

## Tuberkuliozės mikrobiologinė diagnostika

### MICROBIOLOGICAL DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

ASTRA VITKAUSKIENĖ

LSMU MA Laboratorinės medicinos klinika

**Santrauka.** Svarbiausias tuberkuliozės diagnostikos kriterijus yra *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) padermių ir jų atsparumo prieštuberkulioziniais vaistams nustatymas. Sėkmingam mikobakterijų išskyrimui iš tiriamosios medžiagos didelę reikšmę pirmiausia turi tinkamas mėginių paėmimas, saugojimas ir gabenimas. Mikroskopija negali pakeisti mikrokultūrų auginimo metodo, tačiau tai veiksmingas ir nebrangus būdas nustatyti visuomenei pavojingus užkrečiamus asmenis bei gydyti veiksmingumui stebėti. Fluorescencinis dažymo būdas dažniausiai naudojamas kaip atrankinis metodas nustatyti rūgščiai atsparioms bakterijoms (RAB). Visi tepinėliai, kuriuose matomas švytėjimas, turi būti papildomai dažomi modifikuotu Cylio-Nilseno būdu. Mikobakterijų auginimui tinkamos standžiosios arba skystosios mitybos terpės. Skystosiose mitybos terpėse mikobakterijos auga geriau ir greičiau – mikobakterijų augimas dažniausiai matomas per dvi savaites, o standžiosiose mitybos terpėse tik per 3–6 savaites. Nukleorūgščių amplifikacijos metodu galima nustatyti *M. tuberculosis* komplekso ir daugelį atipinių mikobakterijų tiesiogiai iš apuoštos tiriamosios medžiagos per keletą valandų, kaip ir atsparumą rifampicinui ir izoniazidui, kurį lemia genų mutacijos. Mikobakterijų identifikacijai iš kultūros naudojamas skystosios chromatografijos metodas, kuris remiasi mikobakterijų ląstelės sienelės riebiųjų rūgščių analize. Nors fenotipiniai *M. tuberculosis* metodai vis dar išlieka auksiniu standartu, vis labiau populiarėja genotipo nustatymo metodai arba nukleorūgščių amplifikacija ir deoksiribonukleorūgščių (DNR) sekvenavimas bei restriktinė fermentų analizė. *M. tuberculosis* komplekso mikobakterijų atsparumo prieštuberkulioziniais vaistams nustatymas ir rezultatų interpretavimas vykdomas remiantis galiojančiais tarptautiniais standartais (angl. *The national Committee for Clinical Laboratory Standards*).

**Reikšminiai žodžiai:** *Mycobacterium tuberculosis*, rūgščiai atsparios bakterijos, mitybos terpės, nukleorūgščių amplifikacija, atsparumo prieštuberkulioziniais vaistams tyrimas.

**Summary.** The most important criterion for the diagnosis of tuberculosis is the identification of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) strains and their resistance to antituberculosis drugs. Proper sample collection, storage and transportation are of great importance for the successful isolation of mycobacteria from the test material. Microscopy cannot replace the culture method, but it is an effective and inexpensive way to identify infectious individuals dangerous to the public and to monitor the effectiveness of treatment. The fluorescent staining method is usually used as a selective method to determine RAB, all smears in which the glow is visible must be additionally stained by the modified Cylio-Nilsen method. Solid or liquid nutrient media are suitable for growing mycobacteria. In liquid nutritional media, mycobacteria grow better and faster – the growth of mycobacteria is usually seen within two weeks, while in solid nutritional media, it takes only 3–6 weeks. Nucleic acid amplification can detect *M. tuberculosis* complex and many atypical mycobacteria directly from prepared test material within hours, as can resistance to rifampicin and isoniazid caused by gene mutations. For the identification of mycobacteria from the culture, the liquid chromatography method is used, which is based on the analysis of the fatty acids of the mycobacterial cell wall. Although phenotypic methods for *M. tuberculosis* still remain the gold standard, genotyping methods or nucleic acid amplification and deoxyribonucleic acid (DNA) sequencing and restriction enzyme analysis are becoming increasingly popular. Determination of the resistance of mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex to antituberculosis drugs and the interpretation of the results is carried out based on valid international standards.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, acid-fast bacteria, culture media, nucleic acid amplification, anti-tuberculosis drug resistance testing.

DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.1157>

### ĮVADAS

Svarbiausias tuberkuliozės diagnostikos kriterijus yra *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) padermių ir jų atsparumo prieštuberkulioziniais vaistams nustatymas. Laboratoriniai tuberkuliozės tyrimai apima tipiškus mikrobiologinės diagnostikos metodus (mikroskopinis, pasėlis ant standžiųjų arba skystųjų terpių su sukėlėjo identifikavimu, atsparumo antibiotikams

nustatymas), imunologinius metodus (imunofermen-tinis, tuberkulino odos testas, gama interferono nustatymas) ir naujus molekulinės diagnostikos metodus.

### MĖGINIŲ PAĖMIMAS, LAIKYMAS IR GABENIMAS

Mikobakterijos gali sukelti ligą įvairiose organizmo sistemose, todėl imami ir tiriami skirtingi mėginiai. Sėkmingam mikobakterijų išskyrimui iš tiriamosios

# Pulmonologija ir alergologija

medžiagos didelę reikšmę turi tinkamas mėginių paėmimas, saugojimas ir gabenimas. Laboratorijos tyrimų rezultatai tiesiogiai priklauso nuo mėginių kokybės. Teisingai surinkti, pažymėti, laiku pristatyti ir tinkamai saugomi mėginiai padeda diagnozuoti tuberkuliozę. Įtariant plaučių tuberkuliozę, trys skreplių mėginiai surenkami per 8–24 val. į skirtingus mėgintuvėlius. Geriausiai tinkami skrepliai, kurie surinkti anksti ryte. Skrandžio išplovų mėginiai turi būti tuoj pat gabenami į laboratoriją. Jei mėginio gabenimas užtrunka ilgiau nei 1 val., reikia neutralizuoti su 100 mg natrio karbonatu, nes mikobakterijos skrandžio išplovose greitai žūva. Gabenant audinio gabalėlį steriliame mėgintuvėlyje, reikia įpilti 2–3 ml sterilaus fiziologinio tirpalo.

Laboratorijoje vertinama mėginio kokybė. Netinkami mėginiai, jei:

- 1) per mažas mėginio kiekis;
- 2) mėginyje vyrauja seilės, imant skreplius;
- 3) sausas tamponėlis (jei nėra sekreto, reikia imti biopsiją);
- 4) pažeistas indelis su mėginiu;
- 5) mėginys paimtas vėliau kaip prieš 7 d.;
- 6) keli skreplių arba šlapimo mėginiai viename indelyje.

## RŪGŠČIAI ATSPARIŲ BAKTERIJŲ DIAGNOSTIKA MIKROSKOPINIŲ METODŲ

Įtariant plaučių tuberkuliozės formą, mikroskopiniam tyrimui rekomenduojama imti ne daugiau kaip tris skreplių mėginius. Skreplių mikroskopijos jautrumas svyruoja nuo 22 iki 80 proc., lyginant su pasėlio metodu. Metodo jautrumas priklauso nuo ligos pažeidimo lokalizacijos ir tipo, tinkamo tiriamosios medžiagos surinkimo, jos kiekio, mikobakterijų rūšies, dažymo technikos, laboratorijos darbuotojų patirties. Mikroskopuojant, mikobakterijos jau matomos, jei jų kiekis 1 ml tiriamosios medžiagos yra bent  $5 \times 10^3$  kolonijas sudarančių vienetų (KSV). Tiesioginės skreplių mikroskopijos metodo specifiskumas – daugiau kaip 98 proc. Mikroskopija negali pakeisti pasėlio metodo, tačiau tai yra veiksmingas ir nebrangus būdas nustatyti visuomenei pavojingus užkrečiamus asmenis bei gydymo veiksmingumui stebėti.

Skreplių mikroskopinio tyrimo metodo privalumai:

- nebrangus, paprastas metodas;
- sąlyginai lengvai atliekamas;
- rezultatus galima pateikti maksimaliai greitai.

Skreplių mikroskopinio tyrimo metodo jautrumas žemas, kai:

- įtariamą kitos lokalizacijos tuberkuliozinis procesas (ne plaučiuose);
- tuberkuliozė vaikų amžiuje;
- infekciją sukelia kitos mikobakterijų rūšys.

Šlapimo mėginiai nemikroskopuojami, mikobakterijų aptikimui šlapime naudojamas pasėlio metodas.

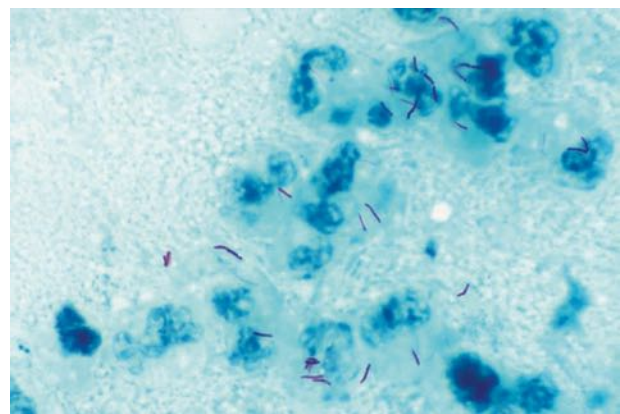
## DAŽYMAS MODIFIKUOTU CYLIO-NILSENO BŪDU

Modifikuotas šaltas Cylio-Nilseno dažymo būdas naudojamas nustatyti rūgščiai atsparioms bakterijoms (RAB). Pirmame dažymo etape visos bakterijos nusidažo raudonai. Blukinant tepinėlį, rūgščiai neatsparios bakterijos išblunka ir, dažant malachito žaluma, nusidažo mėlynai. Blukinant preparatą, RAB nepraranda raudonos spalvos. Todėl, mikroskopuojant tepinėlį, RAB matomos raudonos spalvos, kitos bakterijos – mėlynos spalvos, o regėjimo laukas – žalsvai melsvas (1 pav.).

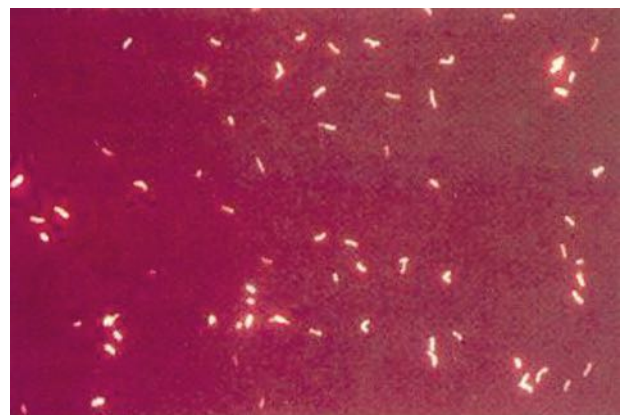
## DAŽYMAS FLUORESCENCINIŲ BŪDU

Fluorescencinis dažymo būdas dažniausiai naudojamas kaip atrankinis metodas nustatyti RAB. Fluorochromai susijungia su mikobakterijų mukolitine rūgštimi ir nenusiplauna, blukinant rūgštimi – alkoholiu (HCl-izopropanoliu). RAB nusidažo raudonai oranžine arba geltona spalva (priklausomai nuo fluorescencinio mikroskopo filtrų kombinacijos) ir, mikroskopuojant tamsiame fone, stebimas jų švytėjimas. Kitos bakterijos fluorochrominiais dažais nenusidažo (2 pav.).

Mikroskopijos metu reikia peržiūrėti mažiausiai 300 regėjimo laukų, jei tepinėlyje RAB nerandama, ir 100 regėjimo laukų, jei randama 1+ RAB. Jeigu tepinėlyje



1 pav. Tepinėlis, dažytas modifikuotu Cylio-Nilseno būdu



2 pav. Tepinėlis, dažytas fluorescenciniu būdu

matoma nuo 2+ iki 4+ RAB, užtenka peržiūrėti keletą regėjimo laukų.

## DAŽYTŲ TEPINĖLIŲ VERTINIMAS

Fluorescencinis dažymo būdas yra atrankinis metodas nustatyti RAB, todėl visi tepinėliai, kuriuose matomas švytėjimas, turėtų būti papildomai dažomi modifikuotu Cylio-Nilseno būdu (1 lentelė).

## MIKOBakterijų DIAGNOSTIKA PASĖLIO METODU

Įtariant tuberkuliozę, tiriamąją medžiagą pasėliui rekomenduojama paimti prieš pradėdant gydymą prieštuberkulioziniais vaistais. Mikobakterijoms auginti tinkamos įvairios mitybos terpės, kurios skirstomos į standžiasias ir skystąsias. Skystosiose mitybos terpėse mikobakterijos auga geriau ir greičiau – mikobakterijų augimas dažniausiai matomas per dvi savaites, o standžiosiose mitybos terpėse – tik per 3–6 savaites. Visais atvejais, kai įmanoma, tiriamąją medžiagą rekomenduojama sėti į skystąją mitybos terpę. Mikobakterijų išskyrimas maksimaliai pagerėja, jei kartu sėjama ir į standžiąją mitybos terpę. Tuomet galima įvertinti kolonijų morfologiją arba mišrią mikobakterijų kultūrą, kas neįmanoma skystojoje terpėje.

CLSI (angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Klinikinių ir laboratorijos standartų institutas) rekomenduoja tiriamąją medžiagą sėti į skystąją mitybos terpę, kai:

- paimta iš ekstrapulmoninio židinio;
- skrepliai, paimti prieštuberkuliozinį gydymą gaunantiems pacientams, kai liga nebuvo patvirtinta;
- paimta invaziniu būdu (bronchų išplovos, bronchų alveolinis lavažas, smegenų skystis, pleuros arba perikardo punktai, sąnarinis arba peritoninis skystis, bioptatai, medžiaga iš kaulo ertmių).

## MIKOBakterijų AUGINIMAS STANDŽIOSIOSE MITYBOS TERPĖSE

Tiriamoji medžiaga sėjama į pasirinktą standžiąją mitybos terpę. Šiuo metu plačiausiai naudojamos kiaušinio pagrindo Levenšteino-Jenseno (angl. *Lowenstein-Jensen*) ir agarų pagrindo Middlebrook 7H10 ir 7H11 standžiosios terpės.

Levenšteino-Jenseno terpė selektyvi, jos sudėtyje yra malachito žaliasis, kuris slopina kitų nespecifinių bakterijų ir grybų augimą. Kiaušinio pagrindo terpėse gerai auga *M. tuberculosis* komplekso bakterijos ir dauguma kitų mikobakterijų, bet tai nėra optimalios terpės *Mycobacterium avium* (*M. avium*) auginimui.

1 lentelė. Tepinėlių vertinimo kriterijai, rekomenduojami CDC ir CLSI

Dažyta Cylio-Nilseno būdu	Dažyta fluorescenciniu būdu (x450)	Vertinimas
Rastų RAB skaičius / regėjimo laukų skaičius		
0 / 300	0 / 300	RAB nerasta
1–2 / 300*	1–2 / 70*	Abejotinas, tyrimą reikia kartoti*
1–9 / 100	2–18 / 50	RAB rasta (1+)
1–9 / 10	4–36 / 10	RAB rasta (2+)
1–9 / 1	4–36 / 1	RAB rasta (3+)
> 9 / 1	> 36 / 1	RAB rasta (4+)

RAB – rūgščiai atsparios bakterijos, CDC – angl. *Centers for Disease Control and Prevention*, Ligų kontrolės ir prevencijos centrai; CLSI – angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Klinikinių ir laboratorijos standartų institutas.

\*visame tepinėlyje randamos tik 1–2 RAB, turi būti dažomos ir tiriamas kitas to paties mėginio tepinėlis. Gavus tą patį rezultatą, tyrimą reikia kartoti iš kito mėginio.

2 lentelė. Mikobakterijų kolonijų augimo kietoje terpėje gausumo vertinimas

Kolonijų skaičius	Vertinimas
Nėra kolonijų	Mikobakterijos neišaugo
< 50 kolonijų	Nurodomas kolonijų skaičius
50–100 kolonijų	1+
100–200 kolonijų	2+
200–500 kolonijų	3+
> 500 kolonijų	4+

3 lentelė. Mikobakterijų kolonijų išaugimo greitis, spalva ir morfologija.

Lėtai auga (> 7 d.)				Greitai auga (≤ 7 d.)
<i>M. tuberculosis</i> kompleksas	Fotochromogeninės mikobakterijos (gamina pigmentą tik šviesoje)	Skotochromogeninės mikobakterijos (gamina pigmentą ir tamsoje)	Nechromogeninės (negamina pigmento)	–
Kolonijos grublėtos, sausos	Kolonijos grublėtos arba glotnios	Kolonijos grublėtos arba glotnios	Kolonijos grublėtos arba glotnios	Greitai augančios
Tepinėlyje mikobakterijos yra išsidėsčiusios kasomis	Kolonijų pigmentas nuo tamsiai geltonos iki citrinos spalvos geltonumo, kai būna šviesoje	Kolonijos nuo geltonos iki oranžinės spalvos, kai auga tamsoje	Kolonijos gali būti blyškiai gelsvos arba rusvos, bet spalva nekinta šviesoje	–

Agarų pagrindo Middlebrook 7H10 ir 7H11 standžiosios terpės ypač patogios naudoti, nustatant mikobakterijų atsparumą prieštuberkulioziniais vaistais, nes dėl didesnio ploto lengviau galima vertinti atsparių mikobakterijų dalį. Middlebrook 7H11 terpės geresnės ir dažniau naudojamos, nes jų sudėtyje yra kazeino hidrolizato, kuris padeda augti retoms ir izoniazidui atsparioms *M. tuberculosis* padermėms.

## MIKOBakterijų AUGINIMAS SKYSTOSIOSE TERPĖSE AUTOMATIZUOTOSE SISTEMOSE

Metodo privalumai, lyginant su auginimu ant standžiųjų terpių:

- greičiau gaunami rezultatai;
- terpės aukštesnės kokybės, todėl mikobakterijos



# Pulmonologija ir alergologija

auga geriau, kai kurios mikobakterijų rūšys auga tik skystosiose terpėse;

- sistema automatizuota;
- sistema saugesnė, nes naudojami plastikiniai mėgintuvėliai.

Metodo trūkumai:

- tiriamosios medžiagos nukenksminimui galima naudoti tik NaOH – NALC;
- didesnė pasėlio užkrėtimo nespecifine mikroflora rizika;
- tyrimas brangesnis;
- priklausomybė nuo gamintojo.

Šiuo metu mikobakterijų auginimui ir atsparumo prieštuberkulioziniam vaistams nustatymui dažniausiai naudojamos dvi neradiometrinės automatizuotos sistemos. Bactec MGIT 960 sistema (paremta fluorescencijos matavimu) ir BacT/Alert sistema (paremta kolorimetrijos matavimu).

Iš mėgintuvėlių, kuriuose nustatomas augimo lygmuo, toliau atliekami identifikacijos testai, kad atskirti *M. tuberculosis* mikobakterijas nuo atipinių mikobakterijų.

## **M. TUBERCULOSIS KOMPLEKSO MIKOBakterijų NUSTATYMAS TIRIAMOJE MEDŽIAGOJE NUKLEORŪGŠČIŲ AMPLIFIKACIJOS METODU**

Tiesioginis *M. tuberculosis* komplekso ir atipinių mikobakterijų nustatymas tiriamojoje medžiagoje leidžia labai greitai, t. y. per parą, diagnozuoti ligą ir pradėti gydyti pacientus. Nukleorūgščių amplifikacijos metodu galima nustatyti *M. tuberculosis* komplekso ir daugelį atipinių mikobakterijų tiesiogiai iš paruoštos tiriamosios medžiagos per keletą valandų. Taip pat tiesiogiai iš tiriamosios medžiagos galima nustatyti *M. tuberculosis* padermių atsparumą rifampicinui ir izoniazidui, kurį lemia genų mutacijos. Tačiau šis metodas nepakeičia kultūrų auginimo ir atsparumo prieštuberkulioziniam vaistams nustatymo, kuris vidutiniškai trunka aštuonias savaites.

Pagrindiniai nukleorūgščių amplifikacijos metodo privalumai:

- labai greitas ligos sukėlėjo nustatymas;
- didelis tyrimo jautrumas ir specifiškumas, kuris leidžia daliai pacientų, kuriems mikroskopinio tyrimo metu RAB nerasta, diagnozuoti ligą, ypač esant ekstrapulmoniniams židiniams ir imant tiriamąją medžiagą iš sterilių ertmių (pleuros, ascito punkto arba kt.).

Pagrindiniai nukleorūgščių amplifikacijos metodo trūkumai:

- nėra visiškai automatizuotas;
- reikalingos specialios patalpos ir aparatūra;
- galimi klaidingai teigiami ir neigiami rezultatai, todėl kartu reikia atlikti ir mikobakterijų auginimo metodą. Tyrimo atsakymo rezultatus reikia

interpretuoti, lyginant su klinicine ligos išraiška ir pasėlio metodu gautais rezultatais;

- nėra tinkamas gydymo veiksmingumui vertinti, nes nukleorūgštis galima nustatyti ir gydymo metu (kai mikobakterijos jau negyvybingos).

Nukleorūgščių amplifikacijos metodu tinkamiausia tiriamoji medžiaga ta, kuri paimta dar negydytiems pacientams iš apatinių kvėpavimo takų (skrepliai, bronchoalveolinis lavažas, bronchų išplovos, trachėjos aspiratas). Jei *M. tuberculosis* nukleorūgščių amplifikacijos metodu nerandama, dar negalima atmesti tuberkuliozės diagnozės. Tik išauginus *M. tuberculosis* padermes pasėlio metodu bei paciento klinikinis atsakas į gydymą leidžia patvirtinti arba atmesti tuberkuliozės diagnozę. Nors šis tyrimo metodas greitas ir tikslus, tačiau jo plataus panaudojimo galimybes riboja aukšta kaina. Nukleorūgščių amplifikacijos metodu ištirti tiriamąją medžiagą rekomenduojama diagnozuojant tuberkuliozę visiems naujai susirgusiems pacientams, kai mikroskopinio tyrimo metu rasta RAB, bei pacientams su didele tuberkuliozės rizika ir atitinkama klinicine ligos išraiška.

Šiuo metu nukleorūgštims nustatyti naudojami komerciniai *M. tuberculosis* diagnostikos metodai:

- polimerazės grandininės reakcijos metodas (genetinis taikiny – citozino deoksiribonukleorūgščių (DNR) metiltransferazė);
- nukleorūgšties sekomis pagrįsta amplifikacija – NASBA (angl. *Nucleic acid sequence based amplification*; genetinis taikiny – 16S rRNR genas);
- sekos pakeitimo amplifikacija – SPA (angl. *strand displacement amplification*; genetinis taikiny – *pivNG* genas).

## **MIKOBakterijų IDENTIFIKAVIMO METODAI**

Kliniškai labai svarbu atskirti *M. tuberculosis* komplekso mikobakterijas nuo kitų ne *M. tuberculosis* mikobakterijų. Kompleksui priklauso *M. tuberculosis*, *M. bovis spp. bovis*, *M. bovis spp. caprae*, *M. bovis spp. BCG*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. pinipedii*. Fenotipinių savybių nustatymas, kuomet vertinamas mikobakterijų augimo greitis, išaugusių mikobakterijų kolonijų morfologija, pigmentas ir mikroskopinis vaizdas, yra svarbus identifikavimui ir vis dar išlieka auksiniu standartu, tačiau būtini papildomi metodai. Niacino testą (visos mikobakterijos gamina nikotininę rūgštį (niaciną), dalyvaujančią oksidacijos-redukcijos reakcijose) – mikobakterijų gebėjimą redukuoti nitratą, fermento, kuris katalizuoja vandenilio peroksido skilimą į vandenį ir deguonį, nustatymą pakeitė naujesni instrumentiniai metodai.

## **SKYSTOSIOS CHROMATOGRAFIJOS METODAS**

Tai tyrimo metodas, kai atliekama mikobakterijų ląstelės sienos riebiųjų rūgščių analizė. Tik nedaugelis mikroorganizmų savo ląstelės sienoje turi riebiųjų rūgš-

čių ir tai leidžia identifikuoti daugelį mikobakterijų iki rūšies. Šis metodas yra brangus, jam reikalinga speciali įranga, bet labai greitas (turint išaugintą kultūrą, rezultatas gaunamas mažiau nei per 2 val.), identifikaciją galima atlikti ir tiesiogiai iš tiriamosios medžiagos.

Pagrindiniai metodo atlikimo etapai:

- mikolinės rūgšties ekstrakcija iš mikobakterijos ląstelės sienos;
- mikolinės rūgšties virtimas į ultravioletinius (UV) arba fluorescenciją sugeriančius esterius;
- chromatografija;
- rezultato vertinimas.

## MIKOBakterijų GENOTIPO NUSTATYMO METODAI

Fenotipiniai *M. tuberculosis* metodai vis dar išlieka auksiniu standartu, tačiau vis labiau populiarėja genotipo nustatymo metodai. Kadangi atrandama vis daugiau mikobakterijų rūšių, kurioms būdingos labai panašios fenotipinės savybės, tai labai apsunkina identifikaciją fenotipiniais metodais.

### Hibridizacijos metodai

Iškiriami du hibridizacijos metodai:

- **Hibridizacija tirpale.** Tiriamoji medžiaga – RAB kolonijos, išaugusios ant kietųjų terpių arba skystojoje terpėje. Lizuojant mikobakterijas, atliekama nukleorūgščių ekstrakcija. Į mišinį pridedama žymėta RNR ir inkubuojama. Nehibridizuoti žymenys išplaunami, o DNR-RNR hibridai nustatomi cheminės liuminescencijos būdu. Šiuo metodu galima nustatyti šias mikobakterijų rūšis:
  - 1) *M. tuberculosis* kompleksą;
  - 2) *M. avium* kompleksą;
  - 3) *M. kansasii*;
  - 4) *M. gordonae*.
- **Atvirkštinei hibridizacijai** atlikti naudojamos nitroceliuliozės juostelės, ant kurių pritvirtinti žymėti specifiniai žymenys. Jei tiriamajame mišinyje yra specifinių žymenų atitikmuo, jie susijungia ir juostelė pakeičia spalvą. Priklausomai nuo gamintojo, šiuo metodu galima nustatyti iki 16 mikobakterijų rūšių.

### Nukleorūgščių amplifikacija ir DNR sekvenavimas bei restriktinė fermentų analizė

Tiriamoji medžiaga – RAB kolonijos, išaugusios ant kietųjų terpių arba skystojoje terpėje. Pradžioje nukleorūgštys padauginamos amplifikacijos metodu, vėliau atliekamas DNR sekvenavimas. Šiuo metodu galima nustatyti visas mikobakterijų rūšis.

### Mikobakterijų atsparumo prieštuberkulioziniam vaistams nustatymas

Atsparumas vaistams turi būti nustatomas mikobakterijų padermėms, kurios išauga iš tiriamosios

medžiagos pirmą kartą pacientui diagnozavus ligą, jei mikobakterijos dar išauga po 3 mėn. nuo gydymo pradžios ir jei kliniškai nėra atsako į skiriamą gydymą.

### *M. tuberculosis* komplekso mikobakterijų atsparumo prieštuberkulioziniam vaistams nustatymas ant standžiųjų mitybos terpių proporcijos metodu

Dažniausiai naudojamos terpės: Levenšteino-Jenseno ir Middlerbrook 7H10. Paruošiamos terpės su skirtingomis prieštuberkuliozinių vaistų, slopinamųjų mikobakterijų augimą, koncentracijomis. Mikobakterijos geriau auga ant agaro pagrindo terpių, lyginant su kiaušinio pagrindo terpėmis, todėl antibiotikams atsparių padermių procentą lengviau nustatyti atliekant tyrimą ant agaro pagrindo (Middlerbrook 7H10) terpių.

Paruošiamos Middlebrook 7H10 agaro su OADC priedu terpės su reikiamos koncentracijos prieštuberkulioziniais vaistais, ant kurių išsėjamos išaugusios *M. tuberculosis* bakterijų kultūros. Vaistui jautrių mikobakterijų padermių augimas slopinamas. Jei mikobakterijos yra atsparios prieštuberkulioziniam vaistui, augimas neslopinimas arba slopinamas nežymiai ir terpėje matomas mikobakterijų kolonijų augimas. *M. tuberculosis* kultūra laikoma atsparia, jei yra > 1 proc. mikobakterijų, atsparių tiriamam vaistui, lyginant su mikobakterijų kultūros augimu terpėje be vaisto. Rezultatai vertinami po trijų savaičių.

### *M. tuberculosis* komplekso mikobakterijų atsparumo prieštuberkulioziniam vaistams nustatymas skystosiose terpėse

Metodo privalumai, lyginant su atsparumo nustatymu ant standžiųjų mitybos terpių:

- greičiau gaunami rezultatai;
- terpės aukštesnės kokybės;
- sistema automatizuota;
- testuoja I, II eilės bei naujus prieštuberkuliozinius vaistus;
- saugesnė, nes naudojami plastikiniai mėgintuvėliai.

Metodo trūkumai:

- brangesnis;
- didesnė užkrėtimo nespecifine mikroflora rizika;
- yra priklausomybė nuo gamintojo;
- negalima nustatyti atsparumo cikloserinui.

Į skystąją terpę pridėjus atitinkamos koncentracijos prieštuberkuliozinio vaisto, *M. tuberculosis* padermių augimas slopinamas, todėl sunaudojamas mažas deguonies kiekis, o junginio fluorescencija užslopinama. Jei *M. tuberculosis* padermės atsparios prieštuberkulioziniam vaistui, jų augimas neslopinamas, sunaudojamas O<sub>2</sub> ir stebimas fluorescencijos didėjimas – fik-

# Pulmonologija ir alergologija

suojamas augimo lygmuo. *M. tuberculosis* padermių kultūra laikoma atsparia, jei yra > 1 proc. bakterijų, atsparių tiriamam vaistui.

Siekiant nustatyti 1 proc. atsparumo proporciją, tiriami kultūra su prieštuberkulioziniu vaistu lyginama su kontroliniu mėginiu, kuris yra 100 kartų praskiestas. Lėtai augančių vaistams atsparių padermių augimas gali trukti ilgiau ir rezultatai gaunami vėliau nei per 13 d., o pirazinamidui daugiau nei per 21 d. arba augimo nestebima, rezultatai nevertinami ir tyrimas kartojamas.

## Kryžminis atsparumas tarp prieštuberkuliozinių vaistų

- Streptomycinui atsparios *M. tuberculosis* padermės dažniausiai gali būti jautrios amikacinui, kanamicinui ir kapreomicinui.
- Nustatytas kryžminis atsparumas tarp kanamicino ir amikacino.
- Nėra nustatyta kryžminio atsparumo tarp kanamicino ir kapreomicino bei tarp amikacino ir kapreomicino.

## APIBENDRINIMAS

Kiekvienas straipsnyje aptartas metodas yra svarbus ir turi savo pritaikymo vietą, priklausomai nuo keliamų diagnostikos arba gydymo tikslų *M. tuberculosis* identifikuoti, diagnozei patvirtinti arba gydymo veiksmingumui įvertinti.

## LITERATŪRA

1. **European Centre for Disease Prevention and Control.** Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union. Stockholm: ECDC; Updated 2018.
2. **Same-day diagnosis of tuberculosis by microscopy: policy statement.** World Health Organization, 2011.
3. **The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line antituberculosis drugs.** World Health Organization, 2016.
4. **Sosa LE, Njie GJ, Lobato MN, Bamrah Morris S, Buchta W, Casey ML, et al.** Tuberculosis screening, testing, and treatment of U.S. health care personnel: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC, 2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2019; 68(19): 439-43.
6. **WHO operational handbook on tuberculosis.** Module 3: Diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organisation; 2021 update. Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. **WHO Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis.** 2018.24. ISBN 978-92-4-151484-2.