



Общероссийская общественная организация

**«РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО
ФТИЗИАТРОВ»**

**Федеральные клинические
рекомендации по организации и
проведению микробиологической и
молекулярно-генетической диагностики
туберкулеза**

2014

Москва

A15. ТУБЕРКУЛЕЗ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ, ПОДТВЕРЖДЕННЫЙ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИ

A16. ТУБЕРКУЛЕЗ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ, НЕ ПОДТВЕРЖДЕННЫЙ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИ ИЛИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИ

A17+. ТУБЕРКУЛЕЗ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

A18. ТУБЕРКУЛЕЗ ДРУГИХ ОРГАНОВ

A19. МИЛИАРНЫЙ ТУБЕРКУЛЕЗ

Коллектив авторов

Черноусова Лариса Николаевна, профессор, д.б.н.

Севастьянова Элина Викторовна, д.б.н.

Ларионова Елена Евгеньевна, к.б.н.

Смирнова Татьяна Геннадиевна, к.м.н.

Андреевская Софья Николаевна, к.м.н.

Попов Сергей Александрович, к.м.н.

Журавлев Вячеслав Юрьевич, к.м.н.

Пузанов Владимир Алексеевич, к.м.н.

Марьяндышев Андрей Олегович, профессор, чл.-корр. РАН

Вахрушева Диана Владимировна, к.б.н.

Кравченко Марионелла Анатольевна, к.б.н.

Сафонова Светлана Григорьевна, д.б.н.

Васильева Ирина Анатольевна, профессор, д.м.н.

Эргешов Атаджан Эргешович, профессор, д.м.н.

Оглавление

| | Стр. |
|--|------|
| 1. Методология | 6 |
| 2. Список сокращений | 8 |
| 3. Определения | 8 |
| 4. Обследуемые пациенты и диагностический материал, подвергаемый исследованию для диагностики туберкулеза | 9 |
| 5. Микробиологическая и молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза | 10 |
| 5.1. Современные методы и технологии микробиологической и молекулярно- генетической диагностики туберкулеза | 10 |
| 5.2. Этапы микробиологического и молекулярно-генетического обследования | 18 |
| Приложение 1 | 24 |
| Приложение 2 | 26 |
| Приложение 3 | 27 |

*Медицинские профессиональные некоммерческие организации
разрабатывают и утверждают клинические рекомендации
(протоколы лечения) по вопросам оказания медицинской помощи*

Статья 76. п. 2 Федерального закона Российской Федерации

от 21 ноября 2011 г.

№ 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан
в Российской Федерации»

Упоминание тех или иных компаний или названий продуктов отдельных изготовителей не означает, что РОФ отдает им предпочтение по сравнению с другими компаниями или продуктами аналогичного характера, не упомянутыми в тексте.

Основная цель этих рекомендаций – дать объективную основу для разработки пациент-ориентированной тактики противотуберкулезной помощи и оптимизации лечения пациентов: лечение пациентов должно предотвращать смертность, рецидивы, приобретение/амплификацию устойчивости к противотуберкулезным препаратам и распространение туберкулеза.

Основной целевой аудиторией рекомендаций являются клиницисты (фтизиатры), организаторы здравоохранения вместе с другими медицинскими работниками, занятыми лечением больных туберкулезом.

Рекомендации направлены на получение данных для лечения активного туберкулеза у взрослых. Они не содержат многие смежные темы, которые описаны в других публикациях.

Рекомендации содержат отдельные положения по микробиологической и молекулярно-генетической диагностике туберкулеза, влияющие на принятие решения в проведении необходимой и достаточной диагностики туберкулеза, выборе необходимого режима лечения, адекватного диагностированному случаю заболевания. Они не исключают дополнительных мер диагностики, уточняющих характеристику микроорганизма, пациента и дающих возможность применять более обосновано арсенал терапевтических мероприятий.

1. Методология

Рекомендации выстроены по иерархическому принципу и имеют разную силу и уровни доказательности.

Методы, использованные для сбора/селекции доказательств:

поиск в электронных базах данных.

Описание методов, использованных для сбора/селекции доказательств:

доказательной базой для рекомендаций являются публикации, вошедшие в Кохрайновскую библиотеку, базы данных EMBASE и MEDLINE. Глубина поиска составляла 5 лет.

Методы, использованные для оценки качества и силы доказательств:

- Консенсус экспертов;
- Оценка значимости в соответствии с рейтинговой схемой (схема прилагается).

Рейтинговая схема для оценки силы рекомендаций:

| Уровни доказательств | Описание |
|----------------------|--|
| 1++ | Мета-анализы высокого качества, систематические обзоры рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), или РКИ с очень низким риском систематических ошибок |
| 1+ | Качественно проведенные мета-анализы, систематические, или РКИ с низким риском систематических ошибок |
| 1- | Мета-анализы, систематические, или РКИ с высоким риском систематических ошибок |
| 2++ | Высококачественные систематические обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований. Высококачественные обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований с очень низким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи |
| 2+ | Хорошо проведенные исследования случай-контроль или когортные исследования со средним риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи |
| 2- | Исследования случай-контроль или когортные исследования с высоким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи |
| 3 | Не аналитические исследования (например: описания случаев, серий случаев) |
| 4 | Мнение экспертов |

Методы, использованные для анализа доказательств:

- Обзоры опубликованных мета-анализов;
- Систематические обзоры с таблицами доказательств.

Описание методов, использованных для анализа доказательств:

При отборе публикаций, как потенциальных источников доказательств,

использованная в каждом исследовании методология изучается для того, чтобы убедиться в ее валидности. Результат изучения влияет на уровень доказательств, присваиваемый публикации, что в свою очередь влияет на силу, вытекающих из нее рекомендаций.

Методологическое изучение базируется на нескольких ключевых вопросах, которые сфокусированы на тех особенностях дизайна исследования, которые оказывают существенное влияние на валидность результатов и выводов.

На процессе оценки, несомненно, может сказываться и субъективный фактор. Для минимизации потенциальных ошибок каждое исследование оценивалось независимо, т.е. по меньшей мере, двумя независимыми членами рабочей группы. Какие-либо различия в оценках обсуждались уже всей группой в полном составе. При невозможности достижения консенсуса, привлекался независимый эксперт.

Таблицы доказательств:

Таблицы доказательств заполнялись членами рабочей группы.

Методы, использованные для формулирования рекомендаций:

Консенсус экспертов.

Рейтинговая схема для оценки силы рекомендаций:

| Сила | Описание |
|----------|---|
| A | По меньшей мере, один мета-анализ, систематический обзор, или РКИ, оцененные, как 1++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие устойчивость результатов или группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 1+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов |
| B | группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 2++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных, как 1++ или 1+ |
| C | группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 2+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов; или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных, как 2++ |
| D | Доказательства уровня 3 или 4; или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных, как 2+ |

Индикаторы доброкачественной практики (Good Practice Points - GPPs):

Рекомендуемая доброкачественная практика базируется на клиническом опыте членов рабочей группы по разработке рекомендаций.

Экономический анализ:

Анализ стоимости не проводился и публикации по фармакоэкономике не анализировались.

Метод валидации рекомендаций:

- Внешняя экспертная оценка;
- Внутренняя экспертная оценка.

Основные рекомендации:

Сила рекомендаций (A-D), уровни доказательств (1++, 1+, 1-, 2++, 2+, 2-, 3, 4) и индикаторы доброкачественной практики - good practice points (GPPs) приводятся при изложении текста рекомендаций.

2. Список сокращений

БЛ – бактериологическая лаборатория

КУМ – кислотоустойчивые микроорганизмы

ЛУ – лекарственная устойчивость

ЛЧ – лекарственная чувствительность

МБ – микобактерии

МБТ – микобактерии туберкулеза

МБТК – микобактерии туберкулезного комплекса

МГМ – молекулярно-генетические методы

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МЛУ-ТБ – туберкулез, вызванный возбудителем с МЛУ

НТМБ – нетуберкулезные микобактерии

ППС – плотные питательные среды

ПТП – противотуберкулезный препарат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТБ – туберкулез

Ц-Н – окраска по Ziehl-Neelsen

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

ШЛУ-ТБ – туберкулез, вызванный возбудителем с ШЛУ

LED – (Light Emission Diode) светодиод

3. Определения

Лекарственная чувствительность (ЛЧ) микобактерий туберкулеза (МБТ) – восприимчивость микроорганизмов к содержанию в питательной среде лекарственных препаратов.

Лекарственная устойчивость (ЛУ) МБТ – устойчивость микроорганизмов к содержанию во внешней среде любого из лекарственных препаратов.

Монорезистентность – устойчивость МБТ только к одному противотуберкулезному препарату (ПТП).

Полирезистентность – устойчивость МБТ к двум и более ПТП, но не к сочетанию изониазида и рифампицина;

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – устойчивость МБТ к сочетанию изониазида и рифампицина независимо от наличия устойчивости к другим ПТП.

Широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) – сочетанная устойчивость МБТ к изониазиду, рифампицину, любому препарату из группы фторхинолонов и канамицину и/или амикацину и/или капреомицину, независимо от наличия устойчивости к другим ПТП.

Пациенты с высоким риском МЛУ-ТБ – впервые выявленные из контактов с МЛУ-ТБ, случаи повторного лечения.

M.tuberculosis complex (МБТК) – группа микроорганизмов внутри рода *Mycobacterium*, вызывающих специфические туберкулезные поражения органов и тканей.

Нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) – представители рода *Mycobacterium*, не входящие в группу МБТК; патогенные/условно-патогенные виды способны вызывать заболевания у человека (лепру, микобактериоз).

4. Обследуемые пациенты и диагностический материал, подвергаемый исследованию для диагностики туберкулеза

Диагностика пациентов с подозрением на туберкулез органов дыхания

Среди лиц, подлежащих обследованию на туберкулез (ТБ) или микобактериоз, в соответствии с действующим Порядком оказания медицинской помощи больным туберкулезом в Российской Федерации, обследованию с целью диагностики ТБ органов дыхания подлежат пациенты, имеющие кашель с мокротой, или другие пациенты, при наличии соответствующей клинико-рентгенологической картины и после консультации фтизиатра, в том числе выявленные при диспансеризации по изменениям в рентгено/флюорограммах.

Обследование пациентов с целью дифференциальной диагностики туберкулеза внелегочной локализации

Обследованию подлежат больные с длительными хроническими процессами, с выраженными клинико-лабораторными и рентгенологическими показаниями и рефракторные к неспецифической антибактериальной и/или другим методам терапии. В случае пациентов с ВИЧ инфекцией или иных случаев иммунодефицитных и иммуносупрессивных состояний, при проявлении симптомов заболеваний внелегочной локализации необходимо проведение исследований для исключения диагноза «туберкулез» или «микобактериоз».

Диагностический материал

При ТБ легких, наиболее распространенной и эпидемически опасной форме заболевания, доступным и часто исследуемым диагностическим материалом является мокрота. При подозрении на другие формы ТБ органов дыхания или при невозможности собрать мокроту у пациента с подозрением на ТБ легких, могут исследоваться и другие виды диагностических материалов (промывные воды бронхов, аспирационный материал, БАЛ, браш-биоптат, биоптат, экссудат и др.).

Исследования внелегочных диагностических материалов проводятся только с целью дифференциальной диагностики ТБ внелегочной локализации, при наличии показаний, по назначению фтизиатра и/или после консультации фтизиатра соответствующего профиля. Приоритетным является подтверждение/исключение наличия микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) в диагностическом материале методами с максимальной доступной чувствительностью и специфичностью. В связи с этим основными методами являются культуральные исследования на жидких и/или плотных средах и молекулярно-генетические методы (МГМ).

Приоритет исследования определяется лечащим врачом и зависит от клинической ситуации, информативности предыдущих исследований. Чтобы минимизировать вероятность расхождения в результатах, полученных разными методами, комплексное исследование должно проводиться из одной аликвоты клинического материала.

5. Микробиологическая и молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза

5.1. Современные методы и технологии микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза

Методы микроскопии

Диагностическая чувствительность метода микроскопии обычно составляет не более 50% от всех больных ТБ легких, однако если говорить о наиболее инфекционно-опасных больных (у которых бактериовыделение подтверждено культуральным методом), диагностическая чувствительность метода микроскопии в этом случае достигает 90%.

Методы микроскопии не позволяют дифференцировать МБТ от НТМБ и дают возможность выявлять кислотоустойчивые микроорганизмы (КУМ) только при наличии, по крайней мере, 5000-10000 бактериальных клеток в мл мокроты.

В настоящее время методы микроскопии, обладающие относительно невысокой чувствительностью, сохраняют, тем не менее, свою актуальность, так как позволяют быстро и с минимальными финансовыми затратами выявлять наиболее эпидемически значимых больных ТБ и оценивать массивность бактериовыделения.

Методы микроскопии в обязательном порядке включаются во все схемы обследования пациентов в связи с необходимостью определения статуса бактериовыделения согласно классификатору заболеваний и дальнейшему диспансерному наблюдению пациента или при необходимости его целевой госпитализации в специализированное отделение противотуберкулезных учреждений.

Современные методы микроскопии требуют обучения персонала.

| | |
|----------|---|
| В | Методы микроскопии настоятельно рекомендуется включать в алгоритм микробиологической диагностики ТБ |
|----------|---|

Микроскопия с окраской по Цилю-Нильсену

Световая микроскопия препаратов с окраской по Цилю-Нильсену (Ц-Н), приготовленных непосредственно из нативных образцов мокроты или других диагностических материалов, доступна для лабораторий всех уровней. В бактериологических лабораториях (БЛ) медицинских организаций фтизиатрического профиля субъекта РФ данный метод является актуальным при необходимости экстренного (в течение 1 часа) выявления больных ТБ и микобактериозом на первичном этапе обследования до госпитализации с целью определения статуса бактериовыделения.

Идентификация выросших микроорганизмов микроскопией с окраской по Цилю-Нильсену

При получении роста культуры микроорганизмов на плотной и/или жидкой питательных средах необходимо провести ее идентификацию, а также исключить наличие контаминации посторонней микрофлорой.

Метод окраски по Ц-Н может быть использован для идентификации выросших

микроорганизмов при отсутствии возможности использования современных молекулярных методов.

Методы люминесцентной микроскопии

В БЛ медицинских организаций фтизиатрического профиля субъекта РФ в качестве основного метода микроскопического исследования рекомендуется применять методы люминесцентной микроскопии, где в качестве источника излучения может использоваться ртутная лампа или светодиодный излучатель (LED).

Основное преимущество люминесцентной микроскопии перед микроскопией с окраской по Ц-Н состоит в экономии времени, затрачиваемого на просмотр препарата, за счёт использования меньших увеличений объектива и, соответственно, возможности просматривать большую площадь мазка в поле зрения.

Диагностическая чувствительность микроскопии с окраской люминесцентными красителями в среднем на 10% выше, чем микроскопии с окраской по Ц-Н, однако метод люминесцентной микроскопии требует значительной технической компетенции, а также более высоких капиталовложений и расходов.

Светодиодная (LED) микроскопия

LED технология позволяет сделать микроскопию более доступным анализом за счет более низкой стоимости как самих микроскопов, так и их сервисного обслуживания.

Оценка, проведенная ВОЗ, подтвердила диагностическую точность LED микроскопии по сравнению с традиционной люминесцентной микроскопией и большую эффективность LED по сравнению с микроскопией по Ц-Н. Поэтому можно рекомендовать заменять традиционную люминесцентную микроскопию LED микроскопией, которая в качестве альтернативы традиционной световой микроскопии по Ц-Н может применяться как в крупных, так и в небольших лабораториях.

В связи с тем, что светодиодные люминесцентные микроскопы не требуют высококвалифицированного технического обслуживания и имеют значительно больший срок службы ламп по сравнению с обычными моделями люминесцентных микроскопов, применение данного метода является оправданным с экономической точки зрения и позволяет широко распространить технологию люминесцентной микроскопии для диагностики ТБ.

| | |
|---|--|
| С | Метод светодиодной люминесцентной микроскопии (LED) может быть рекомендован к применению вместо традиционной микроскопии |
|---|--|

Культуральные методы

Культуральные методы диагностики (методы посева диагностического материала на питательные среды с последующей идентификацией выросших микроорганизмов) являются основными методами выделения МБТ. Их специфичность превышает специфичность микроскопических методов, а предел обнаружения значительно выше: он позволяет выявить микобактерии (МБ) при наличии в 1 мл исследуемого диагностического материала нескольких сотен и даже десятков жизнеспособных микроорганизмов.

При культивировании используют разные по составу питательные среды, дающие разные возможности роста МБТ. Культивирование МБ обеспечивает точную диагностику ТБ, значительно увеличивая число случаев выявления возбудителя и позволяя подтвердить

достоверность поставленного диагноза «туберкулез».

Диагностическая чувствительность культурального метода достигает 70-80% среди впервые выявленных больных ТБ легких.

С помощью культурального метода удастся выявить на 20-40% больше случаев ТБ с бактериовыделением по сравнению с методом микроскопии среди впервые выявленных больных. Культуральный метод позволяет выделить культуру возбудителя, необходимую для определения его видовой принадлежности и определения спектра и степени ЛУ.

Видовая идентификация выделенной культуры с помощью комплекса современных молекулярных методов позволяет сразу же дифференцировать МБТ от НТМБ и неспецифической микрофлоры.

Культуральные исследования являются достаточно трудоемкими и требуют значительных капиталовложений, наличия помещений и материально-технической базы для приготовления питательных сред, обработки образцов и культивирования микроорганизмов, специализированного лабораторного оборудования и надлежащих условий, обеспечивающих биологическую безопасность. Кроме того, культуральная диагностика требует специализированного обучения персонала.

Медленный рост МБТ требует значительного времени ожидания результатов исследования. В среднем, при посеве диагностического материала от впервые выявленных больных для получения результатов на плотных средах требуется 21-36 дней, на жидких средах - 12-22 дня.

Методы культивирования на жидкой и плотной питательных средах могут осуществляться в БЛ разных уровней.

Культивирование на плотных питательных средах

Метод культивирования МБ на плотных средах является менее дорогостоящим, чем в системах культивирования на жидких средах, но получение роста МБ на плотных средах занимает гораздо более длительное время (до получения отрицательного результата - 12 недель), чем культивирование МБ на жидких средах (42-46 дней). Процесс приготовления плотных питательных сред (ППС) проводится в каждой БЛ самостоятельно и сложно поддается стандартизации.

Однако указанный метод позволяет получить культуру МБ для проведения её дальнейших исследований и может быть рекомендован для использования в БЛ на всех этапах диагностики и контроля химиотерапии.

В

Метод культивирования на плотной питательной среде остаётся востребованным и рекомендуется к использованию в лабораторной практике для диагностики ТБ в комплексе с другими методами исследования

Культивирование на жидкой питательной среде в автоматизированной системе учета роста микроорганизмов

С 2006 г. международным сообществом были одобрены несколько новых тестов и диагностических подходов, включая использование жидких питательных сред с быстрой идентификацией в качестве стандартного эталона для подтверждения этиологии заболевания.

Культивирование на жидкой среде повышает выявление МБ примерно на 10% по сравнению с ППС. В настоящее время широко используются системы с автоматической детекцией учета роста МБ, которые позволяют значительно ускорить получение результата.

В БЛ медицинских организаций фтизиатрического профиля РФ преобладающей является автоматизированная система BASTEC MGIT 960/320.

Преимущества автоматизированной системы культивирования BASTEC MGIT 960/320 перед культуральными исследованиями на ППС обеспечиваются высокой эффективностью стандартизованных и сертифицированных по ISO9001 производств реагентов и сред, а также поддержанием стандартных протоколов исследований.

| | |
|----------|---|
| В | Посев на жидкие питательные среды настоятельно рекомендуется при диагностических исследованиях, для обследования впервые выявленных больных и повторных случаев лечения |
|----------|---|

Идентификация микобактерий

Идентификация микобактерий по культуральным свойствам

При посеве на ППС на основании скорости роста бактерий, морфологии и окраски колоний можно сделать предварительное заключение о принадлежности культуры либо к комплексу МБТ, либо к НТМБ.

Идентификация микобактерий с помощью биохимических тестов

Дифференциация МБТК и НТМБ основана на их культуральных свойствах и способности расти на дифференциально-диагностических средах. Наиболее часто применяемые: тест на наличие роста на среде, содержащей 1000 мкг/мл натрия салициловокислого; рост на среде, содержащей 2 мкг/мл гидразида тиофен-2 карбоксилловой кислоты (ТСН); рост на среде, содержащей 500 мкг/мл паранитробензойной кислоты; рост на среде, содержащей 5% хлорида натрия.

Для дифференциации МБ внутри рода применяют следующие основные биохимические исследования: тест на наличие способности продуцировать никотиновую кислоту (ниациновый тест); тест на наличие нитратредуктазной активности; тест на наличие термостабильной каталазы; тест на наличие пиразинамидазы и др. Эти исследования являются достаточно длительными, трудоемкими и требуют дополнительных капиталовложений, материально-технической базы, надлежащих условий, обеспечивающих биологическую безопасность. Эти методы требуют специализированного обучения персонала.

Для подтверждения наличия либо отсутствия контаминации при культивировании на жидкой/плотной питательной среде проводят посев культур на чашки Петри с кровавым агаром. Наличие роста культуры через 24-72 часа инкубации при +37°C свидетельствует о контаминации материала посторонней микрофлорой.

| | |
|----------|--|
| С | Микробиологические и биохимические методы идентификации МБ до вида обладают рядом ограничений, и в настоящее время рекомендуется заменить их на молекулярно-биологические методы идентификации |
|----------|--|

Методы определения лекарственной чувствительности МБТ

Для определения ЛЧ МБТ в качестве основных рекомендуется использовать фенотипические методы, т.е. культивирование МБТ в присутствии ПТП:

– модифицированный метод пропорций на жидкой питательной среде в системе с автоматизированным учетом роста микроорганизмов;

- метод абсолютных концентраций на ППС Левенштейна-Йенсена;
- нитратредуктазный метод абсолютных концентраций на ППС с использованием реактива Грисса.

На жидких питательных средах с использованием анализатора ВАСТЕС MGIT 960/320 проводят определение ЛЧ МБТ к ПТП первого ряда (изониазид, рифампицин, этамбутол, стрептомицин, пиразинамид) и к ПТП второго ряда (амикацин, канамицин, офлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, этионамид, протионамид, капреомицин, ПАСК, линезолид) (Приложение 1).

На ППС Левенштейна-Йенсена проводят определение ЛЧ МБТ методом абсолютных концентраций к ПТП первого ряда (изониазид, рифампицин, этамбутол, стрептомицин) и к ПТП второго ряда (канамицин, офлоксацин, этионамид, протионамид, капреомицин, циклосерин, ПАСК) (Приложение 1).

| | |
|----------|--|
| В | Критические концентрации ПТП для определения ЛЧ МБТ на жидких и плотных средах различаются |
|----------|--|

Определение лекарственной чувствительности НТМБ

Для определения ЛЧ НТМБ рекомендуется использовать метод на основе определения минимальных ингибирующих концентраций препаратов. Метод основан на культивировании выделенной культуры МБ в 96-луночной планшете в жидкой питательной среде, содержащей разные концентрации антибактериальных, в том числе и противотуберкулезных препаратов (Приложение 2).

Для медленнорастущих и быстрорастущих НТМБ ЛЧ определяется к разному спектру препаратов. Для быстрорастущих НТМБ такими препаратами являются триметоприм/сульфамтоксазол, цiproфлоксацин, моксифлоксацин, цефоксицин, амикацин, доксициклин, тайгециклин, кларитромицин, линезолид, имипенем, цефепим, амоксициллин/клавулоновая кислота, цефтриаксон, миноциклин, тобрамицин. Для медленнорастущих НТМБ – кларитромицин, цiproфлоксацин, стрептомицин, доксициклин, этионамид, рифабутин, этамбутол, изониазид, моксифлоксацин, рифампицин, триметоприм, амикацин, линезолид (Приложение 2).

| | |
|----------|--|
| В | Критические концентрации ПТП для определения ЛЧ НТМБ не разработаны и не утверждены ВОЗ. Для выбора препаратов для лечения микобактериоза проводят определение минимальных ингибирующих концентраций на жидких питательных средах в планшетном формате и соотносят их с фармакокинетикой препарата |
|----------|--|

Молекулярно-генетические методы

Длительность получения результатов культуральным методом исследования неблагоприятно сказывается на эффективности химиотерапии, особенно в связи с вероятностью неправильного выбора схемы химиотерапии при наличии ЛУ у возбудителя и расширением спектра устойчивости МБТ.

Основное преимущество молекулярных методов в том, что они являются «быстрыми» методами, позволяющими получить результаты в относительно короткий временной период. Заключение о наличии МБ в диагностическом материале делается на основании выявления

ДНК МБ, а вывод о ЛУ – на основании выявления мутаций в генах, ассоциированных с ЛУ.

Выявление ДНК МБТ

В настоящее время в РФ зарегистрировано большое количество тест-систем для выявления ДНК МБТ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Приложение 3), отличающихся способом детекции результатов. Предпочтительными являются тест-системы, исключающие кросс-контаминацию образцов, с детекцией результата в режиме реального времени. Получение положительного результата методом ПЦР позволяет в течение 1 рабочего дня установить наличие МБТ в диагностическом материале.

В

GeneXpert MTB/RIF рекомендован для экстренного выявления возбудителя ТБ с одновременной диагностикой его устойчивости к рифампицину

Однократное выявление ДНК возбудителя без подтверждения микроскопией или культуральными методами требует осторожной интерпретации положительного результата и согласования с клинико-anamnestическими данными.

Методы идентификации

Методы идентификации, основанные на ПЦР, имеют преимущество в специфичности и скорости анализа по сравнению с культуральными и биохимическими методами.

Молекулярные методы дифференциации МБТ от НТМБ основаны на выявлении видоспецифических структур в геноме или белковом спектре возбудителя. Ряд методов направлен только на то, чтобы дифференцировать МБТК от НТМБ, ряд – пригоден для точной видовой идентификации возбудителя.

К методам, дифференцирующим МБТК от НТМБ, относится ПЦР, выявляющая вставочную последовательность ДНК IS6110, присутствующую только у МБТК.

При обследовании больных с поствакцинальными осложнениями, включая костные поражения, ВИЧ-инфицированных и больных с иммуносупрессией, при подтверждении наличия ДНК и/или выделения культуры МБТ, необходимо исключить наличие *M.bovis* или *M.bovis* BCG в диагностическом материале. Для этого необходимо провести идентификацию возбудителя молекулярно-генетическими тест-системами (Приложение 3).

Иммунохроматографический метод (метод поддержан ВОЗ), основанный на определении наличия специфического антигена МБТ МРТ64, отличается простотой выполнения и обеспечивает идентификацию МБТ за 15 минут. Данный метод может быть рекомендован в качестве основного при проведении идентификации культур, выросших на жидких и/или плотных питательных средах, а также в контаминированных культуральных образцах (Приложение 3).

В

Иммунохроматографический тест на основе выявления белка МРТ-64 рекомендован в качестве основного при проведении идентификации культур, выросших на жидкой и/или плотных питательных средах

Методики, обеспечивающие точную видовую идентификацию НТМБ, более трудоемки и требуют больших материальных затрат. К ним относится гибридизационные технологии на нейлоновых мембранах (ДНК-стрипы), позволяющие идентифицировать следующие виды НТМБ: *M.avium* ssp., *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare*,

M.scrofulaceum, *M.interjectum*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.peregrinum*, *M.marinum*, *M.ulcerans*, *M.xenopi* и *M.simiae*, *M.mucogenicum*, *M.goodii*, *M.celatum*, *M.smegmatis*, *M.genavense*, *M.lentiflavum*, *M.heckeshornense*, *M.szulgai*, *M.intermedium*, *M.phlei*, *M.haemophilum*, *M.kansasii*, *M.ulcerans*, *M.gastri*, *M.asiaticum* и *M.shimoidei*. Этим методом можно исследовать культуры с плотной и жидкой питательных сред и получить результат в течение 1-2 дней.

Идентификация МБ до вида может проводиться также с помощью секвенирования, MALDI-ToF масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), тонкослойной хроматографии, результаты которых основаны на выявлении уникальных для каждого вида МБ структур.

В

Методики точной видовой идентификации НТМБ могут быть рекомендованы для хорошо оснащенных БЛ с подготовленным персоналом

Молекулярно-генетические методы определения ЛУ

Генотипические методы определения ЛУ МБТ основаны на выявлении специфических мутаций, связанных с резистентностью к определенным ПТП.

Основным достоинством МГМ является быстрое и достоверное выявление больных МЛУ-ТБ, так как они позволяют выявить ЛУ МБТ к рифампицину и изониазиду, а также к важнейшим препаратам второго ряда, позволяя использовать разделение потоков больных и включать в режим лечения наиболее эффективные препараты.

Использование МГМ для определения ЛУ является первоначальным этапом обследования больных и не исключает необходимость применения традиционных культуральных методов определения ЛЧ возбудителя, т.к. молекулярно-генетические тест-системы определения ЛУ в настоящее время разработаны не для всех ПТП и диагностическая чувствительность их в некоторых случаях недостаточная для назначения корректного режима лечения.

Молекулярно-генетические тест-системы на определение ЛУ представлены тремя основными технологиями:

- 1) гибридизационные технологии, основанные на гибридизации продуктов ПЦР со специфическими олигонуклеотидами, иммобилизованными на матрице, которая может представлять собой биологический микрочип, или ДНК-стрип (Приложение 3);
- 2) мультиплексная ПЦР в режиме реального времени (Приложение 3);
- 3) «картриджная» технология (выделение ДНК и амплификация идут автоматически в специальном картридже) (Приложение 3).

Гибридизационные технологии

Гибридизационные технологии позволяют в культуре с плотной или жидкой среды или непосредственно в мокроте, положительной по результатам микроскопического исследования, в течение 1-2 дней выявлять наиболее распространенные мутации в генах МБТ, связанных с устойчивостью к основным ПТП первого ряда - изониазиду и рифампицину и некоторым ПТП второго ряда (в зависимости от тест-системы).

Данная группа методов основана на том, что амплифицированные в результате ПЦР целевые последовательности гибридизуются с зондами, нанесенными на соответствующую матрицу. По результатам гибридизации делается вывод о наличии мутаций, приводящих к устойчивости к ПТП.

Биологические микрочипы

В настоящее время на территории РФ зарегистрированы две отечественные тест-системы, использующие микрочиповую технологию: «ТБ-Биочип», которая позволяет определять ЛУ к рифампицину и изониазиду (гены *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*) с чувствительностью метода более 95% при установлении устойчивости к рифампицину, и более 85% - к изониазиду, специфичность 95%) и «ТБ-Биочип-2», позволяющая определять устойчивость к фторхинолонам с чувствительностью не менее 85% (ген *gyrA*).

Использование микрочиповой технологии позволяет определять точный тип мутаций, приводящих к устойчивости возбудителя ТБ к перечисленным ПТП.

Особенностью этой технологии является наличие этапа "вложенной" ПЦР, позволяющей нарабатывать необходимое количество целевых последовательностей в предварительно амплифицированном участке гена, с последующей гибридизацией продуктов амплификации с иммобилизованными на матрице специфическими зондами, позволяющими выявлять наличие наиболее распространенных мутаций, приводящих к устойчивости к ПТП. Поскольку метод вложенной ПЦР повышает риск контаминации образцов, при использовании гибридизационных молекулярно-генетических тест-систем для определения ЛУ МБТ предъявляются высокие требования к зонированию помещений и к квалификации персонала.

Получение и анализ изображения гибридизационной картины производится специальным аппаратно-программным комплексом, который анализирует свечение ячеек биочипа и выдает отчет о наличии мутаций и устойчивости возбудителя, его видовой идентификации (Приложение 3).

ДНК-стрипы

Метод позволяет определять ЛУ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, этамбутолу, аминогликозидам/циклическим пептидам (Приложение 3).

Этот тест представляется в настоящее время наиболее приемлемым для мониторинга штаммов с устойчивостью к основным препаратам второго ряда, в том числе и ШЛУ-ТБ, поскольку этот набор предоставляет возможность тестирования ЛУ к наибольшему числу ПТП, а сам метод является менее трудоемким по сравнению с методом биочипов.

Метод основан на множественной обратной гибридизации на ДНК-стрипах и лежит в основе тест-системы GenoType MTBDRplus, применяемой для определения ЛЧ к изониазиду и рифампицину, и тест-системы GenoType MTBDRsl для определения ЛУ к фторхинолонам, аминогликозидам/циклическим пептидам и этамбутолу.

После одноэтапной амплификации со специфическими праймерами продукты ПЦР гибридизуются с олигонуклеотидами, иммобилизованными на стрипах. Гибридизация ампликонов проходит в открытых ванночках, что увеличивает риск контаминации.

Результат гибридизации визуализируется на нейлоновой мембране - стрипе в виде набора полос, которые вручную или с помощью прибора сравнивают с шаблоном и определяют наличие мутаций, ассоциированных с ЛУ.

Чувствительность и специфичность набора GenoType MTBDRplus, по данным метаанализа публикаций группы экспертов ВОЗ, высокие и составляют 98,1% и 98,7% для рифампицина и 84,3% и 99,5% для изониазида, соответственно.

Специфичность набора GenoType MTBDRsl, по данным метаанализа публикаций группы экспертов ВОЗ, для ПТП 2 ряда превышает 95%, а чувствительность при определении устойчивости к фторхинолонам составляет 83,5%, а для канамицина, амикацина и капреомицина - около 95%. При определении устойчивости к этамбутолу была показана более низкая чувствительность и специфичность - 56% и 81%, соответственно.

| | |
|----------|--|
| С | Метод рекомендуется для исследования культур МБТ и образцов диагностического материала с положительными результатами микроскопии |
|----------|--|

Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени

Метод ПЦР в режиме реального времени позволяет определять мутации, ассоциированные с ЛУ к рифампицину, изониазиду (АМПЛИТУБ-МЛУ-РВ).

Преимуществом данного метода перед описанными выше технологиями является отсутствие этапа гибридизации и оценка результатов в режиме реального времени, что позволяет снизить возможность контаминации. Использование зарегистрированных наборов позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью (94% и 99%, соответственно) выявлять мутации в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, ассоциирующиеся с устойчивостью к рифампицину и изониазиду (Приложение 3).

| | |
|----------|---|
| Д | ПЦР в режиме реального времени является наиболее перспективным методом, т.к. в течение одного дня позволяет детектировать устойчивость МБТ к рифампицину и изониазиду из диагностического материала |
|----------|---|

Картриджная технология GeneXpert MTB/RIF

Использование этой системы позволяет непосредственно из нативной мокроты в очень короткие сроки (в течение 2,5 часов) одновременно проводить выявление ДНК МБТ и с высокой достоверностью определять устойчивость МБТ к рифампицину.

Указанный метод обладает не только хорошими диагностическими характеристиками, позволяя получить своевременные и достоверные данные для клинического и эпидемиологического использования, к его достоинствам можно также отнести простоту проведения исследования и отсутствие строгих требований к зонированию рабочих помещений.

ВОЗ рекомендует использовать данный тест для быстрой диагностики МЛУ-ТБ, особенно в странах с высоким бременем ТБ и распространением ВИЧ-инфекции.

| | |
|----------|--|
| В | GeneXpert MTB/RIF может использоваться не только в лабораториях учреждений фтизиатрического профиля, но и в лабораториях учреждений первичной медико-санитарной помощи |
|----------|--|

5.2. Этапы микробиологического и молекулярно-генетического обследования

Для получения достоверных и информативных результатов наличия МБТ в диагностическом материале и данных ЛЧ возбудителя необходимо проводить комплексные лабораторные исследования.

Этапы микробиологического и молекулярно-генетического обследования с целью диагностики и контроля химиотерапии туберкулеза:

1. Выявление возбудителя ТБ в диагностическом материале, собранном до начала химиотерапии:

Используют все доступные методы, обеспечивающие возможно быстрое получение

результатов с наибольшей достоверностью:

- люминесцентная/LED-микроскопия,
- молекулярно-генетические методы,
- культуральные исследования с посевом на жидкие и/или плотные питательные среды.

По результатам экспресс-исследований определяют статус больного, форму помощи и направляют его в соответствующее отделение.

2. Скрининг лекарственной чувствительности МБТ – максимально быстрое выявление генетических маркеров устойчивости к препаратам, определяющим стартовые режимы лечения (рифампицин, изониазид, фторхинолоны и др. ПТП) для назначения адекватного режима лечения и перевода пациента в соответствующее отделение.

3. Полная характеристика выделенной культуры для подтверждения результатов скрининговых исследований и обоснования назначения индивидуализированной схемы лечения согласно ЛЧ возбудителя.

На данном этапе используют один или несколько из общепринятых культуральных методов определения ЛЧ МБТ (в зависимости от спектра и характера устойчивости), а также проводят дифференциацию и более полную идентификацию выделенных культур иммунохроматографическими, молекулярно-генетическими, биохимическими и другими методами.

4. Исследования, проводимые с целью обоснования и контроля химиотерапии.

Обследование до начала лечения

Выявление и идентификация возбудителя, скрининг ЛУ

Для выявления возбудителя туберкулеза рекомендуется проводить анализ двух образцов диагностического материала, собранных до начала лечения, по следующей схеме:

1-й образец (все исследования проводятся из одной и той же пробы):

- люминесцентная/LED микроскопия из осадка,
- посев на 1 пробирку с жидкой питательной средой (для культивирования в системе с автоматизированным учетом роста микроорганизмов) и параллельно на 1 пробирку с плотной питательной средой,
- ПЦР-исследование для обнаружения ДНК МБТ/ДНК МБТ с определением ЛУ к рифампицину.

2-й образец (все исследования проводятся из одной и той же пробы):

- люминесцентная/LED микроскопия из осадка,
- посев на 1 пробирку с жидкой средой и на 1 пробирку с плотной средой либо (при ограниченных ресурсах) посев на 2 пробирки с разными по составу плотными питательными средами
- ПЦР-исследование для обнаружения ДНК МБТ (при ограниченных ресурсах рекомендуется проводить по показаниям, в случае, если первый результат тестирования методом ПЦР был отрицательным).

При ограниченных ресурсах допускается исследовать 2-й образец только методом

микроскопии.

Для обнаружения ДНК МБТ предпочтительно использовать метод ПЦР в режиме реального времени.

На этапе выявления МБТ, в случае получения методом ПЦР положительного результата на ДНК МБТ, выделенный из диагностического материала образец ДНК рекомендуется сразу же направить на тестирование ЛУ к ПТП первого ряда одним из молекулярно-генетических методов. При получении положительного результата на устойчивость, образец ДНК направляется на исследование к ПТП второго ряда.

В случае недостаточного содержания ДНК МБТ в диагностическом материале и невозможности получения результата ЛУ МБТ из диагностического материала, рекомендуется провести молекулярно-генетическое исследование ЛУ МБТ для соответствующей культуры, выделенной из этого материала при посеве его на жидкую или плотную питательные среды.

С

Перед началом лечения рекомендуется назначить молекулярно-генетические методы диагностики ЛУ МБТ к изониазиду и рифампицину или только к рифампицину, а при выявлении МЛУ – к фторхинолонам

При выделении культуры микобактерий проводят:

- дифференциацию МБТ от НТМБ,
- определение ЛЧ выделенной культуры.

Для дифференциации МБТ от НТМБ рекомендуется использовать, в первую очередь, микроскопию культуры с окраской по Ц-Н, при получении культуры на плотной среде – проводить учет культуральных особенностей (скорость роста, пигментообразование), а также использовать иммунохроматографический тест. Кроме того, могут быть использованы методы: ПЦР на наличие ДНК МБТ, ПЦР на ДНК НТМБ, ДНК-стриповая технология, другие доступные методы.

При культивировании на жидкой/плотной питательной среде проводится тестирование на контаминацию неспецифической микрофлорой (посев на кровяной агар) перед направлением культуры МБТ на определение ЛЧ.

Определение лекарственной чувствительности фенотипическими методами

С целью подтверждения/валидации результатов скрининговых исследований и обоснования назначения индивидуализированной схемы лечения в соответствии с лекарственной чувствительностью возбудителя, используют культуральные методы определения ЛЧ МБТ.

С

При выделении культуры, выросшей из диагностического материала, собранного до начала лечения, необходимо провести определение ЛЧ МБТ на жидкой и/или плотных питательных средах к максимально широкому спектру ПТП

С

Определение лекарственной чувствительности МБТ к изониазиду, рифампицину, этамбутолу, амикацину или канамицину, офлоксацину настоятельно рекомендуется

Определение ЛЧ МБТ к стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу, офлоксацину, этионамиду, протионамиду, капреомицину, канамицину и ПАСК может быть проведено либо на жидкой (метод ВАСТЕС MGIT 960/320), либо на плотной (метод абсолютных концентраций) питательных средах. Дублирование исследований (к одному и тому же препарату на разных средах одновременно) не рекомендуется.

ЛЧ МБТ к пиразинамиду, амикацину, левофлоксацину, моксифлоксацину, линезолиду рекомендуется определять на жидких питательных средах.

ЛЧ МБТ к циклосерину можно определять только на ППС.

В регионах РФ с широким распространением случаев МЛУ-ТБ и ШЛУ-ТБ рекомендуется, по-возможности (при наличии положительного результата на устойчивость, полученного с помощью МГМ), не ожидая получения результатов определения ЛЧ МБТ микробиологическими методами к ПТП первого ряда, сразу же осуществлять тестирование ЛЧ МБТ одновременно к ПТП первого и второго рядов, чтобы в максимально короткие сроки получить данные по всему спектру устойчивости возбудителя.

Обследование с целью контроля лечения

Обследование для контроля химиотерапии включает в себя двукратное исследование диагностического материала в течение 3-5-и рабочих дней:

1-й образец (все исследования проводятся из одной и той же пробы):

- люминесцентная/LED микроскопия из осадка,
- посев на 2 (или 1) пробирки с плотными питательными средами либо (при наличии показаний) на 1 пробирку с жидкой и 1 пробирку с плотной питательными средами.

2-й образец (все исследования проводятся из одной и той же пробы):

- люминесцентная/LED микроскопия из осадка,
- посев на 2 (или 1) пробирки с плотными питательными средами.

Кратность и периодичность обследования пациента определяется назначенным режимом лечения и его длительностью, а также необходимостью контрольного обследования для показаний к выписке из стационара.

При сохраняющемся бактериовыделении или появлении бактериовыделения, обнаруженного методом микроскопии, в конце интенсивной фазы или в фазе продолжения лечения следует провести посев на жидкие питательные среды и исследование ЛЧ МБТ на жидких/плотных питательных средах к максимально широкому спектру ПТП.

В случае возможности определения маркеров ЛУ молекулярно-генетическими методами их следует дополнительно использовать для оценки риска развития ЛУ.

Рекомендуемая частота обследований в процессе лечения:

При химиотерапии по I, II и III стандартным режимам микроскопическое исследование и посев на плотные/жидкие среды из двух образцов диагностического материала проводят со 2-го месяца лечения, затем не реже 1 раза в месяц, не менее чем из 2-х образцов.

При химиотерапии по IV режиму микроскопическое исследование и посев на плотные/жидкие среды из двух образцов диагностического материала проводят по исходу 2-го месяца, далее – ежемесячно до получения отрицательных результатов посевов в течение 2-х

последовательных месяцев, в фазе продолжения те же исследования проводят каждые 3 месяца, и по завершению лечения – не менее чем из 2-х образцов, после завершения химиотерапии – каждые полгода в течение 3 лет.

При химиотерапии по V режиму микроскопическое исследование и посев на плотные/жидкие среды из двух образцов диагностического материала проводят по исходу 3-го, далее ежемесячно до получения отрицательных результатов посевов в течение 4-х последовательных месяцев, в фазе продолжения те же исследования проводят каждые 3 месяца, и по завершению лечения – не менее, чем из 2-х образцов, после завершения химиотерапии – каждые полгода в течение 3 лет.

В интенсивной фазе химиотерапии определение ЛЧ МБТ проводят после 2-го месяца лечения ежемесячно при лечении по I, II и III режимам, после 2-го, 4-го и 6-го месяцев – при лечении по IV и после 3-го и 6-го месяцев – по V режиму. В фазе продолжения лечения определение ЛЧ МБТ проводят при обнаружении МБТ любым методом с использованием ускоренных тестов на ЛЧ. При химиотерапии по II, IV и V режимам повторные определения ЛЧ проводят только к тем ПТП, к которым МБТ ранее были чувствительны.

При наличии у больного признаков неэффективной химиотерапии и сохранении бактериовыделения по окончании интенсивной фазы химиотерапии, рекомендуется, помимо исследований, проводимых традиционными методами (микроскопия и посев на плотные среды), выполнить повторные культуральные исследования на жидких средах с тестированием ЛЧ ко всем ПТП, а также использовать МГМ для быстрого определения ЛУ МБТ с целью своевременной коррекции химиотерапии в случае формирования приобретенной ЛУ.

Краткий стандарт обследования пациентов, состоящих на диспансерном учете, микробиологическими и молекулярно-генетическими методами представлен в таблице 1.

Таблица 1

Краткий стандарт обследования пациентов, состоящих на диспансерном учете, микробиологическими и молекулярно-генетическими методами исследования

| ГДУ | Этап наблюдения / лечения | Методы исследования, кратность | | | | | | |
|----------------------|---|---------------------------------|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------|-----------------------------|------------------------------|
| | | Люм/ LED микро- скопия | МГМ | | ВАСТЕС MGIT | | Плотные среды | |
| | | | ДНК МБТ | Наличие мутаций | Посев (на 1 пробирку MGIT) | ТЛЧ | Посев (на 1 или 2 пробирки) | ТЛЧ (если нет данных ВАСТЕС) |
| 0 | Перед постановкой на учет (далее ежемесячно) | из 2-х образцов | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при ДНК МБТ+ | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |
| I-A I-B II-A | До лечения | из 2-х образцов | из 1 или 2-х образцов (кр.IIA) | 1-кр. при ДНК МБТ+ | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |
| | Интенсивная фаза х/т (частота обследования – в зависимости от режима х/т) | из 2-х образцов | из 1 образца при наличии показаний | 1-кр. при ДНК МБТ+ | из 1 образца при наличии показаний | 1-кр. при МБТ+ | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |
| | Фаза продолжения х/т (частота обследования – в зависимости от режима х/т) | из 2-х образцов | из 1 образца при наличии показаний | 1-кр. при ДНК МБТ+ | из 1 образца при наличии показаний | 1-кр. при МБТ+ | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |
| | Завершение курса лечения | из 2-х образцов | - | - | - | - | из 2-х образцов | - |
| II-B | по показаниям, но не реже 1 раза в шесть месяцев | из 2-х образцов | - | - | - | - | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |
| III | Перед зачислением в группу, в дальнейшем – не реже 1 раза в 6 мес. | из 2-х образцов | - | - | - | - | из 2-х образцов | - |
| IV-A IV-B IV-B | Перед зачислением в группу, в дальнейшем – не реже 1 раза в 6 мес. | из 2-х образцов | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при ДНК МБТ+ | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |
| V-A V-B V-B | Перед зачислением в группу, в дальнейшем – по показаниям | из 2-х образцов | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при ДНК МБТ+ | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |
| VI-A VI-B | Перед зачислением в группу, в дальнейшем – по показаниям | из 2-х образцов | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при ДНК МБТ+ | из 1 или 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ | из 2-х образцов | 1-кр. при МБТ+ |

Приложение 1.

Методы определения лекарственной чувствительности и критические концентрации противотуберкулезных препаратов

| Группа препаратов ¹ | Противотуберкулезный препарат | Среда, используемая для определения ЛЧ | Критические концентрации (мкг/мл) для определения ЛЧ в зависимости от используемого метода и питательной среды | | |
|--|------------------------------------|--|--|--|--|
| | | | Среда Левенштейна-Йенсена (метод абсолютных концентраций) ² | Среда Левенштейна-Йенсена (метод пропорций) ³ | Система ВАСТЕС MGIT 960/320 ³ |
| Группа 1 (пероральные противотуберкулезные препараты первой линии) | изониазид | плотная, жидкая | 1 | 0,2 | 0,1 |
| | рифампицин | плотная, жидкая | 40 | 40,0 | 1,0 |
| | этамбутол | плотная, жидкая | 2 | 2,0 | 5,0 |
| | пиразинамид | жидкая | -- | -- | 100,0 |
| Группа 2 (инъекционные противотуберкулезные препараты) | стрептомицин | плотная, жидкая | 10 | 4,0 | 1,0 |
| | канамицин | плотная, жидкая | 30 | 30,0 | 2,5 ⁴ |
| | амикацин | плотная, жидкая | -- | 30,0 ⁴ | 1,0 |
| | капреомицин | плотная, жидкая | 30 | 40,0 | 2,5 |
| Группа 3 (фторхинолоны) | офлоксацин | плотная, жидкая | 2 | 4,0 ⁴ | 2,0 |
| | левофлоксацин | плотная, жидкая | -- | -- | 1,5 ⁴ |
| | моксифлоксацин | плотная, жидкая | -- | -- | 0,5/2,0 ⁴ |
| Группа 4 (пероральные бактериостатические противотуберкулезные препараты второго ряда) | этионамид | плотная, жидкая | 30 | 40,0 | 5,0 |
| | протионамид | плотная, жидкая | 30 | 40,0 | 2,5 |
| | циклосерин | плотная | 30 | 30,0 ⁴ | -- |
| | <i>P</i> -аминосалициловая кислота | плотная, жидкая | 1 | 1,0 | 4,0 ⁴ |
| Группа 5 (противотуберкулезные препараты с неясной эффективностью, не рекомендованные ВОЗ для рутинного использования при лечении больных с МЛУ-ТБ) | клоfazимин | жидкая | -- | -- | -- |
| | амоксциллин/ клавуланат | отсутствует | -- | -- | -- |
| | кларитромицин | отсутствует | -- | -- | -- |
| | линезолид | жидкая | -- | -- | 1,0 |

- ¹ World Health Organization. *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*. Geneva, WHO, 2008 (WHO/HTM/TB/2008.402) – Руководство ВОЗ по программному ведению лекарственно-устойчивого туберкулеза.
- ² Приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
- ³ World Health Organization. *Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs*. Geneva, WHO, 2008 (WHO/HTM/TB/2008.392) – Рекомендации ВОЗ для определения ЛЧ к ПТП 2-го ряда. (Рекомендуется использование непрямого метода пропорций, так как другие методы с использованием плотных питательных сред (метод отношений устойчивости, метод абсолютных концентраций) не достаточно валидированы для препаратов второго ряда).
- ⁴ Salman H. Siddiqi. *Guidelines for Second-line Drug Susceptibility Testing in MGIT Based on Published Studies. Critical Concentrations and Procedures* – Рекомендации по тестированию чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием MGIT, основанные на опубликованных результатах исследований. Критические концентрации и процедуры. – 2014. – 28 с.

Приложение 2

Препараты и их концентрации (мкг/мл) для определения лекарственной чувствительности нетуберкулезных микобактерий

| Препарат | Для медленно растущих микобактерий | Для быстро растущих микобактерий, нокардий и др. аэробных актиномицетов |
|---------------------------------------|--|---|
| | Концентрации (мкг/мл) для определения ЛЧ | |
| Амикацин | 1-64 | 1-64 |
| Амоксициллин/Клавулановая кислота 2:1 | н/п | 2/1-64/32 |
| Цефепим | н/п | 1-32 |
| Цефокситин | н/п | 4-128 |
| Цефтриаксон | н/п | 4-64 |
| Ципрофлоксацин | 0.12-16 | 0.12-4 |
| Кларитромицин | 0.06-64 | 0.06-16 |
| Доксициклин | 0.12-16 | 0.12-16 |
| Этамбутол | 0.5-16 | н/п |
| Этионамид | 0.3-20 | н/п |
| Имипенем | н/п | 2-64 |
| Изониазид | 0.25-8 | н/п |
| Канамицин | н/п | н/п |
| Линезолид | 1-64 | 1-32 |
| Миноциклин | н/п | 1-8 |
| Моксифлоксацин | 0.12-8 | 0.25-8 |
| Рифабутин | 0.25-8 | н/п |
| Рифампицин | 0.12-8 | н/п |
| Стрептомицин | 0.5-64 | н/п |
| Тайгециклин | н/п | 0.015-4 |
| Тобрамицин | н/п | 1-16 |
| Триметоприм/сульфаметоксазол | 0.12/2.38-8/152 | 0.25/4.75-8/152 |

н/п – не проводится

Приложение 3.**Зарегистрированные в Российской Федерации наборы реагентов для диагностики туберкулеза и микобактериоза микробиологическими и молекулярно-генетическими методами**

1. Наборы реагентов для определения роста и чувствительности микобактерий на жидкой питательной среде в системе автоматического учета роста ВАСТЕС MGIT 960/320 (Производство BD «Бектон Дикинсон энд Компании» США). Регистрационное удостоверение ФСЗ 2009/04404 от 27/05/2009.
2. Набор реагентов SD BIOLINE Туберкулез Антиген МРТ64 Регистрационное удостоверение ФСЗ (производство SD, Корея). Регистрационное удостоверение №2009/05702 от 09.12.2009.
3. Набор реагентов идентификационный тест «BD MGIT ТВс» для диагностики туберкулеза BD MGIT™ ТВс ID Test Device (Производство BD «Бектон Дикинсон энд Компании» США). Регистрационное удостоверение ФСЗ 2010/06481 от 21.04.2011.
4. Панель RAPMICO для быстрорастущих микобактерий, нокардий и других аэробных актиномицетов; (Производство TREK Diagnostic Systems, Magellan Biosciences Sensititre, Англия) Регистрационное удостоверение ФСЗ 2008/02636 от 17/09/2008.
5. Панель SLOWMYCO, MIC для медленно растущих микобактерий. (Производство TREK Diagnostic Systems, Magellan Biosciences Sensititre, Англия). Регистрационное удостоверение ФСЗ 2008/02636 от 17/09/2008.
6. Комплект реагентов «Проба-Рapid» Комплект реагентов для выделения ДНК Компания «ДНК-технология» Россия. Регистрационное удостоверение ФСР 2008/02939.
7. Комплект реагентов «ПРОБА-НК»/«ПРОБА-НК-ПЛЮС» Комплект реагентов для выделения РНК и ДНК (Компания «ДНК-технология» Россия.) Регистрационное удостоверение ФСР № 2010/08857.
8. Комплект реагентов для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis* – *Mycobacterium bovis* complex) (Компания «ДНК-технология» Россия). Регистрационное удостоверение ФСР № 2008/03849.
9. Комплект реагентов для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) (Компания «ДНК-технология» Россия). Регистрационное удостоверение ФСР № 2008/03849.
10. Комплект реагентов для обнаружения *M.tuberculosis* (с целью дифференцировки от *M.bovis*) (Компания «ДНК-технология» Россия.) Регистрационное удостоверение ФСР 2008/03849.

11. Комплект реагентов М-СОРБ-ТУБ Специально адаптированный набор для выделения ДНК из клинического материала. (НПК СИНТОЛ, Россия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07635.
12. Комплект реагентов АМПЛИТУБ-РВ Набор реагентов для обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса. (НПК СИНТОЛ, Россия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07635.
13. Комплект реагентов АМПЛИТУБ-МЛУ-РВ Набор реагентов для быстрого определения антибиотикоустойчивости микобактерий туберкулезного комплекса. (НПК СИНТОЛ, Россия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07636
14. АМПЛИТУБ-ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ Набор реагентов для дифференциальной диагностики видов микобактерий, входящих в *M.tuberculosis* complex (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* BCG и др. виды). (НПК СИНТОЛ, Россия).
15. Комплект реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала "РИБО-преп". ООО («ИнтерЛабСервис», Россия). Регистрационное удостоверение: № ФСР 2008/03147.
16. Набор реагентов для обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis* complex) в клиническом материале, культурах микроорганизмов и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией АмплиСенс® («ИнтерЛабСервис», Россия).
17. Набор реагентов для выявления ДНК *Mycobacterium tuberculosis* complex в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агарозном геле "АмплиСенс® МБТ-EPH". («ИнтерЛабСервис», Россия). Регистрационное удостоверение: № ФС 01262006/4776.
18. Набор реагентов РеалБест ДНК МВТС для выявления ДНК микобактерий туберкулёзного комплекса методом ПЦР в режиме реального времени. (ВекторБест, Россия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2012/13150.
19. Набор реагентов для определения лекарственной чувствительности к рифампицину, изониазиду «ТБ-БИОЧИП-МДР» (ТБ-БИОЧИП, Россия). Регистрационное удостоверение № ФС 03262004/0889-04 и
20. Набор реагентов для определения лекарственной чувствительности к офлоксацину «ТБ-БИОЧИП-2» (ТБ-БИОЧИП, Россия). Регистрационное удостоверение №ФС 01012006/3257-06.
21. Наборы реагентов для дифференциация видов внутри комплекса *M.tuberculosis*: *M.tuberculosis/M.canetti*, *M.africanum*, *M.bovis* BCG, *M.bovis* ssp *bovis*, *M.bovis* ssp. *caprae*, *M.microti*. HAIN-GenoTypeDRMTBC (Hain Lifescience, Германия) Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02292 от 15/07/2008.

22. Наборы реагентов для определения лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду (1-й ряд) HAIN-GenoTypeDRplus (Hain Lifescience, Германия) Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02292 от 15/07/2008.
23. Наборы реагентов для определения лекарственной чувствительности к фторхинолонам, аминогликозидам и/или циклическим пептидам и этамбутолу (2-й ряд) HAIN-GenoTypeDRsl (Hain Lifescience, Германия) Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/09233 от 09/03/2011.
24. GenoType® Mycobacteria Direct. Определение комплекса микобактерий туберкулеза (*M.tuberculosis* complex) и четырех клинически значимых видов микобактерий (Hain Lifescience, Германия) Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/09232 от 09/03/2011.
25. Наборы реагентов для выявления *M.tuberculosis* complex из диагностического материала и определения лекарственной чувствительности к рифампицину Хpert МТВ/RIF (экспресс случаи) картридж Хpert МТВ/RIF (Cepheid, США). Регистрационное удостоверение ФСЗ 2009/05723 от 28/06/2012.
26. Наборы реагентов для идентификации микобактерий HAIN-GenoTypeCM - 14 видов *M.avium* ssp., *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.peregrinum*, *M.marinum*/*M.ulcerans*, *M.xenopi*, *M.tuberculosis* complex. (Hain Lifescience, Германия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02294 от 15/07/2008.
27. Наборы реагентов для идентификации микобактерий HAIN-GenoTypeAS - 17 видов *M.simiae*, *M.mucogenicum*, *M.goodii*, *M.celatum*, *M.smegmatis*, *M.genavense*, *M.lentiflavum*, *M.heckeshornense*, *M.szulgai*, *M.intermedium*, *M.phlei*, *M.haemophilum*, *M.kansasii*, *M.ulcerans*, *M.gastri*, *M.asiaticum*, *M.shimoidei* (Hain Lifescience, Германия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02296 от 15/07/2008.
28. Наборы реагентов для идентификации микобактерий HAIN-GenoType МТВС - микобактерий внутри туберкулезного комплекса *M.tuberculosis* complex - *M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.bovis*, *M.microti*, *M.canettii* (Hain Lifescience, Германия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/02297 от 15/07/2008.