

Mükobakter-infektsioonide, s.h tuberkuloosi uuringud

Mükobakterioloogia osakond

Perekonda *Mycobacterium* kuulub nii kindlaid patogeene, nagu tuberkuloositekitajad (*M. tuberculosis*, *M. bovis* ja *M. africanum*) ning pidalitõve tekitaja (*M. leprae*), kui ka potentsiaalselt patogeenseid mükobaktereid, nagu *M. avium* kompleks, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. malmoense* ja väga paljud teised. Potentsiaalselt patogeensed mükobakterid on looduses laialdaselt levinud (pinnases, tolmus, jõgede ja järvede vees, kanalisatsioonisüsteemis, basseinides, akvaariumides jne), kuid infektsiooni põhjustavad nad vaid immuunpuudulikkusega isikutel.

Selleks, et neid infektsioone korrektselt diagnoosida, tuleb kõik haigustekitajad isoleerida ja samastada.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

Mükobakterite suhtes on võimalik uurida kõiki kehavedelikke, eriti ning kudesid.

RÖGA

Näidustused: kopsutuberkuloosi, kopsude mükobakterioosi kahtlus, ravi efektiivsuse hindamine.

Proov võetakse hommikul. Enne proovivõttu peab patsient mõned korrad loputama suud keedetud või steriliseeritud veega ja seejärel jõuliselt köhima, et saada röga sügavalt hingamisteedest. Sülg uuritavaks materjaliks ei kõlba!

Kuna tuberkuloositekitajad erituvad haiguskoldest ebaregulaarselt, tuleb proove võtta vähemalt kahel järjestikusel päeval.

Proovinõu	Proovitops või steriilne koonuspõhjaga katsuti, 50 mL
Materjali kogus	3–8 mL

BRONHIASPIRAAT

Näidustused: kopsutuberkuloosi või kopsude mükobakterioosi kahtlus, kuid rögaeritus puudub.

Fiberbronhoskoobi abil tehakse BAL (bronhoalveolaar-lavaaž) või olulise kopsuosa selektiivne loputamine 5–10 mL füsioloogilise keedusoolalahusega.

NB! Peale bronhoskoopiat võib patsiendil rögaeritus oluliselt suurenedada ning ka röga mikroskoopiline uurimine anda positiivse tulemuse. Seega on soovitatav peale bronhoskoopiat kindlasti saata uuringuks ka rögaproov.

Proovinõu	Steriilne koonuspõhjaga katsuti, 50 mL
Materjali kogus	10–25 mL

MAOLOPUTUSVEDELIK

Näidustused: kopsutuberkuloosi kahtlus, kuid patsiendil rögaeritus puudub ning bronhoskoopiat pole võimalik teha meditsiinilistel vastunäidustustel või muudel põhjustel.

Maoloputus viiakse läbi statsionaaris. Patsiendile antakse proovi võtmise hommikul juua 200–300 mL keedetud või steriliseeritud vett. Maosondi välimine ots pannakse steriilsesse pudelisse, samal ajal viiakse sond makku, lastes patsiendil korduvalt

neelata. Vedelik peab maost minema pudelisse tänu kõhulihaste pingutamisele. Kui vedelikku spontaanselt ei tule, võib seda ka süstlaga aspireerida. Maoloputust tuleb teha 2–3 erineval päeval, see tagab suurema tõenäosuse olemasolevate mükobakterite leiuks.

Proovinõu	Steriilne koonuspõhjaga katsuti, 50 mL; vajadusel mitu
Materjali kogus	Kogu kättesaadav vedeliku hulk, tavaliselt on seda 1/3–2/3 allaneelatud veest. NB! Kuna maoloputusvedeliku happeline keskkond mõjutab mükobakterite eluiga, on eriti oluline, et materjali säilitamise ning transportimise aeg oleks võimalikult lühike.

PLEURA-, LIIGESE- jt PUNKTAADID

Näidustused: tuberkuloosse pleuriidi, -sünoviidi jms kahtlus.

Punktaatide bakterioloogiline uurimine suurendab tunduvalt õige diagnoosi tõenäosust.

Proovinõu	Steriilne koonuspõhjaga katsuti, 50mL; suuremate materjalikoguste korral mitu katsutit. Materjali hüübimise vältimiseks võib lisada hepariini.
Materjali kogus	Pleuravedelik: soovitatavalt 50–200 mL. Liigesevedelik jt punktaadid: kogu kättesaadav vedelikuhulk.

SEKREEDID

Näidustused: tuberkuloosi, mükobakterioosi kahtlus.

Sekreetide kogumisel tuleb eelistada süstlaga aspireerimist. Juhul, kui sekreeti on vähesuse tõttu võimalik koguda vaid vatitampooni abil, saadetakse uuringuks sekreediga immutatud tampoon, asetatuna füsioloogilisse lahusesse steriilses katsutis.

Proovinõu	Steriilne lisandita katsuti, süstal
Materjali kogus	Kogu kättesaadav materjal

LIIKVOR

Näidustused: tuberkuloosse meningiidi või generaliseerunud tuberkuloosi (mükobakterioosi) kahtlus.

Proovinõu	Steriilne lisandita katsuti
Materjali hulk	3–8 mL, väiksemad kogused halvendavad diagnostilisi võimalusi

VEENIVERI, LUUÜDI

Näidustused: generaliseerunud mükobakterioosi, miliaarse tuberkuloosi kahtlus.

Veenivere võtmine näidustatud AIDSi kahtlusega või AIDSi haigetel patsientidel.

Proovinõu	Materjal võetakse süstlasse ja süstitakse kohe Myco/F-Lytici pudelisse. Pudel tellida mükobakterioloogia laborist.
Materjali kogus	Soovitatavalt 1–5 mL

KOETÜKID (BIOPSIA-, LAHANGUMATERJAL)

Näidustused: generaliseerunud tuberkuloosi kahtlusel tehakse maksabiopsia, tuberkuloosse pleuriidi kahtlusel pleurabiopsia, lümfadeniidi kahtlusel lümfisõlme biopsia (või punktsioon), naistel urogenitaaltuberkuloosi kahtlusel biopsia endomeetriumist.

Proovinõu	Steriilne lisandita katsuti, kuivamise vältimiseks soovitav lisada füsioloogilist lahust
-----------	--

URIIN

Näidustused: urogenitaaltuberkuloosi, generaliseerunud tuberkuloosi kahtlus.

Proove tuleb võtta kolmel erineval päeval, sest tuberkuloositekitajate eritumine koldest ei ole pidev. Prooviks võetakse esmast hommikust keskjoauriini.

Proovinõu	Steriilne koonuspõhjaga katsuti 50 mL, vajadusel mitu
Materjali hulk	50–200 mL

ROE

Näidustused: kahtlus sooletuberkuloosile, mükobakteriaalsele enteriidile AIDSi korral.

Arvestada, et materjali reostumise võimalus teiste materjalidega võrreldes oluliselt suurem.

Proovinõu	Proovitops
Materjali hulk	Herneterasuurune tükk

NAHALÕIKE KAABE

Näidustus: leepira või nahatuberkuloosi kahtlus

Proov võetakse (ilma tuimestuseta) nahamuutuste perifeersetest osadest, laugudelt ning veel 4–6 kohast, näiteks käte distaalsete osade väliskülgedelt, reie distaalse osa esiküljelt, põlveõndlast jne. Peale uuritava piirkonna puhastamist 70% etanooliga pigistatakse nahk pöidla ja nimetissõrme vahele nii tugevasti, et nahk oleks kohas, kust proovi võetakse, veretu. Tehakse skalpelliga ca 8 mm pikkune ja 2 mm sügavune nahalõige (veritsust ei tohi olla). Seejärel kaabitakse skalpelli servaga lõiget risti, et saada skalpelli servale vedelikku ja rakke. Materjal pannakse steriilsesse röगतopsi, kaetakse füsioloogilise lahusega, et vältida materjali kuivamist.

Säilivus, materjali transport laborisse

NB! Kontrollida, et prooviks võetud materjal ei saastaks proovianumat väljastpoolt. Proovinõu ja transpordikonteineri kaaned peavad olema suletud.

Proov saata laborisse kohe peale selle võtmist, kuid arvestusega, et see ei jääks nädalavahetuseks laborisse seisma. Materjali, mida ei saa samal päeval laborisse saata, peab saatmiseni hoidma külmkapis. Materjali Myco/F-Lytici pudelites võib hoida ka toatemperatuuril. Kui transport kestab üle kahe tunni, lisada transpordikonteinerisse külmakandjad.

Kui pole võimalik teha e-tellimust, tuleb proovile lisada eraldi pakendis spetsiaalne mükobakterite uuringu tellimisleht (vt [Tellimislehed](#) Ühendlabori kodulehel).

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti

Kliiniline tähendus

Mükobakterite klassikaline uurimine toimub etapiviisiliselt:

- bakterioskoopia
- külv ja samastamine
- ravimiresistentsuse määramine.

Tuberkuloosi mikrobioloogiline diagnostika

Bakterioskoopiline algmaterjali hindamine ei anna vastust küsimusele, kas uuritavas materjalis on *Mycobacterium tuberculosis* kompleks või mõni atüüpilistest mükobakteritest, mis on keskkonnas (kraanivees jne) laialt levinud. Seetõttu ei tähenda bakterioskoopiaal happekindlate pulkbakterite leidmine sugugi mitte alati tuberkuloosi diagnoosi. Diagnoos saab korrektse mikrobioloogilise kinnituse, kui välja kasvanud mikroobikultuur ka samastatakse.

Ühekordnegi *M. tuberculosis*'e, *M. bovis*'e ja *M. africanum*'i isoleerimine haige materjalist omab alati kliinilist tähendust.

Mükobakteriooside mikrobioloogiline diagnostika

Atüüpiliste mükobakterite ühekordne isoleerimine ei pruugi omada kliinilist tähendust, vaid võib olla juhuleid: asümptomaatiline kolonisatsioon, instrumendi (bronhoskoobi) kontaminatsioon jne. Mükobakterioosi diagnoosimisel on vajalik lähtuda järgmistest kriteeriumidest:

1. Rögast ja uriinist peab sama (mittetuberkuloosne) mükobakter olema isoleeritud vähemalt kahel erineval ajal võetud materjalist (kolonisatsiooni ja/või juhuleiu välistamiseks). Isoleeritud ja samastatud mükobakter peab sealjuures olema ka kliiniliselt relevantne.
2. Verest, koebiopsiast ja suletud õõnte punktaatidest loetakse diagnoosi kinnituseks ka mükobakteri ühekordne isoleerimine.

Mükobakterite mikroskoopia

Analüüsimeetod: fluorestsentsmikroskoopia, värving akridiinoranžiga

Vastuse vorm

Positiivne/negatiivne mükobakterite esinemise suhtes. Positiivset rögapreparaati hinnatakse kvantitatiivselt (üksikud, 1+, 2+, 3+).

Kliiniline tähendus

Esmane diagnostiline test mükobakterite avastamiseks algmaterjalist.

Mükobakterite külv ja isoleerimine

Analüüsimeetod: külv BACTEC-MGIT vedelsöötmesse ja glütserooli lisandiga Löwenstein-Jenseni (L-J) munasöötmesse või ka ainult MGIT vedelsöötmesse raviloleva tuberkuloosiga bakterierituse jälgimiseks. Tahke söötme külve kasvatatakse kaheksa nädalat ning kasvu olemasolu kontrollitakse kord nädalas. Vedelsöötmes on mükobakterite kasvukiirus suurem, negatiivseks loetakse tulemus kuue nädala möödumisel, positiivne tulemus on üldjuhul hinnatav 1–3 nädala möödudes.

Vastuse vorm

Positiivne/negatiivne mükobakterite esinemise suhtes

Kliiniline tähendus

Algmaterjali külv teostatakse samaaegselt algmaterjali fluorestsentsmikroskoopiaga.

Positiivsest külvist teostatakse mikroskoopia Ziehl-Neelseni meetodil, mille alusel saab viite, kas tegemist võiks olla *M. tuberculosis* kompleksi kuuluvate mükobakteritega (cord-faktori olemasolu). Mikroskoopia tulemuse alusel valitakse mükobakterite samastamise meetod.

Mükobakterite geneetiline samastamine

Analüüsimeetod: *HAIN Lifescience GenoType* meetod, mis seisneb DNA fragmentide mitmekordses amplifitseerimises. See võimaldab pöördhübridisatsioonil erineva vöotide kombinatsiooni alusel nii *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi kuuluvate kui ka paljude oportunistlike mükobakterite diferentseerimist liigi tasemini.

Vastuse vorm

Mükobakteri liigi nimetus

Näidustus ja kliiniline tähendus

Mükobakteri liigi tuvastamine külvil saadud puhaskultuurist. Samastamise meetodi valib laborispetsialist toetudes eelnevatele uuringutele.

Mycobacterium tuberculosis'e kompleksi DNA ja põhirea ravimtundlikkus geneetiliste mutatsioonide alusel

Analüüsimeetod: *HAIN Lifescience GenoType* meetod, kus amplifitseeritakse neid tuberkuloosibakteri geeni piirkondi, mis vastutavad kahe põhilise tuberkuloosiravimi, s.o isoniasiidi ja rifampitsiini, ravimtundlikkuse eest. Mutatsioonid kindlates geenides viitavad resistentsusele nimetatud ravimite suhtes. Samas annab test samastamise tulemuse *M. tuberculosis* kompleksi tasemel.

Vastuse vorm

T – tundlik/R – resistentne *M. tuberculosis* kompleks

Näidustus ja kliiniline tähendus

Mükobakterite samastamine *M. tuberculosis* kompleksi tasemel kas positiivse mikroskoopia tulemusega algmaterjalist või puhaskultuurist. Meetodit kasutatakse esmastel patsientidel ravim tundlikkuse määramiseks isoniasiidi ja rifampitsiini suhtes. Samastamismeetodi valib laborispetsialist toetudes eelnevatele uuringutele.

Mycobacterium tuberculosis'e kompleksi DNA ja reservrea ravim tundlikkus geneetiliste mutatsioonide alusel

Analüüsimeetod: HAIN Lifescience GenoType meetod, kus amplifitseeritakse neid tuberkuloosibakteri geeni piirkondi, mis vastutavad ravim tundlikkuse eest fluorokinolonide ja aminoglükosiidide suhtes. Mutatsioonid kindlates geenides viitavad resistentsusele nimetatud ravimite suhtes. Samas annab test samastamise tulemuse *M. tuberculosis* kompleksi tasemel.

Vastuse vorm

T – tundlik/R – resistentne *M. tuberculosis* kompleks

Näidustus ja kliiniline tähendus

Mükobakterite samastamine *M. tuberculosis* kompleksi tasemel kas positiivse mikroskoopia tulemusega algmaterjalist või puhaskultuurist. Meetod on kasutusel esmastel patsientidel, kellel on tuvastatud ravim resistentsus isoniasiidi ja/või rifampitsiini suhtes (MTBDRplus või GeneXpert meetodil). Samastamismeetodi valib laborispetsialist toetudes eelnevatele uuringutele.

Mittetuberkuloossete mükobakterite DNA ja ravim tundlikkus geneetiliste mutatsioonide alusel

Analüüsimeetod: HAIN Lifescience GenoType meetod, kus amplifitseeritakse neid mükobakterite geeni piirkondi, mis annavad vastavale liigile iseloomuliku vöötide mustri ning lisaks neid DNA piirkondi, milles tekkinud mutatsioonid viitavad resistentsusele makroliidide ja aminoglükosiidide suhtes.

Vastuse vorm

T – tundlik/R – resistentne *M. avium* kompleks, *M. abscessus* kompleks, *M. chelonae*

Näidustus ja kliiniline tähendus

Eelpool nimetatud mükobakteri liikide samastamine positiivsest puhaskultuurist. Meetod on kasutusel esmastel patsientidel ravim tundlikkuse määramiseks makroliidide ja aminoglükosiidide suhtes. Samastamismeetodi valib laborispetsialist toetudes eelnevatele uuringutele.

***Mycobacterium tuberculosis*'e kompleksi DNA ja rifampitsiin-tundlikkus geneetiliste mutatsioonide alusel (MTBC DNA ja Rif-tundlikkuse paneel)**

Analüüsimeetod: poolkvantitatiivne astmeline reaallaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) (*GeneXpert MTB/RIF Ultra*), mis võimaldab tuvastada algmaterjalist *M. tuberculosis* kompleksi DNA ning selle olemasolul leida ka *rpoB* geenis rifampitsiini resistentsust põhjustavad mutatsioonid.

Vastuse vorm

Mycobacterium tuberculosis kompleksi DNA positiivne/negatiivne
DNA hulk palju/keskmiselt/vähe/väga vähe/jälgedena
Rifampitsiin (gen) – tundlik/resistentne

Näidustus ja kliiniline tähendus

Meetod on kasutusel tuberkuloosi kahtlusega esmastel patsientidel *M.tuberculosis* kompleksi samastamiseks ja ravimtundlikkuse määramiseks rifampitsiini suhtes või ka *M. tuberculosis* kompleksi välistamiseks. Testi saab teostada ainult algmaterjalist.

***Mycobacterium tuberculosis*'e kompleksi DNA ning rifampitsiin- ja isoniasiid-tundlikkus geneetiliste mutatsioonide alusel (MTBC DNA ja Rif-, Inh-tundlikkuse paneel)**

Analüüsimeetod: poolkvantitatiivne astmeline reaallaja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) (BD MAX), mis võimaldab tuvastada algmaterjalist *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi DNA ning selle olemasolul leida *rpoB* geenis rifampitsiini ning *katG* ja *inhA* geenis isoniasidi suhtes resistentsust põhjustavad mutatsioonid.

Vastuse vorm

Mycobacterium tuberculosis kompleksi DNA positiivne/ negatiivne
Rifampitsiin (gen) – tundlik/resistentne
Isoniasiid (gen) – tundlik/resistentne

Näidustus ja kliiniline tähendus

Meetod on kasutusel tuberkuloosi kahtlusega esmastel patsientidel *M.tuberculosis* kompleksi samastamiseks ja ravimtundlikkuse määramiseks rifampitsiini ja isoniasidi suhtes või ka *M. tuberculosis* kompleksi välistamiseks. Testi saab teostada nii algmaterjalist kui positiivsest puhaskultuurist.

Mükobakterite samastamine (kromatograafia)

Analüüsimeetod: kromatograafiline immunoloogiline meetod *Mycobacterium tuberculosis* kompleksi kuuluvate mükobakterite antigeeni kvalitatiivseks määramiseks positiivse kasvuga MGIT vedelsöötmetest.

Vastuse vorm

M. tuberculosis kompleks /ei ole *M. tuberculosis* kompleks

Näidustus ja kliiniline tähendus

Mükobakterite samastamine positiivsest külvist *M. tuberculosis* kompleksi tasemel. Testi kasutatakse juhul, kui esmasel patsiendil pole muid samastamismeetodeid kasutatud või kui tuberkuloosi diagnoosiga patsiendil korratakse fenotüübilise ravimtundlikkuse analüüsi. Nimelt peavad olema samastatud kõik isolaadid, millele teostatakse ravimtundlikkuse analüüs. Samastamismeetodi valib laborispetsialist toetudes eelnevatele uuringutele.

Mycobacterium tuberculosis'e ravimtundlikkuse määramine

Analüüsimeetod: BACTEC-MGIT vedelsöötme süsteemi viidud proportsioonimeetodi variant, kus mükobakterite kasvu hinnatakse fluoromeetriliselt.

Tulemused hinnatakse 5.–14. päeval.

Vastuse vorm

T - tundlik/R – resistentne.

Näidustus ja kliiniline tähendus

Ravimtundlikkuse määramisele põhirea ravimite suhtes kuuluvad kõik esmashaigetelt puhaskultuurina isoleeritud ja samastatud *M. tuberculosis*'e tüved; samuti juba ravi saanud patsientidelt puhaskultuurina isoleeritud tüved, kui eelmisest määramisest on möödunud vähemalt kolm kuud. Esmashaigete puhul on oluline leida ravimid, mille suhtes uuritav tüvi on tundlik; ravil olevate patsientide puhul on eesmärk selgitada välja võimalik ravimresistentsuse teke raviks kasutatavate ravimite suhtes.

Ravimtundlikkust reservrea antibiootikumide suhtes määratakse neil isolaatidel, millel on tuvastatud resistentsus isoniasiidile ja rifampitsiinile.

Põhirea antibiootikumidest määratakse resistentsus streptomütsiini, isoniasiidile, rifampitsiini, etambutooli ja pürasiinamiidi suhtes. Reservrea ravimitest määratakse tundlikkus kapreomütsiini, amikatsiini, kanamütsiini, protioonamiidi, levofloksatsiini, moksifloksatsiini ja linesoliidi suhtes.

Mittetuberkuloosete mükobakterite ravimtundlikkuse määramine SLOMYCO2 ja RAPMYCO2 mikrotiiterplaadil

Analüüsimeetod: SLOMYCO2 ja RAPMYCO2 mikrotiiterplaadid sisaldavad erinevate kontsentratsioonidega ravimeid, kuhu lisatakse uuritava mükobakteri suspensioon. Uuring baseerub minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) leidmisel. Kasvu hinnatakse visuaalselt kasutades pööratud peeglit. Erinevate mükobakterite ravimtundlikkuse interpreteerimine toimub MIC väärtuste alusel vastavalt CLSI* M62 standardis olevatele tabelitele.

Vastuse vorm

T – tundlik/ R – resistentne/ MT – mõõdukalt tundlik (ehk tundlik kõrgemas kontsentratsioonis)

Näidustus ja kliiniline tähendus

Ravim tundlikkusele määramisele kuuluvad puhaskultuurina tahkelt söötmetl isoleeritud patogeensed mükobakterid, mis on samastatud liigi tasemeni. Uuritavad ravimid on olenevalt mükobakteri liigist erinevad.

Gammainterferoon-test (tuberkuloosi sõeluuring) (P-IGRA)

Mükobakterioloogia osakond

Immuunvastusena toodetud gammainterferooni hulk on suurem (positiivne) patsiendi varasema kokkupuute korral *M. tuberculosis*'e peptiidsete antigeenidega ning väiksem (negatiivne), kui tuberkuloosibakteritega varasem kokkupuude puudub.

Uuritav materjal, selle võtmine, saatmine ja säilitamine

Proovinõu	Quantiferoni komplekt – 4 katsutit mini-grip kotis
Analüüsitav kogus	1 mL verd igasse katsutisse
Säilivus	Analüüsida võimalikult kiiresti. Täisveri säilib toatemperatuuril kuni 16 tundi. Ei tohi säilitada külmkapis!

Kõiki katsuteid tuleb kümme korda üles-alla loksutada, et kogu katsuti sisepind oleks verrega kokkupuutes.

Katsutid tuleb märgistada patsiendi nime ja verevõtu kellaajaga.

Analüüsi tegemise aeg: tööpäeviti (mitte saata katsuteid laborisse päev enne pühi ja pühade ajal)

Analüüsimeetod: ensüüm-immuunsorptsioonmeetod (ELISA)

Vastuse vorm

M tuberculosis nakkus tõenäoline

M tuberculosis nakkus ebatõenäoline

M tuberculosis nakkus määramatu

Näidustus ja kliiniline tähendus

Tuberkuloosi sõeluuring tuberkuloosi kahtlusega patsientidel, tuberkuloosi riskiga isikutel, tervishoiutöötajatel. Positiivse tuberkuliinistest korral BCG-st tingitud valepositiivse tulemuse välistamiseks.

IGRA test ei anna positiivset tulemust BCG-vaktsiinitüve proteiinidele.

Tiina Kummik