

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФТИЗИОПУЛЬМОЛОГИИ

ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Учебно-методическое пособие



Минск БГМУ 2023

УДК 616-002.5-07(075.8)

ББК 55.4я73

Д44

Рекомендовано Научно-методическим советом университета в качестве учебно-методического пособия 27.06.2023 г., протокол № 6

Авторы: канд. мед. наук, доц., зав. каф. фтизиопульмонологии Белорусского государственного медицинского университета Ж. И. Кривошеева; ст. преп. каф. фтизиопульмонологии Белорусского государственного медицинского университета Н. А. Емельянова; врач-лаборант Республиканской референс-лаборатории Республиканского научно-практического центра пульмонологии и фтизиатрии О. М. Залуцкая; канд. мед. наук, доц., вед. науч. сотр. отдела лабораторной диагностики и лечения туберкулеза Республиканского научно-практического центра пульмонологии и фтизиатрии М. И. Дюсьмикеева

Рецензенты: канд. мед. наук, доц., вед. науч. сотр. Республиканского научно-практического центра пульмонологии и фтизиатрии Л. С. Богуш; каф. инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета

Диагностика туберкулеза. Современные методы детекции возбудителя : учебно-методическое пособие / Ж. И. Кривошеева [и др.]. – Минск : БГМУ, 2023. – 36 с.

ISBN 978-985-21-1440-0.

Рассматриваются современные методы лабораторной диагностики туберкулеза. 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, военно-медицинского института.

УДК 616-002.5-07(075.8)

ББК 55.4я73

ISBN 978-985-21-1440-0

© УО «Белорусский государственный медицинский университет», 2023

МОТИВАЦИОННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕМЫ

Общее время занятия: 4 ч.

Туберкулез — инфекционное заболевание, которое вызывается микобактерией туберкулеза (МБТ), характеризуется развитием специфических гранул 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 ВОЗ, около трети населения планеты — два миллиарда человек — инфицированы МБТ и подвержены риску заболевания. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Республике Беларусь в последние годы стабильна, однако 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 лабораторная диагностика туберкулеза с определением лекарственной чувствительности МБТ сохраняет свою актуальность и в настоящее время, выполняет важную задачу скорейшей верификации диагноза, проведения адекватной химиотерапии, направленных на предотвращение распространения туберкулеза, в том числе МЛУ/ШЛУ-ТБ. Для достижения этой цели используются современные методы обследования пациентов и лабораторной диагностики туберкулеза.

Цель занятия: изучить методы лабораторной диагностики туберкулеза.

Задачи занятия:

- ознакомиться с основными свойствами возбудителя туберкулеза;
- изучить виды диагностического материала, используемые при подозрении на туберкулеза;
- усвоить правила сбора диагностического материала для исследования на туберкулез;
- научиться правильно интерпретировать результаты микроскопического, культурального и молекулярно-генетического исследования на туберкулез;
- усвоить основные принципы 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;
- виды нетуберкулезных микобактерий (НТМ);
- механизмы формирования лекарственной устойчивости;
- методы лабораторной диагностики туберкулеза.

Контрольные вопросы из смежных дисциплин:

1. Таксономическое положение возбудителя туберкулеза.
2. Морфологическая и биохимическая характеристика возбудителя туберкулеза.
3. Классификация НТМ.
4. Микроскопическое исследование мокроты с окраской мазков по методу Циля-Нильсена для выявления кислотоустойчивых бактерий (КУБ).
5. Питательные среды для культурального (бактериологического) исследования на туберкулез.
6. Механизмы формирования лекарственной устойчивости.
7. Методы определения лекарственной чувствительности МБТ.
8. Молекулярно-генетические методы диагностики инфекционных заболеваний.

Контрольные вопросы по теме занятия:

1. Возбудитель туберкулеза: история открытия, основные свойства.
2. Правила сбора диагностического материала для исследования на туберкулез.
3. Микроскопическое исследование мокроты для выявления КУБ с окраской мазков по методу Циля-Нильсена и флуорохромами: методика, интерпретация результатов.
4. Культуральное (бактериологическое) исследование на туберкулез на плотных питательных средах и с использованием автоматизированной системы: методика, интерпретация результатов.
5. Определение лекарственной чувствительности МБТ на плотной питательной среде и с использованием автоматизированной системы: методика, интерпретация результатов.
6. Молекулярно-генетические методы, используемые для детекции МБТ и определения их лекарственной чувствительности: принцип, интерпретация результатов.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ТУБЕРКУЛЕЗА. НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ МИКОБАКТЕРИИ

Возбудитель туберкулеза

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*.

Возбудитель туберкулеза был открыт в 1882 г. немецким ученым Робертом Кохом. 24 марта 1882 г. Р. Кох на заседании Берлинского физиологического общества сделал доклад «Этиология туберкулеза», в котором представил данные экспериментальных исследований, подтверждающие роль МБТ в патогенезе заболевания. В 1905 г. за «исследования и открытия, касающиеся лечения туберкулеза» ученый удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине. В 1982 г. 24 марта объявлен официальным Всемирным днем борьбы с туберкулезом.

В настоящее время род *Mycobacterium* насчитывает более 100 видов. 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*.

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), представляющим собой 6,6-димиколат трегалозы, который приводит к слипанию МБТ в микроколонии в виде жгутов или кос. Корд-фактор определяет способность возбудителя туберкулеза повреждать макрофаги и препятствовать завершению фагоцитоза. Вирулентные МБТ не разрушаются после фагоцитоза макрофагами, а, напротив, размножаются в них и могут вызвать гибель фагоцита. В результате возникший туберкулезный очаг прогрессирует. МБТ, поглощенные макрофагами в процессе фагоцитоза, сохраняют свою жизнеспособность в течение длительного времени. При определенных условиях они могут вызвать заболевание после многих лет бессимптомного персистирования.

МБТ размножаются чрезвычайно медленно: время деления клетки составляет 18–24 ч (для сравнения у *E. coli* — 20 мин). 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. Микобактерии **устойчивы** к кислотам, щелочам и спиртам, различным факторам внешней среды. Кислотоустойчивость микобактерий используется для их детекции при микроскопическом исследовании по методу Циля-Нильсена.

В почве, воде, в жилых помещениях, в некоторых продуктах (молоко, масло, сыр) бактерии остаются жизнеспособными около года, в книгах — до 3 мес., в уличной пыли — до 8–12 дней, в воде — до 5 мес. Прямые солнечные и ультрафиолетовые лучи убивают МБТ в течение нескольких минут.

НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ МИКОБАКТЕРИИ. КЛАССИФИКАЦИЯ

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. Исследователи 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 и рифампицина.

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 классифика-

ции, 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 Фотохромотогенные (не пигментированные при выращивании в темноте, но приобретающие пигментацию после выдерживания на свету)	Группа II Скотохромотогенные (образующие пигмент в темноте)	Группа III Нехромогенные (не образующие пигмент или имеющие бледно-желтую окраску, которая не усиливается на свету)	Группа IV Быстрорастущие
<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. haemophilum</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. mucogenicum</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 нетуберкулезных микобактерий по степени патогенности, одна из которых представлена в табл. 2.

Таблица 2

Группировка микобактерий по степени патогенности для человека

Облигатно-патогенные	Потенциально патогенные (способные вызвать заболевания человека при определенных условиях)	Сапрофиты (обнаруживаются в окружающей среде и, как правило, не опасны для человека)
<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. leprae</i>	<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>	<i>M. gastri</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. triviale</i>

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛЕЗ

Лабораторные методы исследования играют ключевую роль в диагностике и лечении туберкулеза и других заболеваний органов дыхания. Преаналитический (долабораторный) этап лабораторного исследования включает в себя стадии от назначения анализа клиницистом до поступления исследуемого образца в лабораторию, а именно: назначение анализа, подготовку пациента, сбор биологического материала, оформление необходимой документации, доставку материала в лабораторию.

Все образцы диагностического материала, доставленные в лабораторию, должны соответствовать критериям приемлемости по качеству, маркировке, безопасности и документации.

Качество:

- образец собран в подходящий стерильный контейнер;
- объем образца достаточный;
- образец хранился до доставки в лабораторию не более 72 ч при температуре 2–8 °С.

Маркировка:

- контейнер с образцом промаркирован с указанием фамилии пациента, отделения / учреждения и порядкового номера;
- маркировка на контейнере соответствует данным, указанным в направлении на исследование.

Безопасность:

- образец доставлен в лабораторию в неповрежденном контейнере без следов пролития и контаминации внешних стенок;
- бланк направления на исследование доставлен отдельно от образца.

Документация:

- на каждый вид исследования для образца представлен специальный бланк направления на исследование;
- тип диагностического образца соответствует запрашиваемому исследованию;
- на бланке указана вся необходимая информация, написанная разборчиво;
- фамилия, имя, отчество написаны печатными буквами.

Правильное выполнение процедур сбора и транспортировки диагностических образцов в лабораторию оказывает большое влияние на качество результатов лабораторных исследований. По разным источникам, доля ошибок преаналитического этапа в общем числе лабораторных ошибок составляет в среднем около 70 %, в то время как на долю аналитического этапа приходится не более 20 % ошибок. Следует отметить, что ошибки, возникающие на пре-

аналитическом этапе лабораторных исследований, обесценивают весь дальнейший ход лабораторных исследований, дискредитируют лабораторные методы в глазах лечащего врача из-за недостоверности получаемых результатов, приводят к потере значительных средств, подвергают риску здоровье не только пациента, но и окружающих его людей.

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Туберкулез органов дыхания. Мокрота — наиболее подходящий образец для диагностики туберкулеза органов дыхания. Необходимо предпринять усилия для получения образца мокроты, прежде чем пытаться получить альтернативные образцы для исследования. В случае невозможности получения образца мокроты могут исследоваться другие образцы:

- индуцированная мокрота, полученная после аэрозольной ингаляции;
- бронхоальвеолярный смыв;
- назофарингеальный аспират;
- промывные воды желудка (дети, которые не могут откашлять мокроту, пациенты с подавленным кашлевым рефлексом);
- кал (маленькие дети).

Внелегочный туберкулез. Выбор образца для диагностики внелегочного туберкулеза зависит от предполагаемого поражения органов и тканей. Наиболее часто исследуемые образцы:

- плевральные и иные пунктаты;
- ликвор;
- гнойное отделяемое (пораженные лимфоузлы, натечные абсцессы при поражении костно-суставной системы, холодный абсцесс на месте введения вакцины БЦЖ и др.);
- биопсийный и операционный материал.

В редких случаях исследуют образцы: мочи, крови, менструальной крови.

КОНТЕЙНЕРЫ (ФЛАКОНЫ) ДЛЯ СБОРА МАТЕРИАЛА

К флаконам для сбора диагностического материала предъявляются следующие основные требования:

- флакон должен быть изготовлен из полипропилена (PP) высокой плотности (HD) и выдерживать центрифугирование при 3000 g;
- флакон должен иметь широкое горлышко (около 30 мм), чтобы пациенту было удобно собирать мокроту, не загрязняя наружной поверхности флакона;
- емкость флакона должна составлять около 50 мл;

- крышка должна быть плотно завинчивающейся, чтобы предотвратить вытекание потенциально опасного материала в процессе транспортировки;
- флакон должен иметь коническое дно, что позволяет проводить центрифугирование материала, не перенося его в другую пробирку;
- флакон должен иметь градуировку с указанием объема в мл;
- флакон должен иметь поле для маркировки.

СБОР, ХРАНЕНИЕ И ДОСТАВКА В ЛАБОРАТОРИЮ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Сбор диагностического материала. Для получения оптимальных результатов микробиологического исследования необходимо соблюдать следующие условия:

- сбор материала необходимо производить до начала химиотерапии, так как даже нескольких 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 желательно собрать 2–3 пробы утренней мокроты в течение 2–3 последовательных дней. Это существенно повышает результативность исследования.

Мокрота. Важным требованием и обязательным условием сбора мокроты является непосредственный контроль медицинским работником процедуры сбора. В целях предупреждения инфицирования потенциально заразными аэрозолями сбор мокроты должен проводиться в специально оборудованном помещении (кабине) для сбора мокроты, оснащенной приточно-вытяжной или вытяжной вентиляцией, бактерицидным облучателем, или на улице.

Медработник должен объяснить пациенту, что исследование мокроты проводится для установления диагноза и назначения правильного режима лечения или для контроля эффективности лечения, поэтому очень важно собрать качественный образец мокроты, чтобы результат исследования был достоверным. Очень важно объяснить пациенту, что следует откашливать мокроту из нижних, глубоких отделов органов дыхания, а не собирать слюну или носоглоточную слизь. Пациент должен заранее почистить зубы и прополоскать рот кипяченой водой для удаления из полости рта остатков пищи и контаминирующих бактерий.

Для получения мокроты из глубоких отделов 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.

Качественным материалом является слизистая или слизисто-гнойная мокрота, которая может содержать включения белесоватого, желтого, серого или бурого цвета. Для исследования необходимо получить достаточное количество мокроты (3–5 мл). 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. 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 индуцированной мокроты 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 раствор 10–15%-ного раствора хлорида натрия в 1%-ном растворе бикарбоната натрия.

Индукцированная мокрота 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. Их 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 6 ч до взятия образца.

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

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

Моча. Перед сбором мочи пациент должен тщательно подмыться с мылом, нельзя использовать дезинфицирующие средства. Пациент должен собрать среднюю часть утренней порции мочи в объеме 50 мл.

Кровь и спинномозговая жидкость. Кровь и спинномозговую жидкость берут у пациентов во время подъема температуры. Оптимальный объем спинномозговой жидкости — 1–3 мл, крови — 3–5 мл. Образцы рекомендуются незамедлительно доставлять в лабораторию.

Другие образцы. Плевральные и иные пунктаты, гнойное отделяемое, биопсийный и операционный материал, бронхоальвеолярный смыв, менструальная кровь, кал и др. собираются в стерильные контейнеры квалифицированным медицинским персоналом с использованием специальных методов.

Хранение и доставка в лабораторию диагностического материала. Образцы мокроты допустимо хранить в холодильнике (2–8 °С) в течение 72 ч; другие виды биологического материала следует доставлять в лабораторию как можно скорее. При хранении образцов мокроты более 72 ч при 2–8 °С значительно повышается уровень контаминации посевов и снижается вероятность получения положительных результатов исследования. Использовать морозильники (–20 °С) для хранения диагностического материала недопустимо.

Транспортировка диагностических образцов, таких как мокрота, биопсийный и операционный материал, моча, кровь и другие биологические жидкости и ткани, представляет потенциальную опасность для здоровья персонала и должна выполняться с соблюдением соответствующих мер безопасности.

Общим требованием по безопасной транспортировке биологического материала является необходимость надежной упаковки для предупреждения его вытекания. Для транспортировки контейнеров с образцами мокроты для предотвращения случайного протекания или проливания следует использовать контейнер со штативом внутри для центрифужных пробирок объемом 50 мл, плотно закрывающейся крышкой и удобной ручкой. Контейнеры для транспортировки инфицированного материала должны быть изготовлены из прочного антикоррозийного материала или пластика, устойчивого к действию дезинфицирующих средств. Дно контейнера должно быть выстлано мягким адсорбирующим материалом в количестве, достаточном для поглощения всего жидкого материала в случае его протекания.

Заполненные бланки направлений на исследование доставляются отдельно в пластиковом пакете.

ВИДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

На этапе диагностики для всех пациентов с подозрением на туберкулез проводятся микробиологические и молекулярно-генетические исследования диагностического материала.

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

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КИСЛОТОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ

Метод микроскопии является наиболее быстрым и простым методом детекции и оценки количества КУБ в препаратах нативного материала (чаще всего в мокроте) или осадка, полученного после гомогенизации и деконтаминации диагностического материала. Преимущества микроскопии, заключающиеся в скорости получения результата, относительной простоте, доступности исследования и экономической эффективности, делают его незаменимым для выявления пациентов с туберкулезом легких.

КУБ выявляют при окрашивании мазка диагностического материала по методу Циля-Нильсена или флуорохромными красителями.

Недостатком метода является его низкая чувствительность: 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. Кроме того, к недостаткам метода относятся невозможность различить живые и мертвые клетки, а также МБТ и НТМ.

Отрицательный результат микроскопического исследования на КУБ не исключает диагноз туберкулеза, так как в материале может содержаться количество КУБ 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 мочи и осадка промывных вод желудка могут обнаруживаться кислотоустойчивые сапрофиты, которые легко спутать с МБТ. Бактериоскопия менструальной крови не проводится в связи с крайне низкой результативностью исследований. Для выявления возбудителя туберкулеза в различных биологических материалах рекомендуется использовать культуральный метод исследования.

Проведение микроскопического исследования по Цилю-Нильсену, учет и интерпретация результатов. 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 КУБ окрашиваются в малиновый цвет и не теряют этой окраски после воздействия солянокислого спирта, а фон приобретает синий цвет.

Подсчитывают количество КУБ в мазке. КУБ — 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 либо парами, либо в виде групп, хорошо видны на синем фоне мазка (рис. 1).

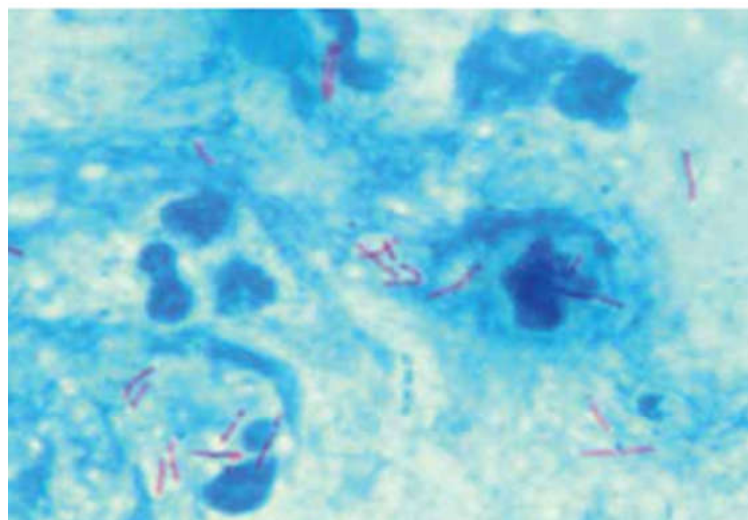


Рис. 1. Кислотоустойчивые бактерии в мазке мокроты, окрашенном по Цилю-Нильсену. Увеличение $\times 1000$

Регистрация результатов с указанием количества обнаруженных КУБ проводится в соответствии с табл. 3.

Градация результатов микроскопического исследования при окраске по Цилю-Нильсену

Количество КУБ	Минимальное число полей зрения, обязательных для просмотра	Форма записи результатов	Интерпретация результатов исследования
КУБ не обнаружены	300	Отр.	Отрицательный
1–2 КУБ в мазке	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 с окраской флуорохромами, учет и интерпретация результатов. Готовят мазок мокроты или осадка диагностического материала, высушивают на воздухе, фиксируют. Мазок окрашивают флуоресцентным красителем, промывают водой, затем обесцвечивают солянокислым спиртом и докрашивают раствором перманганата калия, акридинового оранжевого или метиленового синего.

Флуоресцентные красители (флуорохромы) (аурамин О, родамин С и др.) связываются с воскоподобными структурами бактериальных клеток. Окрашенные клетки при облучении ультрафиолетовыми лучами становятся видны как флуоресцирующие палочки желтого или оранжевого цвета на темном фоне (рис. 2).

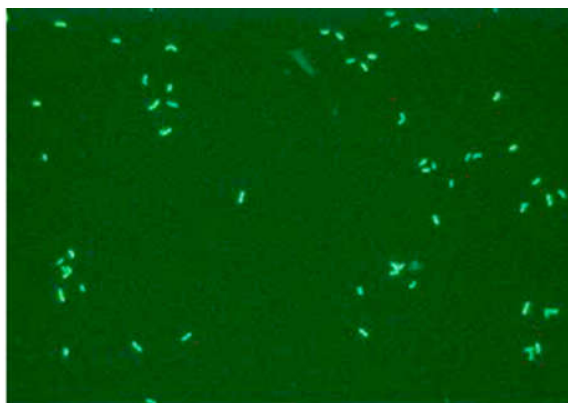


Рис. 2. Кислотоустойчивые бактерии в мазке мокроты, окрашенном флуорохромами. Увеличение $\times 400$

Микроскопическое исследование при окраске флуорохромами осуществляется при значительно меньшем увеличении (обычно $\times 400$), чем то, что используется для просмотра мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену ($\times 1000$). Поле зрения при увеличении $\times 400$ имеет значительно большую площадь, чем при увеличении $\times 1000$. Просмотренная площадь мазка при микроскопии 40 полей зрения с увеличением $\times 400$ равна площади 100 полей зрения с увеличением $\times 1000$. При микроскопировании препарата, окрашенного флуорохромами, следует просматривать не менее 40 полей зрения.

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

Таблица 4

Градации результатов микроскопического исследования при окраске флуорохромами

Количество 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 10 до 100 жизнеспособных клеток в 1 мл исследуемого материала) и специфичности культуральное исследование (посев) диагностического материала на МБТ является «золотым стандартом» в диагностике туберкулеза. Культуральное исследование позволяет увеличить число выявленных пациентов с туберкулезом более чем на 15–25 % в сравнении с микроскопией. 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 культивирования

МБТ разработаны различные питательные среды, которые делятся на три основные группы:

- яичные (плотные);
- агаровые (плотные и полужидкие);
- жидкие (синтетические и полусинтетические).

В Республике Беларусь культуральное исследование с целью диагностики туберкулеза проводится параллельно с использованием плотных яичных питательных сред Левенштейна-Йенсена и Финн II 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, в различной степени контаминировано более быстро растущими в сравнении с МБТ бактериями, являющимися частью нормальной микрофлоры организма человека. Поэтому большинство клинических образцов следует до проведения исследования подвергнуть специальной обработке N-ацетил-L-цистеином и гидроксидом натрия (NALC-NaOH) для разжижения пробы и ее деконтаминации, т. е. уничтожения нежелательной микрофлоры.

Особенностью *M. tuberculosis* является способность 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. Ресуспенсируют 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 МБТ составляет 36 ± 1 °С. В связи с медленным ростом МБТ посевы на яичной питательной среде инкубируют в термостате в течение 8 нед. 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.

Массивность роста микобактерий оценивают по следующей шкале, рекомендованной ВОЗ:

- 1–19 КОЕ — указывается точное количество;
- 20–100 КОЕ — 1+;
- 100–200 КОЕ — 2+;
- > 200 КОЕ — 3+.

Если в течение 8 нед. колонии микобактерий не появляются, регистрируют отрицательный результат исследования.

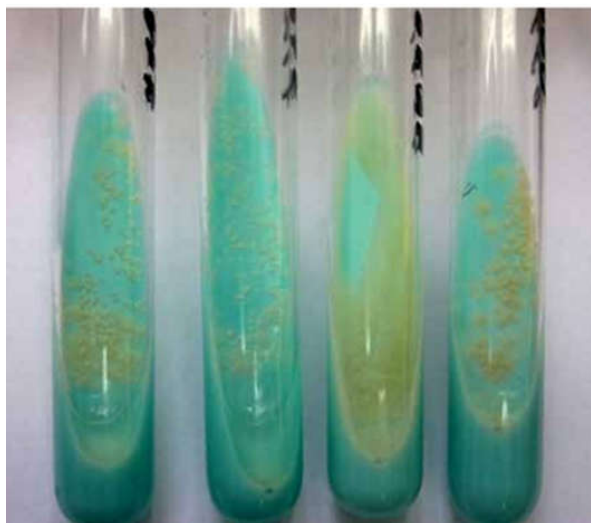


Рис. 3. Рост МБТ на яичной питательной среде

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 результата. Далее проводится идентификация выделенной культуры микобактерий и тестирование лекарственной чувствительности МБТ (рис. 3).

Инкубация посевов в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 и учет результатов. Использование автоматизированной системы для ускоренного выявления микобактерий и определения чувствительности МБТ к противотуберкулезным лекарственным средствам ВАСТЕС MGIT 960 позволяет проводить детекцию роста микобактерий и определять лекарственную чувствительность МБТ в 2–3 раза быстрее по сравнению с классическим методом посева на плотные питательные среды.

Основой технологии MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube, пробирка для индикации роста микобактерий) является специальная пробирка, снабженная флуоресцентным сенсором, реагирующим на изменение концентрации кислорода в питательной среде. Микроорганизмы в процессе роста дышат, поглощают кислород, содержащийся в пробирке. Снижение концентрации кислорода в среде вызывает возрастание уровня флуоресценции сенсора. Каждые 60 мин фотодетекторы прибора измеряют уровень флуоресценции, который пропорционален изменению концентрации кислорода в пробирке. По результатам измерения прибор определяет наличие растущих микроорганизмов в культуре.

Засеянные пробирки помещают в прибор ВАСТЕС MGIT после считывания штрих-кода (прибор указывает место для размещения пробирки) и инкубируют при постоянной температуре 37 °С. Результат исследования диагностического материала с помощью автоматизированных систем рассчитывается как положительный при наличии флуоресценции в засеянной пробирке. Максимальное рекомендованное время инкубации пробирок в приборе ВАСТЕС MGIT 960 — 42 дня. Пробирки, в которых рост микобактерий 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 (рис. 4).



Рис. 4. Культура МБТ в жидкой среде, окраска по Цилю-Нильсену

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 МБТ 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 и выделяют в питательную среду более 30 различных белков. Одним из преобладающих белков является 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*.

В иммунохроматографической 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. Тест-системы, основанные на данном принципе, обладают высокой специфичностью.

Для выполнения теста подготовленный исследуемый материал (суспензия микобактерий или жидкая культура) в небольшом количестве (100 мкл) вносится в стартовое окно тест-системы, где находятся антитела, адсорбированные на микрочастицах. Антигены взаимодействуют с антителами, происходит образование комплексов, которые начинают двигаться с током жидкости за счет капиллярности бумаги. Дойдя до антител, расположенных на бумаге в окне учета результата, комплексы связываются с ними, при этом частицы латекса или коллоидного золота проявляются в виде линии голубого (латекс) или коричневого (золото) цвета.

Интерпретация результатов теста проводится через 15 мин 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. Полоса в окне внутреннего контроля реакции свидетельствует о правильной работе тест-системы (рис. 5).



Рис. 5. Иммунохроматографический тест для идентификации *M. tuberculosis complex* (вверху — отрицательный результат, внизу — положительный результат)

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). Применение молекулярно-генетических методов позволяет с высокой точностью проводить идентификацию микобактерий в течение 1–2 рабочих дней, что является одним из главных достоинств метода.

Процедура проведения теста состоит из трех этапов: выделение ДНК из культур, выросших на плотной или жидкой среде, амплификация, гибридизация ДНК исследуемого штамма со специфическими для вида микобактерий ДНК-зондами на нитроцеллюлозном стрипе (полоске). Учет результатов проводится путем сопоставления проявившихся на стрипе зондов с таблицей интерпретации (рис. 6).

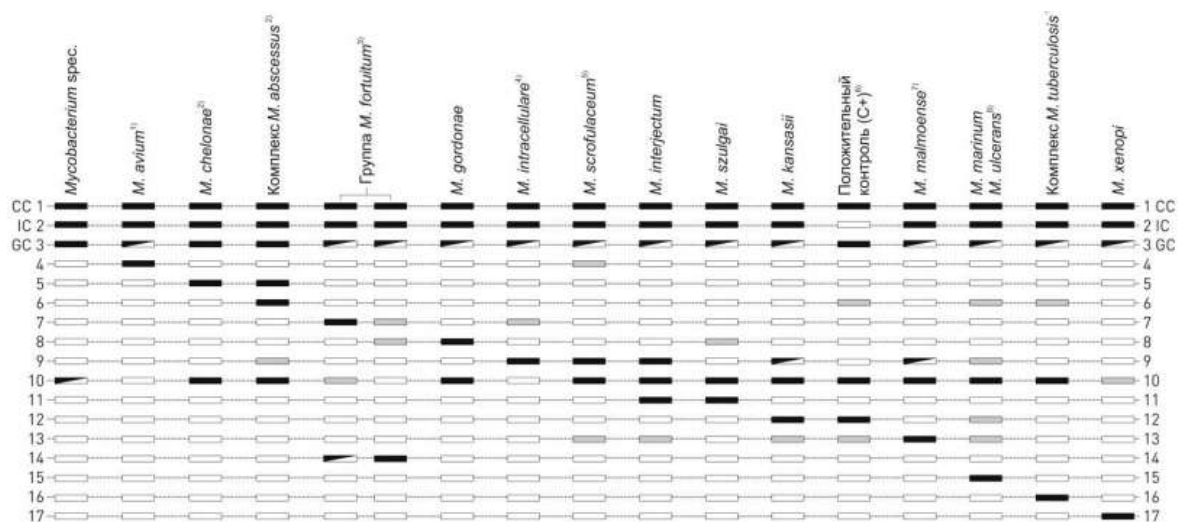


Рис. 6. Идентификация НТМ с использованием GenoType Mycobacterium CM

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 морфологических 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 (рис. 7).

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*, обладающие нитратредуктазой, 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 ч при 37 °С. После этого в пробирку добавляют раствор соляной кислоты, сульфаниламида, N-нафтилэтилендиамина. Положительный результат: красное окрашивание (оттенки от розового до темно-красного). Отрицательный результат — нет окрашивания (рис. 8).



Рис. 7. Ниациновый тест: слева — отрицательный, справа — положительный

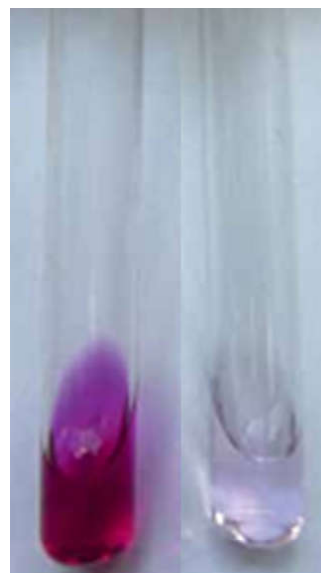


Рис. 8. Нитратредуктазный тест: слева — положительный, справа — отрицательный

Тест с пара-нитробензойной кислотой (ПНБ-тест). Пара-нитробензойная кислота (ПНБК) ингибирует рост МБТ в отличие от НТМ. Для выполнения теста готовят яичную среду, содержащую определенную концентрацию ПНБК, засевают суспензию микобактерий в пробирку с ПНБК и контрольную пробирку, не содержащую ПНБК. Пробирки инкубируют при 37 °С в течение 28 сут.

Если в обеих пробирках отмечается обильный рост, то исследуемый штамм принадлежит к НТМ. Если в контрольной пробирке отмечается обильный рост, а в пробирке с ПНБК — 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 на питательных средах 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 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 нед., после чего проводят учет результатов.

Штамм микобактерий считается чувствительным к ПТЛС в случае присутствия в популяции менее 1 % резистентных микобактерий, т. е. 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, т. е. 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 в системе ВАСТЕС MGIT 960 проводится с использованием метода пропорций, то есть определения пропорции устойчивых клеток в популяции, и выпол-

няется с использованием набора AST (тестирование чувствительности к антибактериальным средствам), который состоит из контрольной пробирки MGIT, по одной пробирке MGIT для каждого ПТЛС, а также держателя со штрихкодом, в который помещаются пробирки. Пробирки в держателе AST располагаются в определенном порядке, слева от всех пробирок набора располагается пробирка контроля роста (рис. 9).



Рис. 9. Набор AST

Для выполнения теста готовят набор AST. Каждая из пробирок набора, за исключением контрольной, содержит определенную концентрацию ПТЛС. Готовят суспензию МБТ, стандартизируют ее по оптической плотности, засевают в пробирки с ПТЛС и в контрольную пробирку, не содержащую ПТЛС. Набор пробирок AST размещают в приборе после считывания штрих-кода держателя AST. Набор находится в приборе в течение 7–14 дней (до 21 дня для пиразинамида). Прибор определяет достаточное количество культуры в пробирке контроля роста и автоматически сравнивает рост микобактерий в пробирках с ПТЛС с ростом в контрольной пробирке.

Если исследуемый штамм МБТ чувствителен к данному ПТЛС, рост микобактерий будет ингибирован, и в пробирке, содержащей ПТЛС, будет подавлена флуоресценция, в то время как в контроле того же образца, не содержащем ПТЛС, уровень флуоресценции увеличится.

Если исследуемый штамм МБТ устойчив к данному ПТЛС, рост микобактерий и соответствующее увеличение флуоресценции будет наблюдаться в обеих пробирках: содержащей и не содержащей ПТЛС.

Система VASTEC 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.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ТУБЕРКУЛЕЗ

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 диагностики при подозрении на туберкулез.

Самый распространенный метод молекулярно-генетической диагностики — метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). 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 репликации. Одно из отличий заключается в том, что ПЦР используется для амплификации не всей хромосомы, а лишь небольшого участка ДНК (последовательности-мишени).

Формирование лекарственной устойчивости МБТ является результатом мутаций в бактериальной хромосоме. Благодаря определению нуклеотидных последовательностей генов, мутации в которых приводят к возникновению резистентности к ПТЛС, стало возможным определять лекарственную чувствительность МБТ на основании выявления различий в генетической структуре чувствительных и устойчивых штаммов.

Технология проведения исследований 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 и визуализация результатов гибридизации, при которой определяется наличие в пробе микобактерий комплекса *M. tuberculosis*, а также наличие либо отсутствие мутаций в исследуемых генах.

В настоящее время в Республике Беларусь 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 тесты Xpert MTB (GeneXpert) (Cepheid, США). Эти методы позволяют одновременно проводить детекцию наличия МБТ в исследуемом образце и определение лекарственной чувствительности МБТ.

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

В системе GeneXpert объединены и автоматически выполняются следующие процессы:

- обработка образцов;
- амплификация нуклеиновых кислот;
- выявление целевой последовательности.

Для работы с системой требуются одноразовые картриджи GeneXpert, которые содержат реактивы для ПЦР и необходимые контроли и в которых происходит ПЦР (рис. 10). Поскольку картриджи представляют собой замкнутые системы для проведения реакции, перекрестная контаминация между образцами исключена.



Рис. 10. Картриджи GeneXpert

ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) основана на использовании флуоресцентных ДНК-зондов. Интенсивность флуоресценции по мере амплификации продуктов ПЦР возрастает пропорционально числу амплифицированных участков ДНК. Замена хотя бы одного нуклеотида в последовательности ДНК-мишени (мутация) ведет к нарушению гибридизации с соответствующим зондом и, как следствие, к отсутствию флуоресценции.

В тесте Xpert MTB/RIF амплифицируется фрагмент гена *rpoB*, содержащий 81 пару оснований. Зонды позволяют отличить последовательность микобактерии «дикого типа» от мутаций, связанных с устойчивостью к рифампицину. Таким образом, детекция мутаций, а, следовательно, и устойчивости к рифампицину, производится по отсутствию сигнала одного или нескольких зондов. Результаты выдаются прибором на основании измерений флуоресцентных сигналов каждой пробы и встроенных алгоритмов расчета (рис. 11). Специфичность метода составляет 97,9 %.

Отрицательный результат исследования образца КУБ+ методом Xpert MTB/RIF может свидетельствовать о присутствии в образце НТМ.

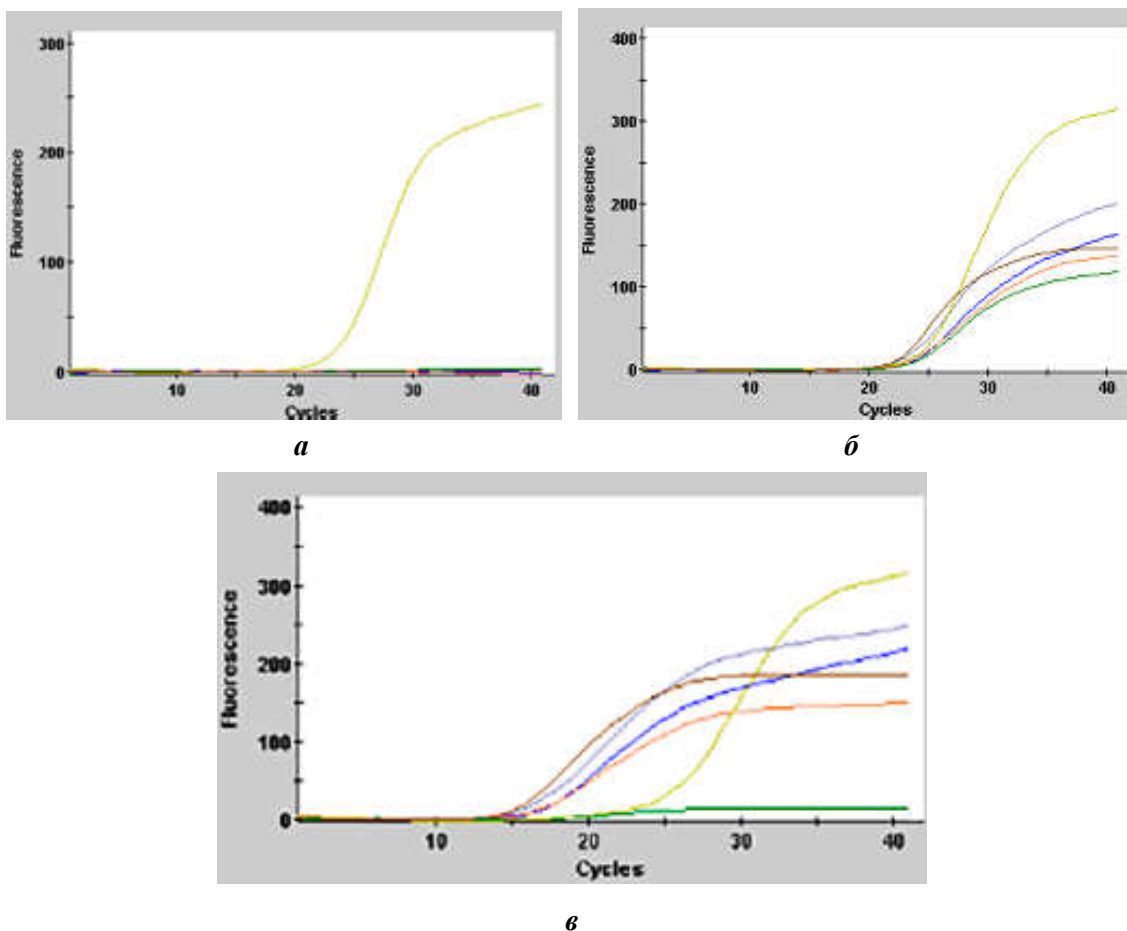


Рис. 11. Результаты исследования Xpert MTB/RIF:

а — МБТ не выявлены (амплифицирован только контрольный зонд); *б* — МБТ выявлены в небольшом количестве, не выявлена устойчивость к рифампицину (амплифицированы все зонды); *в* — МБТ выявлены в умеренном количестве, выявлена устойчивость к рифампицину (не амплифицирован один из зондов)

Тест Xpert MTB/RIF Ultra. Данный тест был одобрен ВОЗ в 2010 г. и используется более чем в 130 странах мира. В 2017 г. ВОЗ одобрила тест Xpert MTB/RIF Ultra, который отличается следующими особенностями:

- улучшенные функциональные характеристики;
- более быстрое получение результата (менее чем за 80 мин);
- более высокая аналитическая чувствительность (16 КОЕ/мл по сравнению с 131 КОЕ/мл для Xpert MTB/RIF);
- высокая точность результатов определения устойчивости к рифампицину;
- улучшение определения в случаях смешанных инфекций;
- такой же простой в применении процесс тестирования.

Чувствительность метода для выявления МБТ составляет 73,3 %; для образцов КУБ– культура — + 99,5 %; для образцов КУБ+ культура+ специфичность метода — 95,5 %.

Чувствительность метода для обнаружения устойчивости к рифампицину составляет 97,2 %, специфичность метода составляет 98,3 %.

Тест Xpert MTB/RIF Ultra не может подтвердить наличие чувствительности к рифампицину, так как могут существовать другие механизмы устойчивости к рифампицину, отличающиеся от обнаруживаемых данным тестом.

Тест Xpert MTB/XDR. Применяется с целью обнаружения ДНК комплекса *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью в образцах необработанной мокроты или концентрированных осадках, приготовленных из мокроты.

В образцах, в которых найдены МБТ, тест Xpert MTB/XDR также обнаруживает мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду (гены *katG* и *fabG1*, интергенный регион *oxyR-ahpC* и промотор *inhA*); этионамиду (промотор *inhA*); фторхинолонам (регионы *gyrA* и *gyrB*, определяющие устойчивость к хинолонам (QRDR); инъекционным ПТЛС второй линии (ген *rrs* и промоторный участок *eis*).

Чувствительность теста Xpert MTB/XDR для обнаружения лекарственной устойчивости составляет > 93 % для фторхинолонов и более 96 % для изониазида, инъекционным ПТЛС второй линии (амикацин, канамицин, капреомицин) и этионамида. Специфичность составляет 100,0 % для всех ПТЛС, кроме изониазида, для которого этот параметр был равен 98,7 %.

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 детекции 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) (рис. 12).

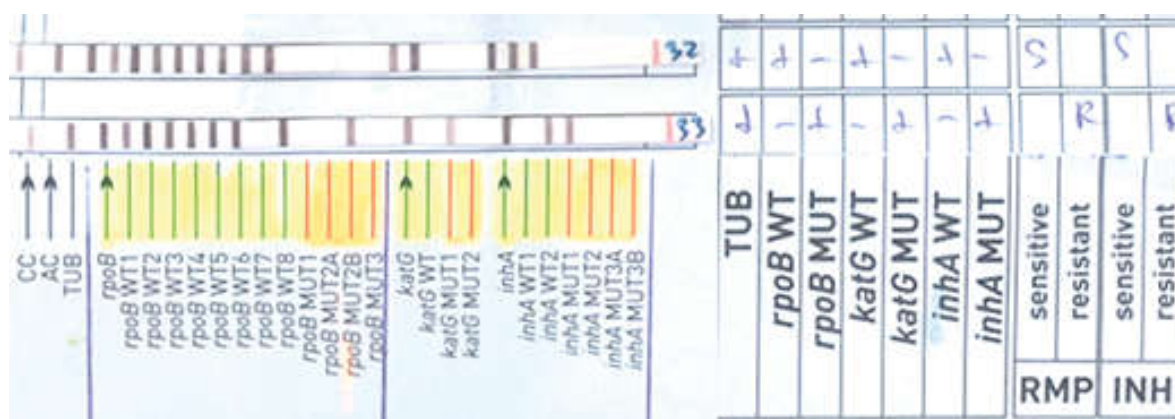


Рис. 12. Результаты исследования GenoType MTBDRplus

Верхний стрип — чувствительность к рифампицину и изониазиду (нет мутаций), нижний стрип — устойчивость к рифампицину и изониазиду (отсутствие зондов «дикого типа», мутации в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*)

Длительность исследования — 1–2 дня. Отрицательный результат исследования образца КУБ+ методом LPA может свидетельствовать о присутствии в образце НТМ.

ДЕЙСТВИЯ В СЛУЧАЕ НЕСОВПАДЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РАЗНЫХ ТЕСТОВ

Молекулярно-генетические тесты для выявления наличия МБТ и мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, выполняются последовательно или параллельно с тестированием фенотипической лекарственной чувствительности. Эти две группы методов основаны на разных принципах (детекция мутаций, ассоциированных с лекарственной чувствительностью и ингибирование роста МБТ в присутствии ПТЛС). Чувствительность и специфичность методов, заявленные производителями на основании данных валидации, как правило, не равны 100 %, т. е. между результатами молекулярно-генетических и фенотипических тестов могут возникать расхождения.

Причины расхождений результатов, полученных с использованием разных методов, могут включать:

- пре-, пост- и аналитические ошибки;
- ассоциацию МБТ с НТМ;
- молчащие мутации;
- мутации за пределами области, определяющей устойчивость к ПТЛС, используемой в данном методе;
- гетерорезистентность, то есть присутствие в популяции МБТ с разной лекарственной устойчивостью и др.

Устранение противоречия в результатах является сложной задачей, требующей проведения детального анализа ситуации, определения возможной

причины расхождения результатов и при необходимости проведения повторных исследований.

При интерпретации результатов определения лекарственной чувствительности МБТ у пациентов в случае несовпадения данных, полученных с использованием ВАСТЕС MGIT 960 и метода абсолютных концентраций, принимают во внимание результаты обоих методов. В данном случае рекомендуется проведение повторного тестирования или исследование с использованием молекулярно-генетических методов.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

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 яичной питательной среде.

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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. *Руководство* по лабораторной диагностике туберкулеза [Электронный ресурс] : приказ М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 22 марта 2013 г. № 377. Режим доступа: <https://www.pravo.by>. Дата доступа: 20.06.2023.

2. *Клинический протокол* «Диагностика и лечение пациентов с туберкулезом (взрослое и детское население)» [Электронный ресурс] : постановление М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 16 дек. 2022 г. № 118. Режим доступа: <https://www.minzdrav.gov.by>. Дата доступа: 20.06.2023.

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

Дополнительная

4. *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, 2015. 448 с.

5. *Гельберг, И. С.* Фтизиопульмонология : учеб. / И. С. Гельберг, С. Б. Вольф, Е. Н. Алексо. Минск : Вышэйшая школа, 2022. 381 с.

6. *Руководство* по ведению пациентов с латентной туберкулезной инфекцией (Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management). Женева : ВОЗ, 2018. 64 с.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

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 туберкулеза с высокой вероятностью	Изоляция пациента, назначение быстрых методов диагностики МЛУ-ТБ, решение вопроса о назначении химиотерапии
Бактериологическое исследование (плотные питательные среды)	Обнаружение жизнеспособных МБТ (колонии на поверхности питательной среды)	10–100 клеток МБТ в пробе	Высокая	21–56 дней	КУБ не обнаружены	Не исключает диагноз туберкулеза	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований
					Культура МБТ выделена	Диагноз туберкулеза	Лечение
Бактериологическое исследование (ВАСТЕС (MGIT 960))	Обнаружение жизнеспособных микобактерий (флуоресценция)	10–100 клеток МБТ в пробе	Высокая	5–42 дня	Культура МБТ не выделена	Не исключает диагноз туберкулеза	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований
					Культура МБТ выделена	Диагноз туберкулеза	Лечение

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 туберкулеза с высокой вероятностью	Назначение исследования с использованием ВАСТЕС MGIT 960, решение вопроса о назначении химиотерапии
					ДНК МБТ не обнаружена	Не исключает диагноз туберкулеза	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 туберкулеза с высокой вероятностью	Назначение исследования с использованием ВАСТЕС MGIT 960, решение вопроса о назначении химиотерапии
					ДНК МБТ не обнаружена	Не исключает диагноз туберкулеза	При наличии клинико-рентгенологической симптоматики продолжение диагностических исследований

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Метод	Принцип метода	ПТЛС, к которым выполняется тестирование лекарственной чувствительности	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, Lfx, 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, Z, Am, Lfx, Mfx, Lzd, Bdq, Dlm, Cfz, Pa	7–14 дней (7–21 день для Pza)
Xpert MTB	Детекция мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью	R / H, Fq, Am, Km, Cm, Eto	2 часа
LPA	Детекция мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью	H, R / Fq, Am, Cm, Km	1–2 дня

ОГЛАВЛЕНИЕ

Мотивационная характеристика темы	3
Возбудитель туберкулеза. Нетуберкулезные микобактерии	4
Возбудитель туберкулеза	4
Нетуберкулезные микобактерии. Классификация	6
Диагностический материал для исследования на туберкулез	8
Образцы для диагностики туберкулеза.....	9
Контейнеры (флаконы) для сбора материала	9
Сбор, хранение и доставка в лабораторию диагностического материала для микробиологической диагностики туберкулеза	10
Виды лабораторных исследований для выявления микобактерией туберкулеза	13
Микроскопическое исследование для выявления кислотоустойчивых бактерий	13
Культуральное (бактериологическое) исследование	16
Идентификация микобактерий	19
Определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза	23
Молекулярно-генетические методы исследования на туберкулез	25
Действия в случае несовпадения результатов разных тестов	29
Задания для самостоятельной работы студентов	30
Список использованной литературы	31
Приложение 1	32
Приложение 2	34

Учебное издание

Кривошеева Жанна Ивановна
Емельянова Наталия Александровна
Залуцкая Оксана Михайловна
Дюсьмикеева Марина Игоревна

**ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА.
СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ**

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Ж. И. Кривошеева
Редактор А. М. Мурашко
Компьютерная вёрстка А. В. Янушкевич

Подписано в печать 30.11.23. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Хероx office».

Ризография. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 2,09. Уч.-изд. л. 1,68. Тираж 109 экз. Заказ 661.

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

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 24.11.2023.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.