

Традиции и новации в лабораторной диагностике туберкулеза в Российской Федерации

Л.Н. Черноусова, В.В. Мищенко

В настоящее время в мире отмечается рост заболеваемости и смертности от туберкулеза, особенно в странах Восточной Европы, в том числе и в России. Рост заболеваемости обусловлен большим резервуаром инфекции, несвоевременным выявлением бациллярных больных, распространяющих туберкулезную инфекцию.

В последние пять лет в Российской Федерации **заболеваемость** впервые выявленным активным туберкулезом стабилизировалась на высоком уровне, составив в 2006 г. 82,4 случая на 100 тыс. населения. Этот показатель был существенно выше среднего в Сибирском (131,6) и в Дальневосточном (127,8) федеральных округах, а также в Калининградской, Смоленской, Волгоградской, Оренбургской, Курганской областях, Республике Калмыкия, Пермском крае – 100,3–137,5 на 100 тыс. населения. Среди детей заболеваемость туберкулезом в 2006 г. составила 16,1 на 100 тыс. детей. Особенно неблагоприятное положение сложилось в Калининградской, Магаданской областях, республиках Калмыкия, Северная Осетия-Алания, Саха (Якутия), Камчатском крае, Ямало-Ненецком автономном округе, где заболеваемость детей в значительной мере обусловлен высоким уровнем заболеваемости населения в целом.

Высокой остается **смертность** от туберкулеза. В 2006 г. она составила 19,5 случая на 100 тыс. населения, в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах – 33 и 37 случаев на 100 тыс. населения. На долю туберкулеза приходится около 80% всех летальных исходов от инфекционных заболеваний.

Почти половина бациллярных больных, представляющих эпидемиологическую опасность для окружающих, своевременно не выявляется. Между тем такой больной может заразить за год от 5 до 50 человек. Поэтому в стране разворачивается работа по выявлению бациллярных больных среди лиц, обратившихся в поликлиники и больницы общего профиля с жалобами на выделение мокроты, путем микроскопического исследования мокроты в клинико-диагностических лабораториях этих медицинских учреждений.

Лариса Николаевна Черноусова – докт. биол. наук, профессор, зав. отделом микробиологии ЦНИИ туберкулеза РАМН.

Владимир Владимирович Мищенко – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник.

В настоящее время для выявления больных туберкулезом применяются различные методы. Общепринятыми являются бактериоскопическое исследование мокроты у лиц с симптомами, подозрительными на туберкулез (кашель с выделением мокроты дольше 3 нед, боли в грудной клетке, кровохарканье, снижение массы тела), рентгенография грудной клетки и туберкулинодиагностика у детей и подростков.

Диагностика туберкулеза основывается на данных клинических, гистологических, микробиологических исследований, оценке результатов туберкулиновых проб и тест-терапии. Из этих методов самым надежным является обнаружение **микобактерий туберкулеза (МБТ)**, остальные же информативны только в комплексе. Современная микробиологическая диагностика туберкулеза состоит из нескольких основных групп анализов, направленных на выявление возбудителя, определение лекарственной чувствительности и типирование МБТ.

Обнаружение возбудителя начинается с наиболее простых и быстрых **бактериоскопических методов**: световой микроскопии с окраской по Цилю–Нильсену и люминесцентной микроскопии с окраской флюорохромами. Преимущество бактериоскопии – в скорости получения результата, однако возможности ее ограничены из-за низкой чувствительности. Этот метод является наиболее экономичным и рекомендован Всемирной организацией здравоохранения в качестве основного для выявления разных больных.

“Золотым стандартом” выявления МБТ признаны **культуральные исследования**. В России для посева патологического материала используют яичные среды: Левенштейна–Йенсена, Финна-II, Мордовского и др. Для повышения процента выделения микобактерий посевы патологического материала проводят на несколько сред, в том числе и на жидкие, что позволяет удовлетворить все культуральные потребности возбудителя. Посевы инкубируют до 2,5 мес, при отсутствии роста к этому времени посев считается отрицательным.

Наиболее чувствительным способом обнаружения МБТ считается **метод биологической пробы** – заражение диагностическим материалом высокочувствительных к туберкулезу морских свинок.

Развитие молекулярной биологии позволило значительно повысить эффективность обнаружения микобактерий. Базовым методом молекулярно-генетических исследований является **полимеразная цепная реакция (ПЦР)**, направленная на выявление ДНК микобактерий в диагностическом материале. ПЦР дает экспоненциальную амплификацию специфического участка ДНК возбудителя: 20 циклов ПЦР приводят к увеличению содержания исходной ДНК в 1 миллион раз, что позволяет визуализировать результаты методом электрофореза в агарозном геле.

Роль молекулярной диагностики в клинической практике повышается, поскольку увеличивается число больных со скудным бактериовыделением. Однако при установлении диагноза результаты ПЦР являются дополнительными и должны сопоставляться с данными клинического обследования, рентгенографии, микроскопии мазка, посева и даже ответа на специфическое лечение.

Для **определения лекарственной устойчивости** МБТ используются несколько методов. По приказу Минздрава России № 109 от 21 марта 2003 г. в бактериологических лабораториях используется метод абсолютных концентраций: посев выделенных культур микобактерий на плотную питательную среду с критическими концентрациями противотуберкулезных препаратов. В случае выявления устойчивости к препаратам первого ряда (рифампицину, изониазиду, пипразинамиду, стрептомицину и этамбутолу) проводят исследование на устойчивость к препаратам резервного ряда (фторхинолонам, амикацину, капреомицину, циклосерину, парааминосалициловой кислоте, этионамиду, протионамиду).

В крупных противотуберкулезных центрах используют методы определения лекарственной устойчивости МБТ при посеве на жидкие питательные среды в системе BACTEC MGIT 960. Эта система проводит автоматизированный учет роста микобактерий, позволяя сокращать срок анализа до 14 дней.

В последнее время разрабатываются и внедряются новые методы оценки лекарственной устойчивости по мутациям в геноме МБТ. Работа по изучению молекулярных механизмов резистентности показала наличие у микобактерий генов, мутации в которых определяют развитие устойчивости к различным препаратам: к изониазиду – гены *katG*, *inhA*, *ahpC/oxuR*, *kasA*, *furA* и *ndh*, к рифампицину – *rpoB*, к стрептомицину – *rpsL*, к фторхинолонам – *gyrA* и т.д.

Доступность данных по молекулярной основе лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам предоставила возможность для разработки новых методов, основанных на ПЦР. Работы сотрудников отдела микробиологии ЦНИИ туберкулеза РАМН, проведенные совместно с Институтом физико-химической медицины Росздрава и Институтом молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, продемонстрировали перспективность использования молекулярно-генетических методов для быстрого определения лекарственной устойчивости.

Большие надежды в области определения лекарственной устойчивости микобактерий связаны с развитием микрочиповой технологии. Этот высокочувствительный метод позволяет определять устойчивость микобактерий одновременно к нескольким противотуберкулезным препаратам непосредственно в диагностическом материале в течение 2 дней. Совместные исследования ученых Института молекулярной биологии РАН, разработчиков технологии биочипов, с сотрудниками ЦНИИТ РАМН – специалистами в области микробиологии и молекулярной диагностики туберкулеза, привели к идее создания биочипа для обнаружения МБТ и определения их чувствительности к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам.

Комплекс методов имеется и для **типирования микобактерий**, в котором используются культуральные, биохимические, биологические, а также молекулярно-генетические методы. На основе молекулярно-генетического типирования микобактерий интенсивно развивается область молекулярно-эпидемиологических исследований, в которой по генотипу микобактерии выявляются очаги и прослеживаются пути распространения туберкулезной инфекции.

Косвенные методы для определения наличия МБТ в организме больного базируются в основном на **выявлении специфических антител**. Исторически первым методом является **туберкулинодиагностика** – она заключается в выявлении иммунных реакций, развивающихся в коже при введении туберкулина. Из большого количества вариантов туберкулиновых проб в настоящее время широко используется внутрикожная проба Манту. Методы туберкулинодиагностики сохранили свое диагностическое значение только среди пациентов детского и подросткового возраста. Вспомогательную роль в диагностике внелегочного туберкулеза играют пробы с подкожным введением туберкулина, когда ориентируются на характерную очаговую реакцию (туберкулез глаз, туберкулез женских половых органов). Более широкому применению туберкулиновых проб с диагностической целью у взрослых препятствует невозможность в большинстве случаев отличить состояние инфицированности и болезни.

Существуют методики для **определения антител к МБТ** в различных биологических субстратах с помощью иммуноферментного анализа. Главная проблема, возникающая при разработке специфической иммунодиагностики, заключается в получении препаратов антигенов и антител, позволяющих добиться оптимального соотношения чувствительности и специфичности тестов. Сейчас преобладает мнение о целесообразности использования этих методов только для скрининга туберкулеза и отбора пациентов для детального обследования.

Новый лабораторный тест для диагностики туберкулеза **CLINISPOT-TB** заключается в определении количества Т-лимфоцитов, высвобождающих γ -интерферон при контакте со специфическими антигенами МБТ. Наличие эффекторных Т-лимфоцитов свидетельствует об инфициро-

вании МБТ. CLINISPOT-TB обладает высокой чувствительностью, позволяя выявлять единичные Т-лимфоциты и таким образом диагностировать латентную инфекцию, а также инфекцию у лиц со сниженным иммунным ответом. Высокая специфичность теста достигается использованием антигенов, специфичных для патогенных штаммов МБТ, что приводит к отсутствию ложноположительных результатов у вакцинированных или инфицированных другими микобактериями лиц. В ходе клинических исследований было показано, что чувствительность теста CLINISPOT-TB при

активном туберкулезе достигает 96% даже у пациентов с внелегочной локализацией процесса, в то время как чувствительность кожной пробы составляла 69%.

В заключение необходимо подчеркнуть, что имеется научный потенциал для совершенствования бактериологической диагностики туберкулеза, а благодаря успехам молекулярной биологии существует возможность значительно сократить сроки выявления микобактерий, определения лекарственной устойчивости и оптимизировать контроль за эффективностью химиотерапии. ●

Книги Издательского дома "АТМОСФЕРА"



Клинические исследования. 2-е изд., испр. и доп. (автор О.Г. Мелихов)

В монографии достаточно полно и вместе с тем популярно изложены основные теоретические и практические аспекты клинических исследований. Клиническое исследование – это изучение безопасности и эффективности исследуемого препарата у человека для выявления или подтверждения его клинических, фармакологических, фармакодинамических свойств, побочных эффектов и других особенностей действия на организм. Задача всех имеющих отношение к этому процессу специалистов – минимизировать риск, которому подвергаются участвующие в исследованиях пациенты, и получить безупречные научные данные о свойствах нового лекарственного средства. Рассмотрены история, фазы и виды клинических исследований, вопросы планирования, проведения и контроля качества. Особое внимание уделено этическим вопросам.

Второе издание (первое издание выпущено в 2003 г.) дополнено сведениями о нормативных документах Российской Федерации и международных организаций, вышедших в свет в период с 2004 по 2007 г. 200 с.

Для специалистов в области клинических исследований, врачей-исследователей и всех тех, кто интересуется процессом разработки новых лекарственных средств.

Всю дополнительную информацию можно получить на сайте www.atmosphere-ph.ru