

УДК 616.24-002.5-08

Клинические рекомендации по этиологической диагностике туберкулеза

Рабочая группа Национальной ассоциации фтизиатров

Группа разработчиков: С.Н. Скорняков¹ (председатель), М.В. Шульгина² (координатор), Б.М. Ариэль², Г.С. Баласанянц², Д. В.Вахрушева¹, А.В. Владимиров³, В.Б. Галкин², Л.М. Гринберг¹, В.Ю. Журавлев², М.А. Кравченко¹, С.Ю. Красноборова¹, А.В. Мордык⁴, Т.И. Петренко⁵

¹ Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Екатеринбург;

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии;

³ Ханты-Мансийский клинический противотуберкулезный диспансер;

⁴ Омская государственная медицинская академия;

⁵ Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза

Clinical recommendations on tuberculosis etiology diagnosis

Working Group of the National Association of Phthisiatricians

1. Цели и задачи внедрения клинических рекомендаций

Целью создания клинических рекомендаций по этиологической диагностике туберкулеза и их внедрения является стандартизация подходов к этиологическому подтверждению заболевания, внедрение единой методологической базы в России и обеспечение равной доступности современной эффективной диагностики туберкулеза для всех граждан России.

2. Введение

2.1. Концепция этиологической диагностики

Сегодня наиболее значимыми характеристиками заболеваемости туберкулезом в России, не только определяющими развитие эпидемического процесса на ближайшие десятилетия, но и представляющими явную угрозу национальной безопасности страны, являются высокие и продолжающие расти уровень распространенности множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) и число случаев туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией. По статистическим данным

2013 г. (форма статистического учета 33), доля впервые выявленных больных с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в среднем по Российской Федерации превышает 20%. Это означает, что каждый пятый больной туберкулезом не может быть излечен при применении стандартного первого (наиболее эффективного для лечения больных с лекарственно чувствительными возбудителями) режима химиотерапии, и ему требуется режим, основанный на использовании препаратов резервного ряда. У больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, доля случаев с микобактериями туберкулеза с МЛУ (МЛУ МБТ) выше. Кроме того, быстрое прогрессирование заболевания в таких случаях требует выбора эффективной химиотерапии в кратчайшие сроки. У таких больных возрастает вероятность развития заболевания, вызванного нетуберкулезными микобактериями, что повышает значимость этиологического подтверждения диагноза. Все это обуславливает необходимость получения данных лабораторных этиологических исследований в кратчайшие возможные сроки и с наибольшей достоверностью [1, 2]. Назначение курса химиотерапии эмпирически в существующих эпидемических условиях с

высокой вероятностью будет приводить к возникновению или умножению у вызвавших заболевание МБТ лекарственной устойчивости, снижению эффективности лечения такого больного и повышению вероятности неблагоприятного исхода. Современные методы, имеющиеся сегодня в распоряжении лаборатории, позволяют с большой вероятностью подтвердить туберкулезную этиологию заболевания, подтвердить или исключить наличие МЛУ возбудителя туберкулеза. *Неприменение этих методов обследования на этапе диагностики ущемляет права пациента на эффективную медицинскую помощь, а также его право на здоровье и часто — на жизнь.*

Этиологическая диагностика туберкулеза основывается на методах лабораторной диагностики, направленных на подтверждение наличия возбудителя в диагностическом материале и определение его характеристики (видовой принадлежности и спектра лекарственной чувствительности), — *этиологических исследований* и должна применяться в комплексе обследований для выявления туберкулеза у пациентов с клиническими симптомами этого заболевания, дифференциальной диагностики и контроля эффективности лечения больных туберкулезом.

Этиологическая диагностика туберкулеза должна основываться на действующей нормативной базе, регламентирующей ее проведение, и быть направлена на обеспечение:

- доступности обследования для всего населения вне зависимости от географических особенностей мест проживания или социального статуса пациента;
- быстрой диагностики заболевания и определения лекарственной чувствительности возбудителя;
- использования методов исследования с доказанной эффективностью с целью наиболее полного удовлетворения требований к качеству диагностики и контроля лечения больных туберкулезом;
- эффективного мониторинга распространения лекарственно-устойчивых форм туберкулеза;
- высокого качества, экономической эффективности и безопасности лабораторных исследований;
- устойчивой системы развития этиологической диагностики туберкулеза, в том числе быстрого внедрения и эффективного использования инновационных подходов.

Лабораторное обследование пациентов должно обеспечивать подтверждение/исключение наличия возбудителя туберкулеза в диагностическом материале, определение массивности бактериовыделения (степени инфекционной опасности больного) и

исключение/подтверждение МЛУ с максимальным качеством (в кратчайшие сроки и с наибольшей достоверностью, которые могут обеспечить методы последнего поколения).

На этапе расширенного исследования должно быть проведено исследование лекарственной чувствительности к основным противотуберкулезным препаратам, а при необходимости — и к препаратам резервного ряда.

Этиологические методы не являются скрининговыми и могут применяться при обследовании пациентов с клиническими симптомами туберкулеза или с выявленными с помощью лучевых методов изменениями, ассоциирующимися с туберкулезом.

Организация исследований должна обеспечивать получение результатов исследования в **кратчайшие сроки и их наибольшую достоверность**, возможные при применении методов последнего поколения и внедрении системы управления качеством во всех лабораториях, проводящих исследования для подтверждения диагноза «туберкулез», вне зависимости от уровня подчиненности и вида исследований.

Если в лаборатории медучреждения, проводящего обследование пациента, отсутствует возможность проведения исследования с указанными выше диагностической чувствительностью и специфичностью и в указанные сроки, пациенту должна быть гарантирована возможность проведения такого обследования в другой лаборатории, оснащенной соответствующим образом.

Результаты лабораторных исследований могут применяться для принятия клинических решений или учитываться при мониторинге противотуберкулезных мероприятий только при наличии в лаборатории системы управления качеством, гарантирующей стабильную работу и достоверность исследований.

2.2. Методология подготовки клинических рекомендаций

Настоящие клинические рекомендации разработаны в соответствии с рекомендациями Ассоциации профессиональных медицинских обществ по качеству медицинской помощи и медицинского образования (АСМОК) [3], учитывают положения национального стандарта «Клинические рекомендации (протоколы лечения)» [4] и основываются на анализе систематических обзоров источников доказательств и обзоров последних доступных научных публикаций. При подготовке клинических рекомендаций использовалось учебное пособие «Основы доказательной медицины» Московской медицинской академии имени И.М. Сеченова и ГНИЦ профилактической медицины [5] и рекомендации ВОЗ по подготовке клинических рекомендаций [6].

Методы, использованные для **сбора/селекции доказательств**: поиск в электронных базах данных, изучение отечественных и зарубежных публикаций.

Доказательной базой для рекомендаций являются:

- публикации, вошедшие в электронные библиотеки, базы данных: Кохрайновскую библиотеку, e-library, EMBASE и MEDLINE;
- публикации в отечественных и зарубежных профессиональных журналах, не вошедшие в вышеперечисленные собрания.

Глубина поиска составляла 10 лет.

Клинические рекомендации включают также рекомендации Всемирной организации здравоохранения, других российских и международных профессиональных организаций. В случае включения в настоящие рекомендации рекомендаций других организаций приводятся уровни достоверности доказательств, указанные их разработчиками, адаптированные к применяемой в настоящих рекомендациях шкале уровня достоверности (табл. 1).

Принятие решения членами рабочих групп.

Представленные рекомендации были сформированы на основании консенсуса членов рабочих групп. Консенсус достигался при обсуждении рабочих версий документов, разосланных по электронной почте всем членам соответствующей рабочей группы. Консенсус считался достигнутым, если члены рабочей группы не высказали дополнительных замечаний и возражений по содержанию версии документа и/или большинство (не менее 90% высказавшихся участников) одобрили обсуждаемую версию.

Методы, использованные для оценки достоверности доказательств. Достоверность данных, на основании которых составлялись рекомендации, определялась с учетом уровня достоверности и качества данных, приведенных в изученных публикациях, согласно рейтингам (см. табл. 1) и в соответствии с системой, предлагаемой в [4, 5].

Уровень достоверности доказательств. Члены рабочих групп достигали консенсуса в оценке уровней

достоверности доказательств данных, приведенных в публикациях. Уровень достоверности исследования оценивался с учетом применявшейся методики, выраженности эффекта, его воспроизводимости в работах разных авторских коллективов, количества публикаций, значимости эффекта для пациента (критически важный, важный, малозначимый).

Понижение уровня достоверности проводилось при консенсусном решении членов рабочей группы о наличии в изученных опубликованных исследованиях:

- 1) риска систематических ошибок;
- 2) невозможности эффекта в работах разных авторов;
- 3) косвенности доказательств;
- 4) недостаточной точности методологии определения выраженности эффекта.

Уровень достоверности повышался при консенсусном решении членов рабочей группы о наличии в изученных опубликованных исследованиях:

- 1) значительной выраженности эффекта;
- 2) данных о дозозависимости эффекта;
- 3) неучтенных, влияющих на эффект факторов, исключение которых увеличило бы размер оцениваемого эффекта.

При этом «публикационные смещения» — систематические ошибки, связанные с погрешностью отбора исследований, возникающие из-за предпочтения публиковать исследования с положительными (статистически значимыми) результатами, не учитывались.

При определении уровня достоверности исследований, лежащих в основе новой рекомендации, включающей в себя несколько составляющих, уровень достоверности определялся как равный самому низкому уровню достоверности исследований.

Сила рекомендации. Рабочая группа, разрабатывающая соответствующие клинические рекомендации, принимала решение о силе рекомендации, основываясь на анализе опубликованных результатов исследований и собственном опыте. Категория «сильная рекомендация» присваивалась рекомендации, ожидаемая польза от внедрения которой, по мнению

Таблица 1

Рейтинговая система оценки достоверности

Уровень убедительности	Название	Описание
A	Высокая достоверность	Доказательства основаны на данных многих рандомизированных клинических исследований или метаанализов
B	Умеренная достоверность	Доказательства основаны на данных одного рандомизированного клинического исследования или многих нерандомизированных исследований
C	Ограниченная достоверность	Согласованные мнения экспертов и/или немногочисленные исследования, ретроспективные исследования, регистры

рабочей группы, будет значительно превосходить нежелательные последствия как для больного, так и для общества в целом. Категория «условная/слабая рекомендация» присваивалась рекомендации, больший положительный эффект от внедрения которой по сравнению с возможными негативными последствиями рабочая группа оценивает как менее вероятный.

Решение о силе рекомендаций принималось рабочей группой с учетом достоверности доказательств, но не только. При принятии решения учитывались соотношение положительного эффекта и нежелательных последствий, значимость применения рекомендации как для больного, так и для общества с учетом эпидемических, социальных и экономических последствий. Таким образом, некоторые рекомендации при низком уровне доказательности были признаны сильными исходя из высокой оценки значимости их применения рабочей группой.

Экономический анализ. Анализ стоимости не проводился, и публикации по фармакоэкономике не анализировались.

Метод валидации рекомендаций. Проекты клинических рекомендаций были представлены на сайте Национальной ассоциации фтизиатров и обсуждены на III Конгрессе Национальной ассоциации фтизиатров и форумах других профессиональных сообществ.

2.3. Мониторинг клинических рекомендаций

Национальная ассоциация фтизиатров будет проводить мониторинг применения клинических рекомендаций с целью оценки соответствия оказания медицинской помощи в регионах России установленным ими требованиям, а также их дальнейшей актуализации. Мониторинг будет проводиться в два этапа. На первом этапе будут выполнены оценка приемлемости клинических рекомендаций и при необходимости их актуализация, разработан план мероприятий в субъектах Российской Федерации, муниципальных образованиях и медицинских организациях по обеспечению соблюдения требований клинических рекомендаций.

На втором этапе будет проводиться текущее мониторинговое с целью регулярного пересмотра клинических рекомендаций и оценки качества оказания медицинской помощи с использованием ключевых индикаторов.

2.4. Срок действия клинических рекомендаций и их обновление

Клинические рекомендации подлежат ежегодному пересмотру. Рабочие группы Ассоциации ежегодно пересматривают клинические рекомендации, внося в них дополнения и изменения в соответствии с появившимися новыми данными, методами, техноло-

гиями. При оценке уже существующих рекомендаций и разработке новых члены рабочих групп будут следовать принципам оценки достоверности доказательств, указанным выше. Проекты изменений в рекомендациях будут публиковаться на сайте Национальной ассоциации фтизиатров и других профессиональных сообществ и утверждаться на съезде Ассоциации и форумах других заинтересованных профессиональных сообществ.

2.5. Клинические рекомендации применяют [4]:

- для проверки на соответствие требованиям, установленным клиническими рекомендациями, при проведении процедуры лицензирования медицинских организаций;
- планирования объемов медицинской помощи;
- разработки и реализации стандартов медицинской помощи и обоснования затрат на ее оказание;
- обоснования программы государственных гарантий оказания медицинской помощи населению;
- проведения экспертизы и оценки качества медицинской помощи объективными методами;
- выбора оптимальных технологий диагностики и контроля эффективности лечения для конкретного пациента;
- обучения в рамках непрерывного медицинского образования;
- защиты прав пациента и врача при разрешении спорных и конфликтных вопросов.

2.6. Методы этиологической диагностики

2.6.1. Выявление возбудителя туберкулеза в диагностическом материале

Все методы диагностики заболеваний можно разделить на прямые, позволяющие выявить непосредственно этиологический агент заболевания, и косвенные, которые выявляют последствия воздействия этиологического агента на организм больного.

При туберкулезе к прямым методам относятся традиционные методы микробиологической диагностики (микроскопия и посев) и метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий определять наличие ДНК возбудителя в диагностическом материале.

Методы микроскопии

Методы этиологической диагностики начали использоваться в диагностике туберкулеза с конца XIX в. Старейшими, но сохраняющими свою значимость до сегодняшнего дня являются методы микроскопии мазков, окрашенных высокоспецифичным для микобактерий способом [7, 8]. Специфичность методов окраски, получивших название «кислотоустойчивое окрашива-

ние», основывается на особенности клеточной стенки микобактерий образовывать устойчивые к воздействию кислого этанола или минеральных кислот (серной кислоты) связи с арилметановыми красителями, к которым относятся фуксин и флуоресцентный краситель аурамин ОО. Обработка мазков этими веществами в водно-фенольном растворителе (карболовый фуксин или карболовый аурамин ОО) обычно приводит к окрашиванию микобактерий, устойчивому к их последующей обработке кислым спиртом или серной кислотой. Окрашивание, по-видимому, обусловлено связыванием красителей с характерным для микобактерий высокомолекулярным гликолипидным компонентом клеточной стенки бактерий — миколовыми кислотами. В результате кислотоустойчивые микобактерии окрашиваются в красный цвет (окраска по Цилю–Нильсену) или имеют желто-зеленую флуоресценцию. Фенол увеличивает способность красителя проникать в липидные слои клеточной мембраны, повышая ее гидрофобность, усиливая тем самым интенсивность окраски. Помимо *Mycobacterium tuberculosis*, способностью к кислотоустойчивому окрашиванию обладают и другие микобактерии, относящиеся к микобактериям туберкулеза, а также нетуберкулезные микобактерии. Основанная на применении карболового фуксина окраска по Цилю–Нильсену или флуоресцентное окрашивание аурамин ОО широко распространено в мире и в нашей стране. В России также широко распространен метод флуоресцентного окрашивания без применения фенола с использованием красителей аурамина ОО и родамина [9].

Чувствительность методов микроскопии для выявления туберкулеза невелика, поэтому при неудовлетворительном качестве собранного диагностического материала (мокроты) его эффективность снижается. Однако клиническая специфичность превышает 95%.

Эффективность методов высока среди наиболее эпидемически опасной группы больных. Время оборота теста составляет от нескольких часов до суток. Эти характеристики тестов позволяют методам микроскопии сохранять свое значение и сегодня. Результаты исследований этими методами, так же как и требующими значительно большего времени методами посева, определяют классификацию больного как бациллярного или абациллярного. Методы микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием позволяют выявить бактерии, обладающие таким свойством. К ним, помимо микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК), относятся и другие микобактерии. Однако доля таких бактерий невысока, поэтому влияние этого фактора на специфичность выявления туберкулеза невелика. Вместе с тем это свойство теста выгодно отличает его от применяемых в настоящее время тестов на основе молекулярно-генетических методов (МГМ), выявляющих

специфичные только для микобактерий туберкулезного комплекса фрагменты ДНК (см. ниже). Поэтому все случаи с положительным результатом микроскопического исследования для выявления кислотоустойчивых бактерий (КУБ) должны исследоваться на наличие у них нетуберкулезных микобактерий.

Цитологические и гистологические исследования

Этиологическое подтверждение диагноза может быть проведено при выявлении *M. tuberculosis* в тканях цитологическим, гистологическим и иммуногистохимическим методами [10]. Материалом для цитологического исследования служат мазки и отпечатки из соскобов патологически измененных тканей и экссудатов, которые после фиксации тем или иным способом окрашиваются карболовым фуксином по Цилю–Нильсену, аурамин ОО и другими методами [11, 12].

Для гистологического исследования кусочки органов фиксируются в 10% нейтральном формалине, проводятся через спирты и заливаются в парафин. После этого из них приготавливаются срезы толщиной 3–5 мкм, которые окрашиваются гематоксилином и эозином по Романовскому–Гимзе, Цилю–Нильсену и другими методами, причем микобактерии определяются на фоне тех или иных морфологических изменений. Для характеристики морфологических изменений используются и дополнительные окраски, рекомендуемые в руководствах по патологической анатомии [13].

Как и при других микроскопических исследованиях с выявлением кислотоустойчивых бактерий, при цитологическом и гистологическом исследованиях выявляются кислотоустойчивые микроорганизмы, видовая принадлежность которых остается под вопросом. Так, по Цилю–Нильсену одинаково окрашиваются *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. avium-intracellulare*, ряд других нетуберкулезных микобактерий, нокардии, родококки, *Legionella micdade*, а также кортикальные шипики яиц шистосом, крючья эхинококков, споры криптоспоридий. Для их идентификации и точного определения видовой принадлежности результаты бактериоскопии сопоставляются с результатами посева, позволяющего выделять возбудителя в чистой культуре, или с результатами ПЦР.

В настоящее время с этой же целью используется иммуногистохимическое исследование, сущность которого состоит в визуализации антигенов *M. tuberculosis* с помощью меченых антител (сывороток). Эти антитела могут иметь различную специфичность и позволяют выявлять как *M. tuberculosis*, так и микобактерии туберкулезного комплекса.

Часто этиологическим подтверждением диагноза «туберкулез» считают результаты гистологического

исследования, при котором в легких и других органах обнаруживаются «специфические» микроскопические изменения в виде казеозно-некротических фокусов, эпителиоидно-клеточных бугорков, инфильтратов и других патологических изменений. Оценка их диагностического значения находится в компетенции патоморфолога. Однако необходимо учитывать, что такие «специфические», казалось бы, именно для туберкулеза гранулематозные изменения, как эпителиоидно-клеточные бугорки с гигантскими многоядерными клетками Лангханса, встречаются при многих других гранулематозных болезнях и даже при неинфекционной патологии [14–16]. Это диктует необходимость проводить тщательную дифференциальную диагностику в каждом конкретном случае. Наличие «специфических» изменений является необходимым, но недостаточным признаком туберкулеза. Его необходимым и достаточным признаком служит совокупность характерных микроскопических изменений ткани и наличие *M. tuberculosis*.

Молекулярно-генетические методы

Метод полимеразной цепной реакции — молекулярно-генетический метод, позволяющий добиться значительного увеличения (амплификации) малых концентраций определенных (специфичных) фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК) возбудителя в биологическом материале (пробе) и подтвердить наличие этиологического агента в материале даже при его незначительном количестве. В результате последовательных циклов удвоения специфического фрагмента ДНК возбудителя число копий возрастает экспоненциально, и всего за несколько часов можно получить более 100 млрд копий. Недостатком метода является то, что обнаружение ДНК не позволяет во всех случаях говорить о наличии живых клеток возбудителя. Поэтому этот метод не рекомендуется для контроля эффективности противотуберкулезной химиотерапии [17].

На начальных этапах развития ПЦР-диагностических систем детекция амплифицированного продукта реакции была связана с этапом электрофореза. Большие количества копий амплифицированной ДНК создавали угрозу перекрестной контаминации образцов в процессе их внесения в гель и загрязнения самой лаборатории. Этим обуславливались жесткие требования к разграничению зон проведения разных этапов теста [18].

Современные ПЦР-технологии — ПЦР в режиме «реального времени» (Real-Time PCR, ПЦР-РВ) дают возможность регистрировать количество специфического фрагмента ДНК параллельно с его амплификацией. Эта технология позволяет не только выявить ДНК возбудителя в образце, но определить его коли-

чество в реальном времени после каждого цикла амплификации. Для этого используют флуоресцентные красители, интеркалирующие в двуцепочечные молекулы ДНК (интеркаляция возможна в случае, если краситель имеет подходящие размеры и химическую природу и может поместиться между основаниями ДНК) или модифицированные дезоксирибонуклеотиды, которые флуоресцируют после гибридизации с комплементарными участками ДНК.

Дополнительным преимуществом ПЦР-РВ является отсутствие стадии электрофореза в процедуре исследования, что позволяет минимизировать риск контаминации образцов и лаборатории продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов. Это снижает требования к организации ПЦР-лаборатории, становятся возможны автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Примером автоматизированной системы ПЦР-РВ является картриджная технология Gene-XPert, рекомендованная ВОЗ для лабораторной диагностики туберкулеза [18]. Эта система позволяет одновременно выявлять ДНК возбудителя в диагностическом материале и подтверждать/исключать наличие мутаций в гене *rpoB*, приводящих к устойчивости бактерий к рифампицину.

Данные клинических испытаний ПЦР-РВ известны только для Gene-XPert [18]. По результатам метаанализа, диагностическая чувствительность этой тест-системы для диагностики туберкулеза легких составляет 88% (84–92%), специфичность — 99% в сравнении с результатами посева на плотные и жидкие среды. Средняя чувствительность для образцов с положительным результатом микроскопии составила 98% (97–99%), для образцов с отрицательным результатом микроскопии — 68% (61–74%). Данные о клинических испытаниях отечественных тест-систем для диагностики туберкулеза легких найти не удалось.

Данные клинических испытаний Gene-XPert для выявления возбудителя во внелегочных материалах дают среднюю чувствительность, варьирующую от 43,7% для плевральной жидкости до 84,9% — для лимфоузлов (данные метаанализа, [18]). Применение отечественной ПЦР-РВ тест-системы позволило выявить микобактерии туберкулезного комплекса у 14,6% пациентов из 80 больных ВИЧ с симптомами сепсиса, тогда как наиболее эффективные методы посева показали наличие возбудителя в 6,9% образцах [19].

Значительным преимуществом всех методов ПЦР-РВ является малое время оборота теста — для Gene-XPert оно составляет 2 ч. Время выдачи результата определяется мощностью прибора. Для отечественных тест-систем это время составляет 4–4,5 ч. Среднее время выдачи результата не должно превышать одного рабочего дня.

Таким образом, по результатам анализа многочисленных публикаций, ПЦР-РВ (на примере Gene-XPert) обладает значительно большей чувствительностью, чем метод микроскопии, имея сравнимую с ней диагностическую специфичность. Он несколько уступает в чувствительности методу посева, но позволяет получить результат в течение одного рабочего дня. Gene-XPert дает возможность с большой вероятностью подтвердить наличие у больного МЛУ туберкулеза.

Культуральные методы исследования

Культуральные методы исследования, или методы посева, основываются на выращивании микобактерий, содержащихся в диагностическом материале, на искусственных средах [20]. В случае микобактерий туберкулеза эти методы применяются начиная с первой половины XX в. Микобактерии туберкулезного комплекса характеризуются длительным временем культивирования (до 2 мес. и более) и специфическими требованиями к питательным свойствам питательной среды.

Длительное время выращивания МБТК повышает частоту загрязнения засеянных сред быстрорастущей немикобактериальной флорой. В связи с этим перед посевом диагностический материал подвергается дополнительной процедуре — деконтаминации. В результате этой обработки убивается большая часть нетуберкулезной флоры, однако при этом гибнет и часть клеток МБТ. Качество проведения этой процедуры существенно влияет на эффективность посева.

Наиболее распространенными средами для выделения МБТК являются среды на основе куриных яиц — Левенштейна–Йенсена и более кислые среды Огавы и ФИНН II. В Российской Федерации применяются и другие яичные среды. Они дешевы, содержат в своем составе малахитовый зеленый, угнетающий рост немикобактериальной флоры. Главным недостатком этих сред является низкая скорость роста туберкулезных микобактерий — до 8–10 недель, а также относительно меньшая их пригодность для выделения нетуберкулезных микобактерий.

Жидкие среды, и особенно среда Миддлбрук 7Н9, позволяют уменьшить сроки культивирования микобактерий (среднее время появления роста — 10–14 дней), увеличивают выход туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий [21]. Это связано и с более щадящим методом деконтаминации, применяемым при подготовке образцов для посева. Однако использование этих сред приводит к сравнительно большей доле проростов и предъявляет более высокие требования к системе биобезопасности в лаборатории и к квалификации персонала. Кроме того, эти среды имеют большую стоимость по сравнению с плотными средами.

Жидкие среды применяются в микробиологических автоматических анализаторах. Анализаторы, позволяющие значительно снизить время определения наличия роста микроорганизмов, — анализаторы с флуоресцентной детекцией роста. Благодаря применению стандартизованных, промышленно изготовленных реагентов и расходных материалов, а также стандартизации условий культивирования и регистрации результатов снижается вероятность ошибки лабораторного специалиста, повышаются культура труда в бактериологической лаборатории и в конечном счете — эффективность и достоверность исследования [22].

Плотные и жидкие среды могут применяться для исследования любых диагностических материалов, включая бронхолегочный (мокрота, промывные воды бронхов, аспирационный материал, бронхо-альвеолярный лаваж (БАЛ), браш-биопат, биопат, эксудат и др.), биопсийные и операционные материалы (материалы лимфатических узлов, паренхиматозных органов, гной, грануляции, секвестры, фрагменты межпозвоночных дисков, костей, кожи), мочу, кровь и др. Наибольшая эффективность метода посева достигается при применении нескольких сред, одна из которых — жидкая.

Эффективность различных комплектов сред с учетом времени получения результатов различна для различных материалов. Для бронхолегочных материалов оптимально применение сред Левенштейна–Йенсена и Миддлбрук 7Н9 с флуоресцентной детекцией роста [23], для большинства внелегочных материалов — больше подойдут плотные яичные среды Левенштейна–Йенсена и ФИНН II и среды Миддлбрук 7Н9 с детекцией роста [23]. Разработаны и селективные жидкие среды для выделения туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий из крови [24]. Применение этих методов имеет большое значение, особенно для диагностики этиологии бактериемии у ВИЧ-инфицированных больных [25]. Для исследования мочи в настоящее время рекомендуется только посев на две плотные яичные среды.

Для этиологических исследований методом посева требуются дорогостоящее оснащение лаборатории и высокая квалификация ее сотрудников. Стоимость внедрения метода посева в жидкие среды, и особенно автоматических микробиологических анализаторов, так же как и стоимость самого исследования, высока. Посев на яичные среды значительно дешевле. Несмотря на это, большая эффективность исследований с использованием жидких сред и флуоресцентной детекции роста, значительное сокращение времени получения результата для большинства бронхолегочных образцов обеспечивают стандартизацию процесса и минимизацию влияния «человеческого фактора» на

результат, повышают достоверность полученных результатов. Все это делает посев в жидкие среды с флуоресцентной детекцией приоритетной технологией исследования для этиологического подтверждения диагноза «туберкулез».

Несмотря на значительно более длительные сроки получения результатов методом посева по сравнению с методами ПЦР, по имеющимся на сегодняшний день опубликованным данным, методы посева имеют большую чувствительность. Кроме того, при посеве диагностического материала в случае микобактериозов удается выделить и культуры нетуберкулезных микобактерий, что не позволяет сделать ПЦР-методы, основанные на выявлении специфичных для микобактерий туберкулезного комплекса фрагментов ДНК. Помимо этого, культура микобактерий, полученная при посеве диагностического материала, необходима для дальнейшего изучения спектра лекарственной чувствительности микроорганизмов.

2.6.2. Идентификация микобактерий

Большинство молекулярно-генетических тест-систем позволяют выявлять в диагностическом материале ген, общий для всех микобактерий туберкулезного комплекса. При подозрении на наличие нетуберкулезных микобактерий или *M. bovis* необходимо проводить дополнительные исследования.

В случае выделенных культур их принадлежность к комплексу микобактерий туберкулеза должна подтверждаться иммунохроматографическими или молекулярно-генетическими тестами.

Большая часть нетуберкулезных микобактерий может быть идентифицирована с применением молекулярно-генетических тест-систем или масс-спектрометров. Культуральные и биохимические тесты должны использоваться в исключительных случаях, если указанные выше методы не позволили однозначно идентифицировать выделенные микобактерии.

Подтверждение принадлежности культуры к *M. bovis* должно проводиться молекулярно-генетическими методами.

ВНИМАНИЕ! Идентификация нетуберкулезных микобактерий до вида должна проводиться только в межрегиональных лабораториях или лабораториях научно-исследовательских институтов.

2.6.3. Исследования лекарственной чувствительности

Исследования лекарственной чувствительности — обязательный тест для всех больных, в диагностическом материале которых выявлены ДНК или микобактерии туберкулеза. Доля случаев с неизвестным спектром чувствительности возбудителя должна быть минимизирована и при туберкулезе легких не должна

превышать 35% — это те случаи, для которых не удалось получить материал (ДНК или культуру) для исследования.

В настоящее время в арсенале микробиологических лабораторий имеются две группы тестов исследования лекарственной чувствительности/устойчивости: культуральные, или фенотипические, и генотипические.

Культуральные методы позволяют выявить генетические изменения микобактерий, приводящие к их устойчивости к действию тех или иных противотуберкулезных препаратов (ППП) — фенотипическое проявление генетических особенностей штамма. Традиционно говорят об определении чувствительности микобактерий туберкулеза к ППП, определенной культуральным методом.

Генотипический метод основан на выявлении мутаций, приводящих к устойчивости микобактерий к определенным ППП. Генетические методы основаны на выявлении уже идентифицированных мутаций, поэтому их результаты не всегда совпадают с результатами фенотипических методов. Например, совпадение результатов выявления устойчивости к рифампицину при применении современных МГМ по сравнению с фенотипически определенными устойчивыми штаммами варьирует от 97,8 до 98,7%, для изониазида этот показатель составляет 90–92%, для фторхинолонов — 90–92%, для группы антибиотиков амикацин–капреомицин — 85%, а для этамбутола — 69,2%.

Время получения данных о наличии или исключении МЛУ не должно превышать трех рабочих дней. В случае выявления МЛУ должен быть поставлен молекулярно-генетический тест на устойчивость МБТ к фторхинолонам как индикаторам устойчивости, предшествующей широкой лекарственной устойчивости (пре-ШЛУ). На основании этих данных должен быть выбран соответствующий режим химиотерапии.

Для всех больных, от которых была выделена культура возбудителя, должен быть определен спектр лекарственной чувствительности возбудителя методом, позволяющим провести исследование в кратчайшие сроки и с наибольшей достоверностью. При выявлении лекарственной устойчивости к препарату молекулярно-генетическим методом дважды проводить культуральное исследование чувствительности к этому препарату не следует. Однако если МГМ не выявили мутации, приводящие к устойчивости к препаратам, исследование чувствительности культуральным методом следует провести. Исключением являются случаи, когда по данным производителя или опубликованных метаанализов молекулярно-генетический метод позволяет выявить более 95% случаев устойчивости к препарату, определенных фенотипическим методом.

Молекулярно-генетические методы выявления лекарственной устойчивости

Генотипические методы определения лекарственной устойчивости 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;
- 2) мультиплексная ПЦР в режиме реального времени;
- 3) «картриджная» технология (выделение ДНК и амплификация идут автоматически в специальном картридже).

К **гибридизационным технологиям** относятся отечественные тест-системы «ТБ-Биочип-1» «ТБ-Биочип-2», позволяющие обнаружить точечные мутации, приводящие к лекарственной устойчивости, методом гибридизации на биологическом микрочипе. Набор «ТБ-Биочип-1» предназначен для определения устойчивости возбудителя туберкулеза к рифампицину и изониазиду. Его специфичность — не менее 95% для рифампицин- и свыше 80% для изониазид-устойчивых штаммов возбудителя туберкулеза. Время проведения анализа 1–2 суток. «ТБ-Биочип-2» позволяет определять устойчивость к фторхинолонам с чувствительностью не менее 85% (ген *gyrA*). Чувствительность — не менее 500 геном-эквивалентов микобактерий (100–300 КОЕ в 1 мл мокроты). Время проведения анализа — 1–2 суток.

Технология с применением ДНК-стрипов позволяет определять лекарственную устойчивость к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, этамбутолу, аминогликозидам/циклическим пептидам (набор GenoType MTBDRplus) и рекомендована ВОЗ для быстрой диагностики МЛУ-туберкулеза [26, 27]. Ее чувствительность и специфичность, по данным мета-анализа публикаций группы экспертов ВОЗ, высокие и составляют соответственно 98,1 и 98,7% (98 и 99%) для рифампицина и 84,3 и 99,5% (90 и 99%) для изониазида. Для ПТП 2-го ряда чувствительность при определении устойчивости к фторхинолонам составляет 83,1% (78,7–86,7%), а суммарная чувствительность определения ШЛУ — 70,9% (42,9–88,9%). Специфичность для этих препаратов составляет 97,7 и 98,8% соответственно [27]. При определении устойчивости к этамбутолу были показаны более низкие чувствительность и специфичность — 38,5–69,2% и 81% соответственно [28]. Время оборота теста составляет не более 2 суток.

Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени основана на использовании оригинальной

методики ПЦР в реальном времени, позволяющей выявлять мутации в генах микобактерий туберкулеза, ответственных за устойчивость к конкретным ПТП. С помощью данного метода можно определить не только наличие мутации, но и долю устойчивого мутантного штамма МБТ в выделенной от больного популяции. 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. [Утверждения разработчиков. Комплект реагентов АМПЛИТУБ-МЛУ-РВ. Набор реагентов для быстрого определения антибиотикоустойчивости микобактерий туберкулезного комплекса. (НПК СИНТОЛ, Россия). Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07636]. Время оборота теста — менее 3 часов.

Картриджная технология GeneXpert MTB/RIF позволяет непосредственно из нативной мокроты в течение 2 часов одновременно выявлять ДНК МБТ и с высокой достоверностью определять устойчивость МБТ к рифампицину (чувствительность — 95%, специфичность — 98%) [17].

Культуральные методы

Культуральные, или фенотипические, методы определяют чувствительность или устойчивость выделенной культуры (штамма) МБТ по их росту на стандартной питательной среде в присутствии противотуберкулезного препарата в его критической концентрации. Рост микобактерий оценивается в сравнении с их ростом на среде без препарата. Критерии оценки роста зависят от применяемых методов [23].

Критические концентрации различаются для разных методов и сред, на которых проводятся исследования. Значения критических концентраций к основным и резервным препаратам определяются и регулярно пересматриваются в многоцентровых исследованиях супранациональных лабораторий ВОЗ. В последние годы критические концентрации, рекомендуемые ВОЗ и Глобальной лабораторной инициативой, — концентрации, определенные для метода пропорций на плотных средах и в жидкой среде Миддлбрук 7Н9 с использованием автоматического анализатора с флуоресцентной детекцией Bactec 960 MGIT [35].

В рекомендациях ВОЗ указано, что к препаратам 4-й группы (пероральные бактериостатические препараты резервного ряда — этионамид, протионамид, циклосерин и ПАСК) и 5-й группы (противотуберкулезные препараты с неясной эффективностью, не рекомендованные ВОЗ для лечения МЛУ-больных — клофазимин, амоксициллин/клавуланат, кларитромицин, линезолид) проводить исследования лекарственной

чувствительности в рутинном режиме не рекомендуется. При этом критические концентрации для цикloserина известны только для среды Левенштейна–Йенсена, для линезолида — только для системы Bactec 960 MGIT.

Метод абсолютных концентраций определяет концентрацию, к которой чувствительна выделенная от пациента культура. С этой целью тестируются не менее двух концентраций ПТП. В нашей стране применяется модифицированный метод абсолютных концентраций. В отличие от классического метода, в нем используются более высокие критические концентрации к изониазиду и стрептомицину [36]. Культура МБТ считается устойчивой, если на питательной среде с определенным препаратом вырастает 20 и более колоний микроорганизмов. Время получения результата составляет 3 недели. При плохом росте МБТ на контрольной питательной среде время оценки результата задерживается еще на 1–2 недели.

Метод абсолютных концентраций в модификации, применяемой в России, менее чувствителен по сравнению с используемым в мире методом пропорций (см. ниже) в отношении изониазида и стрептомицина [37]. *Критические концентрации для препаратов резервного ряда для метода абсолютных концентраций в международных мультицентровых исследованиях не определялись!*

Наиболее распространенным в мире вплоть до недавнего времени оставался **метод пропорций**. Это исследование проводится на нескольких плотных средах: среде Левенштейна–Йенсена, агаризованных средах Миддлбрук 7Н10 и 7Н11. Международные мультицентровые исследования под эгидой ВОЗ определили и регулярно пересматривают критические концентрации для ПТП для этого метода [35]. Критерием устойчивости клинического изолята является рост на среде с ПТП в критической концентрации более 1% колониеобразующих единиц по сравнению с контролем — для препаратов 1-го ряда и более 10% — для препаратов резервного ряда. Время на получение результата, позволяющего сделать заключение по устойчивости клинического изолята к ПТП, — 28 дней, заключение о чувствительности выдается через 40 дней [23].

Нитрат-редуктазный метод (метод Грисса) основан на детекции роста микобактерий туберкулеза по окислению нитрата ферментом, продуцируемым МБТ (но не *M. bovis*), и последующей цветной реакции с образовавшимся нитритом [23, 38]. Метод используется в нескольких странах, в нашей стране для него налажено промышленное производство тест-наборов. Критические концентрации для этого метода в многоцентровых международных исследованиях не изучались. Время получения результата — до 12–14 дней.

Метод с использованием автоматического анализатора с флуоресцентной детекцией Bactec 960 MGIT. Применяется жидкая среда Миддлбрук 7Н9. Все реагенты и расходные материалы для проведения исследования изготавливаются и поставляются единственным производителем в мире, что обуславливает их высокую стоимость. Тем не менее этот метод — наиболее стандартизованный из всех применяемых сегодня микробиологических методов. Качество исследования в значительной степени определяется на уровне производства реагентов и расходных материалов.

Этот метод используется как референтный во всех супранациональных лабораториях ВОЗ. Результаты его применения для определения лекарственной чувствительности МБТ к препаратам 1-го и резервного ряда опубликованы во многих исследованиях [39–42]. В основе метода — модифицированный для жидких сред метод пропорций. Время получения результата — 10–14 дней. При выделении культуры из диагностического материала и последующем определении лекарственной чувствительности в системе **Bactec 960 MGIT** в абсолютном большинстве случаев удается провести весь цикл исследований: от выделения культуры до получения спектра лекарственной чувствительности — за 1 мес. Критические концентрации для большинства ПТП определены в международных мультицентровых исследованиях.

3. Список рекомендаций

3.1. Диагностика и дифференциальная диагностика

1. Для подтверждения диагноза «туберкулез органов дыхания» все пациенты: дети, подростки, взрослые, ВИЧ-инфицированные, пациенты с иными иммунодефицитными и иммуносупрессивными состояниями (с уровнем CD4 <350 кл./мкл) должны быть обследованы для подтверждения/исключения наличия микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале двукратно методами:
 - полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
 - микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием;
 - посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и плотную среду Левенштейна–Йенсена.
2. Пациенты с ВИЧ-инфекцией или с иными иммунодефицитными и иммуносупрессивными состояниями (с уровнем CD4 <350 кл./мкл) при проявлении симптомов заболеваний внелегочной локализации должны быть обследованы для исключения

- диагноза «туберкулез» или «микобактериоз» двукратно методами:
- полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
 - микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием;
 - посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и на плотные среды — не менее двух разных сред (Левенштейна–Йенсена и другие яичные среды).
3. Пациенты с ВИЧ инфекцией или с иными иммунодефицитными и иммуносупрессивными состояниями (с уровнем CD4 <350 кл./мкл) при проявлении симптомов системного воспаления должны быть обследованы для исключения/подтверждения диагноза «туберкулез» путем исследования венозной крови методами:
 - полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
 - посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора.
 4. Больные с длительными хроническими процессами внелегочной локализации, с выраженными клинико-лабораторными, рентгенологическими показателями и рефрактерные к неспецифической антибактериальной и/или другим методам терапии должны быть обследованы для исключения/подтверждения туберкулеза внелегочной локализации с применением методов этиологической диагностики.
 5. Для подтверждения диагноза «туберкулез внелегочной локализации» необходимо подтвердить/исключить наличие микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале методами:
 - полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
 - микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием;
 - посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и на плотные среды — не менее двух разных сред (Левенштейна–Йенсена и другие яичные среды).
 6. Для подтверждения диагноза «туберкулез органов дыхания» или «туберкулез внелегочной локализации» может быть исследован биопсийный или операционный материал с применением методов:
 - полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
 - микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием;
 - посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и на плотные среды — не менее двух разных сред (Левенштейна–Йенсена и другие яичные среды);
 - гистологических и цитологических методов.

7. Время предоставления результатов молекулярно-генетических исследований, проведенных для подтверждения/исключения наличия микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале, не должно превышать 2 рабочих дней.

3.2. Видовая идентификация возбудителя

1. Принадлежность выделенных из диагностического материала культур к *M. tuberculosis* подтверждается методами иммунохроматографии или молекулярно-генетическими методами.
2. При обследовании больных с поствакцинальными осложнениями, включая костные поражения, во всех случаях подтверждения наличия МБТК молекулярно-генетическими методами и/или выделения культуры МБТК, или при выявлении устойчивости выделенной культуры к пипразинамиду необходимо исключить наличие *M. bovis* или *M. bovis BCG* в диагностическом материале. Для этого следует провести идентификацию возбудителя в диагностическом материале (выделенной культуре) с помощью МГМ.
3. В случае выявления возбудителя, относящегося к микобактериям, иным, чем МБТК, необходимо определить видовую (групповую) принадлежность НТМБ — в течение не более чем 3 рабочих дней с момента поступления в лабораторию диагностического материала или выделения культуры микобактерий.

3.3. Исследование лекарственной чувствительности

1. Всем пациентам, у которых подтвердилось наличие микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале ПЦР-РВ, при достаточном количестве ДНК в пробе должно быть проведено молекулярно-генетическое исследование для исключения/подтверждения наличия МЛУ-возбудителя.
2. Всем пациентам, у которых была определена МЛУ, следует провести молекулярно-генетическое исследование для исключения/подтверждения устойчивости возбудителя к фторхинолонам как индикатора пре-ШЛУ.
3. Время предоставления результатов молекулярно-генетических исследований, проведенных для исключения/подтверждения наличия МЛУ-возбудителя в диагностическом материале, не должно превышать 2 рабочих дней.
4. Всем пациентам, у которых были выделены культуры, должны быть проведены исследования спектра лекарственной устойчивости микробиологическими методами — на жидких средах

с применением автоматического анализатора Bactec MGIT 960 или методом пропорций (для препаратов, критические концентрации для которых установлены только для этого метода [20]), или нитрат-редуктазным методом. Время получения спектра лекарственной чувствительности возбудителя не должно превышать 6 недель с начала обследования.

5. Если устойчивость к изониазиду или рифампицину выявлена молекулярно-генетическими методами дважды, исследования лекарственной чувствительности к этим препаратам не должны дублироваться методом посева.
6. Если устойчивость к любому препарату выявлена любыми методами дважды, при дальнейших исследованиях лекарственной чувствительности образцов от этого пациента *чувствительность к этим препаратам исследоваться не должна.*

3.4. Контроль эффективности химиотерапии

1. Этиологические исследования для контроля эффективности химиотерапии должны применяться только для принятия клинических и организационных решений по ведению больного. Обследование больных на этапе лечения проводится в соответствии с клиническими рекомендациями по химиотерапии туберкулеза.
2. Для контроля эффективности химиотерапии должен проводиться комплекс контрольных исследований, включающий:
 - микроскопическое исследование для выявления КУБ (два образца);
 - посев в жидкие среды (из одного образца) в сроки, указанные в действующей инструкции по химиотерапии.
3. При выявлении МБТ на этапах химиотерапии должно быть проведено исследование лекарственной чувствительности выявленного возбудителя молекулярно-генетическим методом или методом посева в жидкие среды только к тем препаратам, к которым при предыдущем исследовании была сохранена чувствительность МБТ.
4. При выявлении устойчивости МБТ к препаратам, к которым в предыдущих тестах была определена чувствительность, проводится исследование новой порции диагностического материала МГМ и методом посева в жидкие среды с последующим подтверждением принадлежности выделенного возбудителя к МБТК и исследованием лекарственной чувствительности для подтверждения первого результата.
5. Если при проведении исследований на этапах лечения выявляется изменение спектра лекарственной чувствительности возбудителя по сравнению

с результатами первого (предыдущего) обследования больного (появления устойчивости одновременно к двум и более препаратам), должно быть проведено эпидемиологическое расследование, в том числе, по возможности, сравнение генотипов штаммов, выделенных до начала лечения и приобретенных в процессе лечения.

3.5. Обследование при диспансерном наблюдении

При диспансерном наблюдении излечившихся больных этиологические обследования проводятся при появлении у них клинико-рентгенологических симптомов, позволяющих предположить рецидив заболевания. При диагностике рецидивов заболевания должны применяться алгоритмы обследования для пациентов с подозрением на туберкулез.

4. Клинические рекомендации — подробное описание

4.1. Диагностика и дифференциальная диагностика

1. Для подтверждения диагноза «туберкулез органов дыхания» все пациенты: дети, подростки, взрослые, ВИЧ-инфицированные и пациенты с иными случаями иммунодефицитных и иммуносупрессивных состояний (с уровнем CD4 <350 кл./мкл) — должны быть обследованы для подтверждения/исключения наличия микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале двукратно методами:
 - полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Уровень доказательности: **В–С**. Сила рекомендации: **сильная рекомендация**;
 - микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием. Уровень доказательности: **В**. Сила рекомендации: **сильная рекомендация**;
 - посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и плотную среду Левенштейна–Йенсена. Уровень доказательности: **А**. Сила рекомендации: **умеренная рекомендация**.

Рекомендация по применению ПЦР-РВ для подтверждения диагноза «туберкулез» у всех больных туберкулезом основывается на рекомендациях ВОЗ по использованию GeneXpert-технологии [17]. Эти рекомендации представлены как сильные в странах с высоким распространением МЛУ с различным уровнем доказательности: от А для пациентов с подозрением на туберкулез легких до С — в случае диагно-

стики туберкулеза у детей и больных ВИЧ-инфекцией. К сожалению, данных о применении других систем ПЦР-РВ при диагностике туберкулеза органов дыхания недостаточно. Члены рабочей группы, основываясь на собственном опыте, приняли консенсусное решение распространить рекомендации, касающиеся GeneXpert-технологии, на все системы ПЦР-РВ, зарегистрированные в установленном в России порядке.

Рекомендации по применению методов микроскопии и методов посева для подтверждения диагноза «туберкулез органов дыхания» — общепринятые, регулярно подтверждаемые в многочисленных публикациях. Необходимость сохранения метода микроскопии как диагностического отражена в рекомендациях ВОЗ [17]. Рабочая группа Ассоциации приняла консенсусное решение о принятии этой рекомендации ВОЗ как рекомендации Ассоциации.

Преимущества применения жидких сред с автоматической детекцией роста доказаны в многочисленных публикациях [24, 28, 29]. Использование этого метода позволяет значительно сократить время этиологического подтверждения диагноза «туберкулез» при посеве бронхолегочных материалов, увеличить число этиологически подтвержденных случаев туберкулеза, повысить число случаев этиологически подтвержденных микобактериозов, что особенно важно в условиях нарастающего распространения ВИЧ-инфекции. Метод посева необходим, чтобы выделить культуру возбудителя для дальнейшего определения его спектра чувствительности. Однако высокая стоимость расходных материалов и реагентов заставляет определить эту рекомендацию как условную.

Среди лиц, подлежащих обследованию на туберкулез, в соответствии с действующим порядком оказания медицинской помощи больным туберкулезом в Российской Федерации обследованию с целью этиологической диагностики ТБ органов дыхания подлежат пациенты с подозрением на ТБ органов дыхания, 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.

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

Кратность обследования. Достаточным основанием для этиологического подтверждения диагноза «туберкулез» может быть выявление микобактерий туберкулезного комплекса хотя бы в одном образце. Исследование мокроты методом микроскопии и посева в жидкие и на плотные среды проводится не менее чем в двух образцах (два из них также исследуются МГМ). В случае исследования других видов отделяемого трахеобронхиального дерева допустимо исследование одного образца.

Данные о характеристике случая ТБ, полученные методами микроскопии и МГМ, уточняются и корректируются в дальнейшем по результатам исследования материала методом посева.

В случае отрицательного результата исследования ПЦР-РВ для подтверждения/исключения наличия микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале должно быть проведено исследование методом посева в жидкие среды (не применяется, если чувствительность МГМ не менее 95% метода посева в жидкие среды).

Чтобы минимизировать вероятность расхождения в результатах, полученных разными методами, исследования МГМ должны проводиться из аликвоты той же пробы, которая исследуется методами посева и микроскопии.

Если в противотуберкулезном учреждении, в котором проводится обследование пациента, невозможно организовать исследование методом ПЦР-РВ, необходимо организовать пересылку диагностического материала (первичного или выделенной ДНК) во вспомогательные (субподрядные) лаборатории.

2. Пациенты с ВИЧ-инфекцией или с иными иммунодефицитными и иммуносупрессивными состояниями (с уровнем CD4 <350 кл./мкл) при проявлении симптомов заболеваний внелегочной локализации должны быть обследованы для исключения диагноза «туберкулез» или «микобактериоз» двукратно методами:

- полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) Уровень доказательности: **C**. Сила рекомендации: **сильная рекомендация**;
- микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием. Уровень доказательности: **C**. Сила рекомендации: **сильная рекомендация**;
- посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и на плотные среды — не менее двух разных сред (Левенштейна-Йенсена и другие яичные среды). Уровень доказательности: **D**. Сила рекомендации: **сильная рекомендация**.

Рекомендация по применению ПЦР-РВ для исключения диагноза «туберкулез» или «микобактериоз» у больных с ВИЧ-инфекцией или иными иммунодефицитными и иммуносупрессивными состояниями (с уровнем CD4 <350 кл./мкл) основывается на немногочисленных публикациях о использовании ПЦР-РВ для диагностики туберкулеза внелегочной локализации, данных о распространении микобактериозов у больных с иммунодефицитами и иммуносупрессией [31], а также на рекомендациях ВОЗ по применению GeneXPert-технологии [17, 31]. Члены рабочей группы, основываясь на собственном опыте, приняли консенсусное решение распространить рекомендации, касающиеся GeneXPert-технологии, на все системы ПЦР-РВ, зарегистрированные в установленном в России порядке.

Метод микроскопии недостаточно эффективен для больных с иммунодефицитами, склонных к генерализации процесса. Однако опасность ошибочной диагностики микобактериозов заставляет рекомендовать применять его: случаи с положительным результатом кислотоустойчивой микроскопии и отрицательным результатом ПЦР-РВ могут быть вызваны кислотоустойчивыми микобактериями, иными, чем микобактерии туберкулезного комплекса.

Посев в жидкую среду Миддлбрук и две плотные среды является наиболее эффективным методом выделения культуры при туберкулезных и микобактериозных поражениях внелегочной локализации [27]. Основываясь на собственном опыте и немногочисленных публикациях, члены рабочей группы приняли решение определить эту рекомендацию как сильную.

3. Пациенты с ВИЧ-инфекцией или иными иммунодефицитными и иммуносупрессивными состояниями (с уровнем CD4 <350 кл./мкл) при проявлении симптомов системного воспаления должны быть обследованы для исключения/подтверждения диагноза «туберкулез» путем исследования венозной крови методами:

- полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
- посева в жидкую среду для выделения микобактерий из крови с применением автоматического микробиологического геманализатора.

Уровень доказательности: В. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Членам рабочей группы удалось найти только единичные публикации об эффективности применения ПЦР-РВ и посевов при этиологической диагностике системных воспалений [19–22]. Вместе с тем

назначение эффективной терапии в соответствии с этиологией и лекарственной чувствительностью возбудителя определяет исход таких состояний. Основываясь на немногочисленных публикациях, личном опыте членов рабочей группы и чрезвычайной важности этиологического диагноза в таких случаях, рабочая группа определила эту рекомендацию как сильную.

4. Больные с длительными хроническими процессами внелегочной локализации, с выраженными клинико-лабораторными и рентгенологическими показаниями и рефрактерные к неспецифической антибактериальной и/или другим методам терапии должны быть обследованы для исключения/подтверждения туберкулеза внелегочной локализации с применением методов этиологической диагностики.
Уровень доказательности: В. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Возрастающее значение этиологического подтверждения диагноза и определения спектра чувствительности возбудителя туберкулеза внелегочной локализации отражено в нескольких опубликованных исследованиях и рекомендациях, ни одно из которых нельзя отнести к рандомизированным [17, 30]. Основываясь на этих публикациях и личном опыте, рабочая группа определила эту рекомендацию как сильную.

Кратность обследования зависит от вида диагностического материала:

- клинический материал, полученный без применения инвазивных методов: моча, секрет предстательной железы, эякулят, отделяемое свищей и послеоперационных ран, мазки из половых путей, соскобы эндометрия и прочее, — до выявления одного положительного результата, но не более чем три образца;
- клинический материал, полученный с использованием малоинвазивных технологий: синовиальная жидкость, ликвор, пункционный и биопсийный материал абсцессов, лимфоузлов, аспираты и соскобы, перитонеальная жидкость, кровь (только в случае септических состояний у пациентов с ВИЧ-инфекцией или другими иммунодефицитами), — двукратно/однократно (при каждой инвазивной манипуляции, параллельно с цитологическими и гистологическими исследованиями);
- операционный материал: гной, грануляции, секвестры, костные фрагменты и патологически измененная ткань — однократно или при каждом операционном вмешательстве.

Если при первых исследованиях получены отрицательные результаты, их можно повторять по клиническим показаниям при прогрессировании процесса.

5. Для подтверждения диагноза «туберкулез внелегочной локализации» необходимо подтвердить/исключить наличие микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале методами:

- полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
- микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием;
- посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и на плотные среды — не менее двух разных сред (Левенштейна–Йенсена и другие яичные среды).

Уровень доказательности: D. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

ВОЗ рекомендовала использовать ПЦР-РВ-технологии GeneXpert для выявления микобактерий туберкулезного комплекса в диагностических материалах внелегочного происхождения [17]. Эффективность других систем ПЦР-РВ для выявления микобактерий туберкулезного комплекса во внелегочных диагностических материалах показана в [19]. Возможность эффективного посева операционного материала на жидкую среду Миддлбрук 7Н9, а также на две яичные среды также показана в опубликованных исследованиях [30–33]. *Основываясь на этих публикациях и личном опыте, рабочая группа определила эту рекомендацию как сильную.*

6. Для подтверждения диагноза «туберкулез органов дыхания» или «туберкулез внелегочной локализации» может быть исследован биопсийный или операционный материал с применением методов:

- полимеразно-цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
- микроскопии с кислотоустойчивым окрашиванием;
- посева в жидкую среду с применением автоматического анализатора и на плотные среды — не менее двух разных сред (Левенштейна–Йенсена и другие яичные среды);
- гистологических и цитологических методов.

Уровень доказательности: C. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Возрастающее значение этиологического подтверждения диагноза и определения спектра чувствительности возбудителя туберкулеза всех

локализаций приводит к необходимости в исключительных случаях проводить исследования биопсийного и операционного материала. Публикации о значении применения таких методов для подтверждения этиологии заболевания и определения лекарственной чувствительности немногочисленны [2, 17, 30–33], однако многолетний практический опыт, в том числе и опыт членов рабочей группы, позволяет при низком доказательном уровне имеющихся публикаций определить рекомендацию как сильную.

7. Время предоставления результатов молекулярно-генетических исследований, проведенных для подтверждения/исключения наличия микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале, не должно превышать двух рабочих дней. Уровень доказательности: C. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Сила рекомендации определяется не уровнем доказательности опубликованных исследований, а знанием о времени, необходимом для проведения ПЦР-РВ-исследований. Этиологическое подтверждение диагноза должно быть получено не менее чем для 75% впервые выявленных случаев туберкулеза легких методами ПЦР-РВ не позднее двух дней после поступления материала в лабораторию.

4.2. Видовая идентификация возбудителя

1. Принадлежность выделенных из диагностического материала культур к *M. tuberculosis* должна быть подтверждена методами иммунохроматографии или молекулярно-генетическими методами. Уровень доказательности: C. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Сила рекомендации определяется не уровнем доказательности опубликованных исследований, а нарастающим числом случаев микобактериоза.

2. При обследовании больных с поствакцинальными осложнениями, включая костные поражения, во всех случаях подтверждения наличия МБТК МГМ и/или выделения культуры МБТК или при выявлении устойчивости выделенной культуры к пипразинамиду у других больных ТБ необходимо исключить наличие *M. bovis* или *M. bovis* BCG в диагностическом материале. Для этого следует провести идентификацию возбудителя в диагностическом материале (в выделенной культуре) МГМ. Уровень доказательности: C. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Сила рекомендации определяется не уровнем доказательности опубликованных исследований, а важностью установления этиологии таких поражений, в том числе и для выбора тактики лечения.

3. В случае выявления возбудителя, относящегося к микобактериям, иным, чем микобактерии туберкулезного комплекса, необходимо определить видовую (групповую) принадлежность нетуберкулезных микобактерий в течение не более чем трех рабочих дней с момента поступления в лабораторию выделенной культуры микобактерий. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Сила рекомендации определяется не уровнем доказательности опубликованных исследований, а нарастающим числом случаев микобактериоза.

Случаи КУБ+МГМ – могут быть связаны с принадлежностью возбудителя к нетуберкулезным микобактериям. Если при исследовании двух диагностических образцов от одного пациента получен такой результат, необходимо исследовать этот образец на содержание нетуберкулезных микобактерий молекулярно-генетическими методами и/или произвести его посев на плотную среду с последующим определением вида выделенной культуры молекулярно-генетическими методами.

Для установления диагноза «микобактериоз» необходимо, чтобы один и тот же вид НТМБ выделился от одного пациента не менее двух раз при отсутствии выделения МБТК и с учетом того, что исследование назначается при наличии симптомов заболевания.

Исключения. Для этиологического подтверждения диагноза «микобактериоз» достаточно однократного выделения НТМБ из пробы, полученной в стерильных условиях.

4.3. Исследование лекарственной чувствительности

1. Всем пациентам, у которых было подтверждено наличие микобактерий туберкулезного комплекса в диагностическом материале ПЦР-РВ, при достаточном количестве ДНК в пробе должно быть проведено молекулярно-генетическое исследование для исключения/подтверждения наличия МЛУ-возбудителя. *Уровень доказательности: В. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Рекомендация по применению ПЦР-РВ для подтверждения/исключения МЛУ-возбудителя у всех больных туберкулезом основывается на рекомендациях ВОЗ по применению GeneXpert-технологии

[17]. Эти рекомендации представлены как сильные в странах с высоким распространением МЛУ с высоким уровнем доказательности. К сожалению, данных о применении других систем ПЦР-РВ при диагностике туберкулеза органов дыхания недостаточно. Члены рабочей группы, основываясь на собственном опыте, приняли консенсусное решение распространить рекомендации, касающиеся GeneXpert-технологии, на все системы ПЦР-РВ, зарегистрированные в установленном в России порядке.

2. Всем пациентам, у которых было диагностировано наличие МЛУ МБТ, должно быть проведено молекулярно-генетическое исследование для исключения/подтверждения наличия устойчивости возбудителя к фторхинонам и аминогликозидам/капреомицину как индикаторам ШЛУ-возбудителя. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: условная рекомендация.*

Рекомендация по применению ПЦР-РВ для подтверждения/исключения ШЛУ основывается на необходимости быстрого определения индивидуализированного режима химиотерапии для таких больных. К сожалению, опубликованных данных о значимости раннего выявления устойчивости к фторхинолонам и **аминогликозидам/капреомицину для последующего повышения эффективности лечения больных найти не удалось.** Члены рабочей группы, основываясь на собственном опыте, приняли консенсусное решение рекомендовать проведение таких исследований, но определили рекомендацию как условную/слабую.

3. Время предоставления результатов молекулярно-генетических исследований, проведенных для исключения/подтверждения наличия МЛУ-возбудителя в диагностическом материале, не должно превышать трех рабочих дней. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Сила рекомендации определяется не уровнем доказательности опубликованных исследований, а знанием о времени, необходимом для проведения молекулярно-генетических исследований для определения устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

4. Всем пациентам, у которых были выделены культуры, должны быть проведены исследования спектра лекарственной устойчивости микробиологическими методами — на жидких средах с применением автоматического анализатора Bactec MGIT 960 [29], или мето-

дом пропорций (для препаратов, критические концентрации для которых установлены только для этого метода [35]), или нитрат-редуктазным методом. Время получения данных о спектре лекарственной чувствительности возбудителя не должно превышать 6 недель с начала обследования. Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Рекомендация основывается на многочисленных публикациях об исследованиях лекарственной чувствительности, рекомендациях ВОЗ [23], многолетнем опыте исследований лекарственной чувствительности в мире, опыте членов рабочей группы.

Преимущества применения стандартизованных на уровне промышленного производства жидких сред с автоматической детекцией роста для исследования лекарственной чувствительности МБТ доказаны в многочисленных публикациях [29, 37–42]. Этот метод принят в мире как эталонный для определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза. Он позволяет значительно сократить время получения данных о спектре чувствительности возбудителя — до 14 дней, обеспечивая большую достоверность результатов, чем при применении приготовленных вручную сред. Однако высокая стоимость расходных материалов и реагентов заставляет определить эту рекомендацию как условную.

Применять метод абсолютных концентраций нецелесообразно, поскольку критические концентрации препаратов для этого метода не прошли валидации в мультицентровых исследованиях по утвержденному супранациональным лабораториями протоколу. Этот метод в модификации, используемой в нашей стране, дает значительные расхождения с методом Bactec MGIT 960 и методом пропорций, которыми пользуются в большинстве стран мира [37].

В настоящее время достоверные данные о лекарственной чувствительности молекулярно-генетическими методами удается получить не для всех препаратов. Так, МГМ позволяют определять лекарственную устойчивость с высокой по сравнению с бактериологическим методом чувствительностью только для изониазида (84%) и рифампицина (98%). Чувствительность МГМ для препаратов резервного ряда, для которых существуют методы выявления мутаций, приводящих к устойчивости к ним, значительно ниже. При этом специфичность исследования составляет 98–99% [17, 26–28]. Иными словами, при выявлении устойчивости к препаратам молекулярно-генетическими методами с вероятностью 98–99% эти результаты будут подтверждены и бактериологическими методами. Однако при невыявлении мута-

ций, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, канамицину, амикацину и капреомицину, вероятность выявления устойчивости бактериологическими методами высока.

Исследования лекарственной чувствительности бактериологическими методами также имеют ограничения. Так, для циклосерина возможно исследование только на среде Левенштейна–Йенсена методом пропорций (критические концентрации для этого препарата определены в мультицентровом исследовании по протоколу супранациональных лабораторий и приведены в рекомендациях ВОЗ только для этого метода). Для линезолида критические концентрации определены только для метода Bactec MGIT 960 [35]. Лекарственную чувствительность/устойчивость к препаратам резервного ряда следует определять только после выявления спектра лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда по клиническим показаниям, или при обнаружении МЛУ (или хотя бы устойчивости к рифампицину как индикатору МЛУ), или при определении полирезистентности. Исследования чувствительности к амикацину, фторхинолону и капреомицину в этих случаях проводятся обязательно, к другим резервным препаратам — при клинической необходимости и наличии валидированного метода исследования.

5. Если устойчивость к изониазиду или рифампицину дважды выявлена молекулярно-генетическими методами, исследования лекарственной чувствительности к этим препаратам не должны дублироваться методом посева. Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Рекомендация направлена на снижение стоимости комплекса этиологических исследований и основывается на опыте членов рабочей группы.

6. Если устойчивость к любому препарату выявлена любыми методами дважды, при дальнейших исследованиях лекарственной чувствительности образцов от этого пациента чувствительность к этим препаратам исследоваться не должна. Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.

Рекомендация направлена на снижение стоимости комплекса этиологических исследований и основывается на опыте членов рабочей группы.

4.4. Контроль эффективности химиотерапии

1. Этиологические исследования в целях контроля эффективности химиотерапии должны

применяться только для принятия клинических и организационных решений по ведению больного. Обследование больных на этапе лечения проводится в соответствии с клиническими рекомендациями по химиотерапии туберкулеза. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Рекомендация основана на анализе данных анкетирования лабораторий в рамках выполнения темы государственного задания, опыте членов рабочей группы, а также на анализе стоимости современных этиологических исследований. Рекомендация направлена на снижение стоимости комплекса этиологических исследований и основывается на опыте членов рабочей группы.

2. Для контроля эффективности химиотерапии должен проводиться комплекс контрольных исследований, включающий:

- микроскопическое исследование для выявления КУБ (два образца);
- посев в жидкие среды (из одного образца), в сроки, указанные в клинических рекомендациях по лечению туберкулеза. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Рекомендация основывается на рекомендациях ВОЗ с учетом клинических рекомендаций НАФ и РОФ по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания [43–45]. Применение ПЦР-РВ для контроля химиотерапии не рекомендовано, поскольку метод основан на выявлении ДНК микобактерий туберкулеза, потенциально связанной с нежизнеспособной бактерией [17]. Рабочая группа определила эту рекомендацию как сильную.

3. При выявлении МБТ на этапах химиотерапии должно быть проведено исследование лекарственной чувствительности возбудителя молекулярно-генетическим методом или методом посева в жидкие среды только к тем препаратам, к которым при предыдущем исследовании была сохранена чувствительность МБТ. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Рекомендация основывается на клинических рекомендациях по лечению туберкулеза НАФ и туберкулеза органов дыхания РОФ [43–45].

4. При выявлении устойчивости МБТ к препаратам, к которым в предыдущих тестах была определена чувствительность, проводится исследование новой порции диагностическо-

го материала МГМ и методом посева в жидкие среды с последующим подтверждением принадлежности выделенного возбудителя к МБТК и исследованием лекарственной чувствительности для подтверждения первого результата. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Рекомендация направлена на снижение стоимости комплекса этиологических исследований и основывается на опыте членов рабочей группы.

5. Если при проведении исследований на этапах лечения выявляется изменение спектра лекарственной чувствительности возбудителя по сравнению с результатами первого (предыдущего) обследования больного (появления устойчивости одновременно к двум и более препаратам), должно быть проведено эпидемиологическое расследование, в том числе, по возможности, сравнение генотипов штаммов, выделенных до начала лечения и приобретенных в процессе лечения. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Рекомендация направлена на выявление случаев нозокомиального туберкулеза. Публикаций, доказывающих эффективность такого подхода для обнаружения нозокомиального заражения, найти не удалось. Однако публикация исследований [46], подтверждающих существование таких случаев, заставляет членов рабочей группы определить эту рекомендацию как сильную.

6. При диспансерном наблюдении излечившихся больных этиологические обследования проводятся при появлении у них клинико-рентгенологических симптомов, позволяющих предположить рецидив заболевания. При диагностике рецидивов заболевания должны применяться алгоритмы обследования для пациентов с подозрением на туберкулез. *Уровень доказательности: С. Сила рекомендации: сильная рекомендация.*

Рекомендация основана на анализе данных анкетирования лабораторий в рамках выполнения темы государственного задания, данных отраслевой статистики по эффективности применения методов этиологической диагностики в Российской Федерации, а также на анализе стоимости современных этиологических исследований. Рекомендация направлена на снижение стоимости комплекса этиологических исследований и основывается на опыте членов рабочей группы.

Список литературы

1. Policy framework for implementing new tuberculosis diagnostics. Policy statement. — Geneva: World Health Organization, 2011. (Pre-publication copy March 2010). URL: http://www.who.int/tb/laboratory/whopolicy_framework_mar2011.pdf (дата обращения 23.09.2014).
2. WHO Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. — Geneva: World Health Organization, 2011. — update WHO/HTM/TB/2011.6. URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501583_eng.pdf (дата обращения 23.09.2014).
3. Полубенцева Е.И., Улумбекова Г.Э., Сайткулов К.И. Клинические рекомендации и индикаторы качества в системе управления качеством медицинской помощи: методические рекомендации. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 60 с.
4. Национальный стандарт Российской Федерации. Клинические рекомендации (протоколы лечения). Общие положения. ГОСТ Р 56034-2014. Дата введения — 01.06.2015. — Москва, Стандартинформ, 2014. — 45 с.
5. Основы доказательной медицины: учеб. пособие для системы послевузовского и дополнительного профессионального образования врачей / под общ. ред. Р. Г. Оганова. — М.: Силицей-Полиграф, 2010. — 136 с.
6. WHO handbook for guideline development. — World Health Organization, 2012. — 63 p.
7. Barksdale L., Kim K.S. Mycobacterium // *Bacteriol. Rev.* — 1977. — Vol. 41, N 1. — P. 217–372. <http://www.pubmedcentral.gov/pagerender.fcgi?artid=414000&pageindex=15> (дата обращения 15.03.2012).
8. Севастьянова Э.В., Голышевская В.И., Шульгина М.В. и др. Микробиологические методы диагностики туберкулеза: теоретич. учеб. пособие для проведения курсов обучения: «Выявление туберкулеза методом микроскопии» и «Культуральные методы диагностики туберкулеза». — Тверь: Триада, 2008. — 37 с.
9. Голышевская В.И., Егорова О.В. Севастьянова Э.В., Шульгина М.В. Люминесцентная микроскопия : учеб. пособие для проведения курсов обучения «Культуральные методы диагностики туберкулеза» и «Выявление туберкулеза методом микроскопии». — Тверь: Триада, 2008. — 36 с.
10. Ариэль Б.М., Ковальский Г.Б., Блюм Н.М., Беллендир Э.Н. Туберкулез (рабочие стандарты патологоанатомического исследования). — Библиотека патологоанатома. — 2009. — Вып. 101. — 80 с.
11. Carson F.L. *Histotechnology, a self-instructional text.* — Chicago: ASCP Press, 1997. — 304 p.
12. Методологические принципы организации цитологических и гистологических исследований : пособие. — СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2001. — 73 с.
13. Двораковская И.В., Акопов А.Л., Ариэль Б.М. и др. Биопсии в пульмонологии / под ред. проф. Г. Б. Ковальского. — Библиотека патологоанатома. Науч.-практич. журн. — Вып. 125. — СПб.: ГПАБ, 2011. — 72 с.
14. Зайратьянц О.В., Кактурский Л.В. Формулировка и составление клинического и патологоанатомического диагнозов : справочник. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицинское информационное агентство, 2011. — 576 с.
15. Патологическая анатомия: национальное руководство / под ред. М.А. Пальцева, Л.В. Кактурского, О.В.Зайратьянца. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 1264 с.
16. Zander D.S., Farver C.F. *Pulmonary Pathology.* — NY.: Churchill Livingstone Inc., 2008. — 837 p.
17. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: Policy update. — Geneva: World Health Organization, 2013. — WHO/HTM/TB/2013.16.
18. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: методич. указания (МУ1.3.2569-09). — М., 2009. — 45 с. URL: <http://75.rospotrebнадзор.ru/content/metodicheskie-ukazaniya-mu-132569-09-organizatsiya-raboty-laboratorii-ispolzuyushchikh-metod> (дата обращения 23.09.2014).
19. Соловьева Н.С., Оттен Т.Ф., Журавлев В.Ю. и др. Бактериологическая и молекулярно-генетическая верификация бактериемии у ВИЧ-инфицированных больных // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* — 2014. — Т. 16, № 3. — С. 248–253.
20. Grinsztejn B., Fandinho F.C., Veloso V.G. et al. Mycobacteremia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome // *Arch. Intern. Med.* — 1997. — Vol. 157, N 20. — P. 23–59.
21. Richter C., Cox L.F., Van-Leeuwen J.V. et al. Clinical significance of mycobacteremia in pulmonary tuberculosis // *eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 1996 — Vol. 15, N 10. — P. 813–817.
22. Waddell R.D., Lishimpi K., von Reyn C.F. et al. Bacteremia due to Mycobacterium tuberculosis or M. bovis, Bacille Calmette-Guérin (BCG) among HIV-positive children and adults in Zambia // *AIDS.* — 2001. — Vol. 15, N 1. — P. 55–60.
23. Культуральные методы диагностики туберкулеза: учеб. пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулезной службы / под ред. чл.-корр. РАН, проф. В. В. Ерохина. — Тверь: Триада, 2008. — 208 с.
24. Hanna B.A., Ebrahimzadeh A., Elliott L.B. et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 748–752.
25. Балабанова Я.М., Дробниевский Ф., Федорин И.М. и др. Оптимизация лабораторной диагностики туберкулеза с использованием современных бактериологических и молекулярно-биологических методов // *Проблемы туберкулеза и болезней легких* — 2011. — № 2. — С. 36–42.
26. Molecular lineprobe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Policy statement. — Geneva: World Health Organization, 2008.
27. Theron G., Peter J., Richardson M. et al. The diagnostic accuracy of the GenoType® MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Diagnostic tests accuracy review. — Editorial Group: Cochrane Infectious Diseases Group — Published online: 29 Oct 2014. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD010705.pub2/full> (дата обращения 23.09.2014).
28. Hilleman D., Rusch-Gerdes S., Richter E. et al. Feasibility of genotype MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobac-

- terium tuberculosis strains and clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* — 2009. — Vol. 47. — P. 1767–1772.
29. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. Summary of the report of the expert group meeting on the use of liquid culture media. — Geneva: World Health Organization, 2007. URL: www.who.int/entity/tb/dots/laboratory/ (дата обращения 23.09.2014).
30. Соловьева Н.С., Маничева О.А., Стеклова Л.Н. и др. Эффективность системы BACTEC MGIT 960 для исследования операционного материала больных туберкулезным спондилитом // *Клиническая лабораторная диагностика.* — 2013. — № 12. — С. 45–47.
31. Cruciani M., Scarparo C., Malena M. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42. — P. 2321–2325.
32. Hilleman D., Richter E. Use of the BACTEC mycobacteria growth indicator tube 96- automated system for recovery of mycobacteria from 9 558 extrapulmonary specimens, including urine samples // *J. Clin. Microbiol.* — 2006 — Vol. 44. — P. 4014–4017.
33. Wang D. Diagnosis of tuberculous vertebral osteomyelitis (TVO) in a developed country and literature review // *Spinal Cord.* — 2005. — Vol. 43. — P. 531–542.
34. Guidelines for intensified tuberculosis case finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource constrained settings. — Geneva: World Health Organization, 2011. URL: http://www.who.int/tb/publications/2012/tb_hiv_policy_9789241503006/en/ (дата обращения 23.09.2014).
35. Updated critical concentrations for first-line and second-line DST (as of May 2012) WHO-Stop TB Programme, Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. — Geneva: World Health Organization, 2008. WHO/HTM/TB/2008.392.
36. Инструкция по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза: прил. 11 // Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_100873/ (дата обращения 15.05.2013).
37. Shulgina M.V., Malakhov V.N., Hoffner S.E. et al. Proficiency assessment of *M. tuberculosis* drug susceptibility testing in the Russian Federation, 2005–2007 // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2009. — Vol. 13, N 10. — P. 1294–1300.
38. Rosales S., Pineda-Garcia L., Andino N. et al. Evaluation of the nitrate reductase assay for rapid detection of extensively drug-resistant tuberculosis // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2009. — Vol. 13, N 12. — P. 1542–1549.
39. Ruesch-Gerdes S., Pfyffer G.E., Casal M. et al. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* to classical second-line drugs and newer antimicrobials // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44, N 3 — P. 688–692.
40. Pfyffer G.E., Palicova F., Ruesch-Gerdes S. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40 — P. 1670–1674.
41. Ruesch-Gerdes S., Domehl C., Nardi G. et al. Multicenter evaluation of the mycobacterial growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37 — P. 45–48.
42. Scarparo C., Ricordi P., Ruggiero G., Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460 method // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42 — P. 1109–1114.
43. Клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания у взрослых. — Национальная ассоциация фтизиатров, 2013. — 68 с. URL: http://nasph.ru/index/tb_u_vzroslykh/0-68 (дата обращения 23.09.2014).
44. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания. — М., 2014. — 55 с. URL: http://roftb.ru/netcat_files/doks/protokol.pdf (дата обращения 23.09.2014).
45. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. — М., 2014. — 72 с. URL: http://roftb.ru/netcat_files/doks/protoko2.pdf (дата обращения 23.09.2014).
46. Мясникова Е.Б., Сагиева Н.Р., Журавлев В.Ю., Яблонский П.К. Нозокомиальная туберкулезная инфекция — обоснование концепции эпидемиологической диагностики // *Медицинский альянс.* — 2014. — № 1. — С. 6–18.