПЦР (полимеразная цепная реакция). ПЦР — принципиально очень простой метод амплификации, т. е. умножения нуклеиновых кислот. Он имитирует естественный процесс репликации ДНК, при котором число молекул ДНК удваивается после каждого цикла. Одно из отличий заключается в том, что ПЦР используется для амплификации не всей хромосомы, а лишь небольшого участка ДНК (последовательности-мишени).

Формирование лекарственной устойчивости является результатом мутаций в бактериальной хромосоме. Использование амплификационных методик для выявления различий в генетической структуре чувствительных и устойчивых штаммов — новый подход к определению лекарственной чувствительности микобактерий. Этот вид исследований стал возможен благодаря определению нуклеотидных последовательностей генов, мутации в которых приводят к возникновению резистентности к ПТЛС.

Технология проведения исследований с использованием молекулярно-генетических методов включает следующие этапы:

1. Выделение ДНК непосредственно из клинического материала либо из культур *M. tuberculosis*.

2. ПЦР для амплификации фрагментов генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью.

3. Гибридизация ПЦР-продуктов с ДНК-зондами, визуализация результатов гибридизации, при которой детектируется наличие в пробе микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, а также наличие либо отсутствие мутаций в исследуемых генах.

В последнее время широкое распространение получила ПЦР в реальном времени (Real-time PCR), основанная на использовании флуоресцентных ДНК-зондов. Интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР возрастает пропорционально числу ампликонов. Прибор для ПЦР в реальном времени осуществляет регулярные замеры флуоресценции каждой пробы и строит индивидуальные кривые уровня флуоресценции. Преимуществом данного вида исследований является возможность детекции накопления продуктов ПЦР непосредственно во время проведения амплификации.

В настоящее время в республике используются 2 метода молекулярно-генетической детекции МБТ: метод, основанный на гибридизации с линейными ДНК-зондами (LPA), в частности, GenoType MTBDRplus, GenoType MTBDRsl (Hain LifeScience, Германия) и Xpert MTB/RIF тест (GeneXpert) (Cepheid, США). Эти методы позволяют одновременно проводить детекцию наличия МБТ в исследуемом образце и определение лекарственной чувствительности МБТ.

Тест Xpert MTB/RIF

Тест Xpert MTB/RIF, выполняемый с помощью аппарата GeneXpert (ПЦР в реальном времени), позволяет проводить детекцию наличия ДНК микобактерий туберкулеза в образце диагностического материала и устойчивости к рифампицину менее чем за два часа.

Рифампицин является маркером множественной лекарственной устойчивости МБТ, поскольку, в соответствии с данными литературы, резистентность к рифампицину более чем у 90 % штаммов МБТ коррелирует с устойчивостью к изониазиду. Генодиагностика резистентности к рифампицину основана на детекции мутаций, локализованных в высоко консервативной области размером 81 п.о. гена *rpoB*, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы, поскольку 95–98 % устойчивых к рифампицину штаммов МБТ имеют мутации в этом гене.

Проведение исследования представляет собой двухступенчатый процесс, включающий в себя обработку клинических образцов и ПЦР в режиме реального времени. Экстракция, амплификация и детекция ДНК осуществляются автоматически в закрытом картридже, что минимизирует возможность кросс-контаминации.

В результате ПЦР амплифицируются пять зондов, полностью перекрывающих специфическую последовательность гена *rpoB*. Замена хотя бы одного нуклеотида в последовательности ДНК-мишени ведет к нарушению гибридизации с зондом, комплементарным соответствующему участку ДНК-мишени. Таким образом, детекция мутаций, а, следовательно, и устойчивости к рифампицину, производится по отсутствию сигнала одного или нескольких зондов.

Чувствительность метода составляет около 70 % для образцов КУБ– и приближается к 100 % для образцов КУБ+. Отрицательный результат исследования образца КУБ+ методом Xpert MTB/RIF может свидетельствовать о присутствии в образце НТМ.

Метод, основанный на гибридизации с ДНК-зондами (LPA)

Метод, основанный на гибридизации с линейными ДНК-зондами (LPA), позволяет проводить детекцию ДНК МБТ и одновременное определение устойчивости к рифампицину (*rpoB*) и изониазиду (*katG*, *inhA*) с использованием набора GenoType MTBDRplus или фторхинолонам (*gyrA*, *gyrB*) и аминогликозидам (*rrs*, *eis*) с использованием набора GenoType MTBDRsl, то есть выполнять молекулярно-генетическую диагностику туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью.

В состав зондов включаются специфический зонд для идентификации микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, а также для каждого исследуемого гена зонды «дикого типа» (без мутаций, WT) и зонды для детек-

ции наиболее часто встречающихся мутаций (MUT). Замена хотя бы одного нуклеотида в последовательности ДНК-мишени ведет к нарушению гибридизации с зондом, комплементарным соответствующему участку ДНК-мишени «дикого типа» (WT), но при этом происходит гибридизация с зондом, учитывающим эту замену (MUT). Таким образом, детекция мутаций производится по отсутствию сигнала одного или нескольких зондов «дикого типа» (WT), а также по присутствию сигналов от одного или нескольких «мутантных» зондов (MUT).

Чувствительность метода составляет около 65 % для образцов КУБ– и 95 % для образцов КУБ+. Длительность исследования — 1–2 дня. Отрицательный результат исследования образца КУБ+ методом LPA может свидетельствовать о присутствии в образце НТМ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. *Перельман, М. И.* Фтизиатрия : учеб. / М. И. Перельман, И. В. Богадельникова ; под ред. М. И. Перельмана. 4-е изд., перераб. и доп. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. 448 с.

2. *Кривонос, П. С.* Туберкулез у детей : учеб. пособие / П. С. Кривонос, Ж. И. Кривошеева, Н. С. Морозкина. Минск : Регистр, 2015. 232 с.

Дополнительная

3. *Руководство* по лабораторной диагностике туберкулеза. Приказ Минздрава Республики Беларусь № 377 от 22 марта 2013 г. Минск, 2013. 135 с.

4. *Клиническое руководство* по диагностике и лечению туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм. Приказ Минздрава Республики Беларусь № 601 от 30 мая 2017 г. Минск, 2017. 138 с.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

26

Метод	Принцип метода	Чувствительность метода	Специфичность метода	Длительность исследования	Результат исследования	Интерпретация результата исследования	Врачебная тактика
Микроскопия на КУБ	Обнаружение КУБ при окраске по Цилю–Нильсену или флуорохромами	Не менее 10 000 клеток МБТ в 1 мл диагностического материала	Не обладает видоспецифичностью. Не различает живые и мертвые клетки	2 часа	КУБ обнаружены	Диагноз ТБ с высокой вероятностью	Изоляция пациента, назначение быстрых методов диагностики МЛУ-ТБ, решение вопроса о назначении химиотерапии
					КУБ не обнаружены	Не исключает диагноз ТБ	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований
Бактериологическое исследование (плотные питательные среды)	Обнаружение жизнеспособных МБТ (колонии на поверхности питательной среды)	10–100 клеток МБТ в пробе	Высокая	21–56 дней	Культура МБТ выделена	Диагноз ТБ	Лечение
					Культура МБТ не выделена	Не исключает диагноз ТБ	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований
Бактериологическое исследование (ВАСТЕС MGIT 960)	Обнаружение жизнеспособных микобактерий (флуоресценция)	10–100 клеток МБТ в пробе	Высокая	5–42 дня	Культура МБТ выделена	Диагноз ТБ	Лечение
					Культура МБТ не выделена	Не исключает диагноз ТБ	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований

Метод	Принцип метода	Чувствительность метода	Специфичность метода	Длительность исследования	Результат исследования	Интерпретация результата исследования	Врачебная тактика
Хpert MTB/RIF	Обнаружение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса	70% для образцов КУБ-, 100% для образцов КУБ+	Не различает живые и мертвые клетки	2 часа	ДНК МБТ обнаружена	Диагноз ТБ с высокой вероятностью	Назначение исследования с использованием ВАСТЕС MGIT 960, решение вопроса о назначении химиотерапии
					ДНК МБТ не обнаружена	Не исключает диагноз ТБ	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований
LPA	Обнаружение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса	65% для образцов КУБ-, 95% для образцов КУБ+	Не различает живые и мертвые клетки	1–2 дня	ДНК МБТ обнаружена	Диагноз ТБ с высокой вероятностью	Назначение исследования с использованием ВАСТЕС MGIT 960, решение вопроса о назначении химиотерапии
					ДНК МБТ не обнаружена	Не исключает диагноз ТБ	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Метод	Принцип метода	ПТЛС, к которым выполняется ТЛЧ	Длительность исследования
Метод абсолютных концентраций на среде Левенштейна–Йенсена	Ингибирование роста микобактерий при выращивании на питательных средах, содержащих определенные концентрации ПТЛС (колонии на поверхности питательной среды)	H, R, E, Am, Cm, Km, PAS, Cs, Eto	28 дней
Метод пропорций с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960	Ингибирование роста микобактерий при выращивании на питательных средах, содержащих определенные концентрации ПТЛС (наличие флуоресценции в пробирке с культурой МБТ)	H, R, E, Lfx, Mfx, Am, Cm, Km, Lzd, Pza	7–14 дней (7–21 день для Pza)
Xpert MTB/RIF	Детекция мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину	R	2 часа
LPA	Детекция мутаций, ассоциированных с устойчивостью к ПТЛС	H, R, Flq, Km, Am, Cm, Vm	1–2 дня

ОГЛАВЛЕНИЕ

Мотивационная характеристика темы	3
Возбудитель туберкулеза. Нетуберкулезные микобактерии	5
Возбудитель туберкулеза.....	5
Классификация микобактерий. Нетуберкулезные микобактерии.....	6
Диагностический материал для исследования на МБТ	9
Виды диагностического материала для исследования на МБТ.....	9
Сбор биологического материала для микробиологической диагностики туберкулеза	9
Виды микробиологических исследований для выявления МБТ	12
Микроскопическое исследование для выявления кислотоустойчивых бактерий	13
Культуральное (бактериологическое) исследование.....	15
Идентификация микобактерий	18
Определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза	21
Молекулярно-генетические методы диагностики туберкулеза	22
Список использованной литературы.....	25
Приложение 1. Методы детекции микобактерий туберкулеза.....	26
Приложение 2. Методы определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза	28

Учебное издание

Дюсьмикеева Марина Игоревна
Залуцкая Оксана Михайловна
Бородина Галина Львовна и др.

СОВРЕМЕННАЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Г. Л. Бородина
Компьютерная верстка Н. М. Федорцовой

Подписано в печать 29.05.18. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».

Ризография. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,46. Тираж 99 экз. Заказ 346.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.

Репозиторий БГМУ