

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА И МИКОБАКТЕРИОЗОВ И ИЗУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ

В.И.Литвинов

ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»

Laboratory methods for diagnostic of tuberculosis and mycobacterioses and drug susceptibility of mycobacteria testing

V.I. Litvinov

Представлен алгоритм обследования больных в Центриализованной бактериологической лаборатории МНПЦ борьбы с туберкулезом, направленный на этиологическую диагностику и определение лекарственной чувствительности возбудителя при туберкулезе и микобактериозах. В качестве основной аппаратуры для текущих исследований используют BACTEC 960, а также автоматизированные системы BACTEC 2050 и, реже, VersaTREK. Идентификацию нетуберкулезных микобактерий проводят молекулярно-генетическими методами, используя тест-системы «GenoType CM» и «Genotype AS». Лекарственную чувствительность микобактерий определяют при культивировании в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 с использованием автоматизированных систем, в первую очередь BACTEC™ MGIT™960, Sensititre MycoTB, молекулярно-генетические тест-системы – для препаратов первого ряда «ТБ-БИОЧИП», «GeneXpert MBT/RIF», для резервных – в том числе фторхинолонов и аминогликозидов – «ТБ-БИОЧИП-2», «GenoType MTBDRsl». Опыт МНПЦ борьбы с туберкулезом доказывает, что применение молекулярно-генетических методов, наряду с современными бактериологическими методами, значительно ускоряет и делает более эффективной лабораторную диагностику туберкулеза и микобактериозов и оценку лекарственной чувствительности микобактерий к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: туберкулез, микобактериоз, этиологическая диагностика, методы ускоренной микробиологической диагностики, лекарственная устойчивость, молекулярно-генетические методы, биочипы.

The algorithm of patients' examination in Central Moscow TB bacteriological laboratory in Moscow Research and Clinical TB Center include etiological diagnosis and drug susceptibility of mycobacteria testing. As basic equipment BACTEC 960, BACTEC 2050 and, реже, VersaTREK are routinely used. The non-tuberculosis mycobacteria identification performed by molecular genetic methods with «GenoType CM» и «Genotype AS». The drug susceptibility testing based on cultivation on liquid media Middlebrook 7H9 by applying the BACTEC™ MGIT™960 system, Sensititre MycoTB in combination with molecular genetic techniques: for first-line drugs – «TB-BIOCHIP», «GeneXpert MBT/RIF», or second-line (include fluoroquinolones and aminoglycosides) – «TB-BIOCHIP-2», «GenoType MTBDRsl». The Moscow Research and Clinical TB Center experience demonstrate, that the use of molecular genetic methods along with current bacteriological assays considerably accelerates and makes more effective the laboratory diagnosis of tuberculosis and mycobacterioses and the assessment of drug susceptibility of mycobacteria.

Key words: tuberculosis, mycobacteriosis, etiological diagnosis, express-methods in microbiology, molecular genetic methods, biochips,

Для того, чтобы установить правильный диагноз туберкулеза или микобактериоза, необходимо обнаружение микобактерий в мокроте и/или любом другом диагностическом материале, поскольку, как бы не были клиницисты уверены в диагнозе на основании результатов клинко-рентгенологического обследования, определенные сомнения должны всегда оставаться. В первую очередь, это обусловлено тем, что не только *M. tuberculosis*, но и другие микобактерии, например *M. kansasii*, вызывают патологию (главным образом, легких) с очень похожей клинко-рентгенологической симптоматикой [7, 13, 27, 29, 40]. Недаром такая авторитетная организация, как Американская торакальная ассоциация, рекомендует при установлении диагноза микобактериального заболевания руководствоваться в качестве одного из основных критериев обнаружением возбудителя – трехкратным [39] или, хотя бы, двукратным [29].

Вместе с тем, сегодня для обнаружения и идентификации микобактерий не обязательно всегда применять даже самые эффективные бактериологические методы, в ряде случаев достаточно использовать для этих целей молекулярно-генетические тесты [12, 27, 41].

К сожалению, иммунология пока мало что дала для решения этой проблемы – обнаружить антигены, специфичные, например, для *M. tuberculosis*, в крови удается редко (несколько чаще в спинномозговой, плевральной жидкости). Что касается антител, то, до последнего времени, для их выявления использовали антигены, на которые развиваются «перекрестные» реакции, в частности у вакцинированных БЦЖ детей и подростков, хотя сегодня ситуация уже несколько иная [9, 32].

В настоящее время в плане иммунодиагностики возникли определенные надежды, связанные с оценкой продукции интерлейкинов (в первую очередь, интерферона γ – ИФН- γ) с помощью коммерческих тест-систем, в которых используют «специфические» антигены *M. tuberculosis* [30, 35].

Но все-таки, если говорить о России, сегодня даже в таком городе с развитой фтизиатрической инфраструктурой, как Москва, о бактериологической диагностике забывать нельзя.

Микобактериологические (и молекулярно-генетические) исследования показаны всем пациентам, обратившимся в любые лечебно-диагностические учреждения, при подозрении на наличие туберкулезной инфекции.

При положительных или сомнительных результатах первичного скрининга, пациента направляют в противотуберкулезное учреждение для подтверждения или исключения диагноза туберкулеза.

Для клиники туберкулеза (микобактериозов) важнейшим является не только выявление бактериовыделения, но и изучение различных свойств выделенных культур – их вирулентности, видовой принадлежности, лекарственной чувствительности (ЛЧ) и пр.

Одним из главных условий эффективного проведения бактериологического обследования (и применения других методов в необходимом комплексе) для выделения, идентификации микобактерий и определения их лекарственной чувствительности, является централизация соответствующих исследований – создание Централизованных бактериологических лабораторий (бактериологических – условно, так как в их составе должны быть специалисты и в области молекулярной генетики и иммунологии) [2, 3].

В городе Москве Централизованная бактериологическая лаборатория была создана в 1973 году (Приказ Комитета здравоохранения города Москвы № 133). Однако с того времени её функции существенно изменились.

Постоянно увеличивается количество обслуживаемых учреждений и анализов, выполняемых в Централизованной бактериологической лаборатории на базе МНПЦ борьбы с туберкулезом (далее – Центр). В 2012 году произошло объединение Центра и всех противотуберкулезных диспансеров и теперь основными исследованиями охвачены все подразделения Центра.

В итоге, количество посевов на жидкие среды (сегодня основные исследования – для выделения и идентификации микобактерий, определения лекарственной чувствительности) увеличилось более чем в 5 раз (за период 2005 по 2010 годы), и продолжает увеличиваться с каждым годом – с подключением филиалов. Кроме того, в ряде случаев туберкулезные больницы (№№ 3, 6, 11) направляют на исследования в Центр образцы клинического материала (для решения ряда важных вопросов – диагностики туберкулеза и микобактериозов у ВИЧ-инфицированных лиц и др.)

В настоящее время для микробиологических анализов (на жидких средах), помимо «основной» аппаратуры для массовых исследований (BACTEC 960), используют также автоматизированные системы BACTEC 2050 и VersaTREK (в основном для выделения микобактерий из крови, в первую очередь, у больных ВИЧ-инфекцией).

Важной проблемой сегодня является также этиологическая диагностика микобактериозов – выделение и идентификация нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) и определение их лекарственной чувствительности, поскольку на фоне распространения «иммуносупрессивных состояний» (в первую очередь, ВИЧ-инфекции) существенно увеличилась заболеваемость не только туберкулезом, но и микобактериозами.

Выделение НТМБ в Центре в настоящее время происходит параллельно с *M. tuberculosis* (практически исключительно на жидких средах – в системе BACTEC 960). В тех случаях, когда возникало подозрение на наличие НТМБ (отсутствие «кос» при микроскопии и т.д.), их идентификацию ранее осуществляли с помощью биохимических тестов (сегодня в Центре их практически не используют), методом высокоэффективной

жидкостной хроматографии – ВЭЖХ, а в современных условиях, в первую очередь, молекулярно-генетическими методами [7, 12].

Сегодня за рубежом широкое применение нашли различные коммерческие молекулярно-генетические тест-системы на основе гибридизационного анализа, такие как AccuProbe (Gen-Probe, США), Cobas Amplicor (Roche, Швейцария), Speed-Oligo (Vircell, Испания), INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetics, Бельгия), GenoType CM/AS (Hain Lifescience GmbH, Германия). Некоторые из них предназначены для идентификации не только *M. tuberculosis complex*, но и *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* (AccuProbe, Cobas Amplicor), другие позволяют идентифицировать более 10 видов микобактерий, вплоть до 50 видов (INNO-LiPA Mycobacteria, GenoType CM/AS). В качестве мишени в этих тест-системах используют фрагмент гена 16S-23S rRNA.

В настоящее время в Центре для молекулярно-генетической идентификации микобактерий применяют тест-системы GenoType CM (GT CM) и GenoType AS (GT AS), производства HainLifescience, Германия. Данные тест-системы основаны на сочетании методов ПЦР и гибридизации полученных ПЦР-продуктов с комплементарными олигонуклеотидами на бумаге, в данном случае – на ДНК-стрипах. В мире существует несколько вариантов этой технологии, которая легла в основу таких тест-систем как INNO-LiPA Mycobacteria (Innogenetics, Бельгия) и Speed-Oligo (Vircell, Испания).

Набор реагентов для видовой идентификации микобактерий состоит из двух тест-систем GT CM и GT AS, которые соответственно позволяют идентифицировать 13 видов нетуберкулёзных микобактерий (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. peregrinum*, *M. xenopi*, *M. marinum*/*M. ulcerans*) и туберкулёзный комплекс (*M. tuberculosis complex*) и 16 видов нетуберкулёзных микобактерий (*M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*) в культурах микобактерий, выделенных на жидких или плотных питательных средах, а также определить родоспецифичный фрагмент ДНК (*Mycobacterium spec.*). Данная технология основана на методе гибридизации, т.е. комплементарного взаимодействия иммобилизованных на бумажном носителе (стрипе – бумажной полоске) специфичных ДНК-зондов с ампликонами, полученными после проведения ПЦР. Детекция результата основана на цветной ферментативной реакции и характеризуется отсутствием или появлением на стрипе окрашенных полос разной интенсивности. В обе тест-системы входят универсальные реагенты для проведения ПЦР и гибридизации, а также унифицированная программа амплификации.

Необходимо отметить, что полученные после проведения ПЦР ампликоны являются универсальными для проведения гибридизации как для GT CM, так и для GT AS. Оба теста отличаются только входящие в набор ДНК-стрипы, которые являются в данном случае инструментами детекции и дают визуальный ответ о принадлежности к тому или иному виду микобактерий.

Иммунологические (особенно серологические) исследования занимают не очень существенное место в этиологической диагностике заболеваний, вызываемых микобактериями. Однако не прекращаются попытки применения серологических (в т.ч. коммерческих) тест-систем для определения противотуберкулёзных антител [9, 32, 38].

Сегодня практически отсутствуют коммерческие тест-системы для определения антигенов микобактерий. Это вполне понятно, так как трудно рассчитывать на высокий процент положительных реакций при использовании наиболее доступного материала – крови (даже в случае диссоциации иммунных комплексов).

Можно отметить ряд попыток определения антигена клеточной стенки *M. tuberculosis* – липоарабиноманнана (ЛАМ) в моче для диагностики туберкулёза у больных ВИЧ-инфекцией. Диагностическое значение такого определения увеличивалось с уменьшением числа CD4+ Т-лимфоцитов (от ≥ 200 /мкл до < 50 /мкл) с 15,2% до 69,2% [42].

В итоге следует пока констатировать, что ни одна из тест-систем для определения как антигенов, так и антител, не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью, но их можно применять как предварительные (скрининговые) методы диагностики туберкулёза [9, 32, 38].

Взаимодействие клеток в очаге туберкулёзной инфекции сопровождается продукцией широкого спектра цитокинов. В настоящее время особое внимание (в т.ч. в плане использования для диагностики) уделяют трем провоспалительным цитокинам: интерферону- γ (ИФН- γ), фактору некроза опухоли- α (ФНО- α), интерлейкину-2 (ИЛ-2). Такой выбор обусловлен убедительными доказательствами их роли в восприимчивости макроорганизма к микобактериальной инфекции и выявленными взаимосвязями между уровнем продукции этих цитокинов и результатами лечения [24, 30].

Сегодня наиболее широкое практическое применение имеют тест-системы для оценки продукции гамма-интерферона (ИФН- γ). Основными из таких тест-систем (коммерческих) являются:

- «QuantIFERON-TB-Gold» (QFN) – для определения ИФН- γ в плазме после инкубации цельной крови со «специфическими» антигенами *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, TB7.7).
- «T-SPOT.TB» – для выявления активированных *M. tuberculosis* специфических Т-клеток, содержащих ИФН- γ на поверхности мембраны.

В Центре были оценены результаты определения ИФН- γ в плазме крови у детей и подростков, находившихся на лечении в больницах и санаториях туберкулёзного профиля. Полученные данные сопоставляли с результатами пробы с ДИАСКИНТЕСТом® (*in vivo*) [14], так как в обоих тестах используют антигены ESAT-6 и CFP-10 (в QFN присутствует дополнительно антиген TB7.7.). У больных туберкулёзом с помощью QFN получено 84,5% положительных результатов, а ДИАСКИНТЕСТа® – 82,9%, то есть чувствительность этих двух тестов была сходной, а процент совпадений (96,0%) – высоким. Следовательно, оба теста могут быть использованы для диагностики туберкулёза, в частности, у детей и подростков.

Были также обследованы больные ревматологическими заболеваниями, в порядке скрининга перед назначением генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП) и на фоне лечения ГИБП. Поскольку ГИБП блокируют медиаторы воспаления – цитокины и рецепторы иммунокомпетентных клеток, риск развития тяжелых инфекций, в частности, туберкулёза, у таких больных довольно высок.

Полученные данные важны, поскольку при положительных результатах пробы Манту таким пациентам назначают превентивное лечение противотуберкулёзными препаратами. Количество положительных результатов проб QFN и с ДИАСКИНТЕСТом®, было у них существенно меньше, чем при пробе Манту, что позволило отказаться от назначения противотуберкулёзного лечения у многих пациентов с положительной пробой Манту [1].

Тест-система «T-SPOT.TB» пока не сертифицирована в России, однако, в мире ее широко используют (наравне с QFN) [18, 34].

Обобщенные данные последних лет показывают, что клеточные тесты *in vitro* обладают высокой специфичностью (что особенно важно, у вакцинированных лиц – почти 100% отрицательных реакций), но относительно низкой чувствительностью (у больных туберкулёзом – до 3/4 положительных реакций) [33, 35].

В Центре был также изучен цитокиновый статус больных с впервые выявленным туберкулёзом легких. Для стимуляции специфической продукции цитокинов использовали тест-пробирки, входящие в состав коммерческого набора «QuantiFERON-TB-Gold». Образцы крови анализировали в стандартном варианте ИФА, следуя инструкции производителя (eBioscience, Австрия). Определяли уровни ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2. Полученные результаты продемонстрировали взаимосвязь между уровнями исследованных цитокинов и клиническими, рентгенологическими и микробиологическими характеристиками туберкулёзного процесса. Так, наличие у больных распада или распространенного процесса ассоциировалось с низким уровнем всех трех цитокинов. Выявление резистентности *M. tuberculosis* к химиопрепаратам сопровождалось низкими уровнями ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2. При сопоставлении

продукции цитокинов на момент начала лечения с его эффективностью (впоследствии), которую оценивали по окончании фазы интенсивной терапии (через два месяца) – более высокой она была у больных с выраженной положительной динамикой процесса (достоверно только для ФНО- α) [9].

В настоящее время предполагается, что *M. tuberculosis* могут существовать в так называемой дремлющей, «дормантной» форме [8, 16]. Такое состояние кодируется соответствующими дормантными локусами (RD1, dosR и др.) [16, 20]. Микобактерии в дормантном состоянии вызывают латентную туберкулезную инфекцию без клинических признаков заболевания. При наличии предрасполагающих факторов *M. tuberculosis* реверсируют в «обычные» формы, вызывая развитие туберкулёза [4]. Латентная туберкулёзная инфекция может иметь место у лиц (в первую очередь, детей) из тесного контакта с больными туберкулёзом (бактериовыделителями), у лиц с серьезными нарушениями иммунитета (ВИЧ-инфицированные, получающие иммунодепрессанты и др.) У таких категорий пациентов высоким является риск развития «манифестных» форм туберкулёза. В связи с этим, необходимым у них является выявление «латентной» инфекции и соответствующие профилактические (лечебные, если считать это состояние туберкулёзом, пусть даже «латентным») мероприятия – превентивная химиотерапия [11, 16, 17, 19].

Для выявления «латентной» инфекции ранее использовали туберкулиновую пробу Манту (гиперергическая реакция, выражи) [11]. Сегодня для этих целей применяют оценку продукции ИФН- γ *in vitro* (коммерческие тесты «QuantiFERON-TB-Gold» и «T-SPOT.TB») и новый кожный тест (ДИАСКИНТЕСТ®) с антигенами, кодируемыми генетическими локусами, имеющимися в *M. tuberculosis* и отсутствующими в *M. bovis* BCG и большинстве других микобактерий [9, 14, 16, 17, 22].

В настоящее время особое значение приобрела проблема устойчивости микобактерий к противотуберкулёзным (ПТП) и другим препаратам.

Наряду с понятиями лекарственная «чувствительность» (ЛЧ) и «устойчивость» (ЛУ) в настоящее время используют также термины, определяющие их количественную и качественную стороны.

Особое значение имеют:

- **Множественная лекарственная устойчивость** (МЛУ – MDR) – одновременно к изониазиду и рифампицину, независимо от таковой к другим препаратам.

- **Широкая – экстенсивная лекарственная устойчивость** (ШЛУ – XDR) – это МЛУ и устойчивость, по крайней мере, к одному фторхинолону и одному инъекционному препарату.

- Несколько позднее была описана еще одна форма лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* – **чрезвычайная ЛУ** – ко всем без исключения ПТП (Extremely Drug Resistance – XXDR).

Количественными критериями для оценки фенотипического различия между устойчивыми и чувствительными штаммами являются минимальная ингибирующая (МИК) и критическая концентрации (КК) каждого лекарственного препарата.

Принципы использования микробиологических исследований для определения ЛЧ возбудителя туберкулёза, сформулированные экспертами ВОЗ, практически не изменились, а лишь дополнены в связи с ухудшением эпидемической обстановки по туберкулёзу в мире [2, 3, 26, 29, 36].

В настоящее время добиться максимального сокращения сроков выявления *M. tuberculosis*, в том числе МЛУ и ШЛУ, стало возможным благодаря современным молекулярно-генетическим технологиям. Однако в комплексной лабораторной диагностике туберкулёза сочетание молекулярно-генетических и микробиологических методов является по-прежнему необходимым условием достоверного и ускоренного выявления *M. tuberculosis* с МЛУ и ШЛУ.

Сегодня получить в короткие (относительно) сроки данные о ЛЧ *M. tuberculosis* к ПТП первого ряда микробиологическими методами возможно при их культивировании в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 (7H9) с использованием автоматизированных систем, в первую очередь BACTEC™ MGIT™ 960 (BACTEC 960). Данная методика стандартизована, наборы лиофилизированных препаратов и реактивов для проведения теста выпускает фирма-производитель. Вместе с тем, единых методических рекомендаций, стандартов и готовых наборов расходных материалов для проведения теста на ЛЧ к ПТП II ряда в системе BACTEC 960 пока нет. Работы И.Р. Дорожкиной (2013) [3], Ю.Д. Исаевой (2013) [6], А. Krüüner и соавт. (2006) [31], S. Rüscher-Gerdes и соавт. (2006) [37] – одни из первых, посвященные этой проблеме.

В ЦБЛ Центра в 2009-2011 гг. было проведено исследование по изучению антимикобактериального действия *in vitro* препаратов группы фторхинолонов – левофлоксацина (LEV), моксифлоксацина (MOX) и гатифлоксацина (GAT), а также аминогликозидов – канамицина (KAN) и капреомицина (CAP) в жидкой среде 7H9 с использованием BACTEC 960 [6].

В результате были определены КК этих пяти ПТП II ряда и скорректированы КК, установленные ранее [15, 31].

Так как для фторхинолонов характерна перекрестная устойчивость, то из трех вышеперечисленных препаратов, достаточно определить ее культуральными методами, по крайней мере, к одному [25]. Однако обладающие высокой эффективностью в отношении *M. tuberculosis* LEV, MOX и GAT могут оказывать клинический эффект, несмотря на то, что по КК установлена лекарственная устойчивость. Вместе с тем, выявление уровня устойчивости к более высоким концентрациям фторхинолонов при количественном определении ЛЧ (определение МИК) в предельно сжатые сроки может быть единственной альтернативой в решении вопроса. Подобные

исследования могут гарантировать более полное изучение вероятности (по МИК, чем по КК препаратов) клинической эффективности фторхинолонов. Что касается определения ЛЧ к KAN и CAP, то культуральное изучение ЛЧ необходимо проводить с обоими препаратами, поскольку было установлено, что перекрестная устойчивость KAN и CAP наблюдается только при выявлении мутации в гене *rrs*, мутации в промоторной области гена *eis* приводят к развитию устойчивости штаммов *M. tuberculosis* только к KAN.

Следует отметить, что в последние годы возможности быстрого и высококачественного определения лекарственной чувствительности существенно увеличились, в первую очередь, в связи с тем, что специалисты компании TREK Diagnostic Systems разработали тест-систему Sensititre MycoTB (MycoTB). Недавно сертифицированная в России, она предназначена для определения ЛЧ *M. tuberculosis* к 12 ПТП первого и второго ряда [28]. Имеется также подобная тест-система для определения ЛЧ нетуберкулёзных микобактерий. Особенно важным достоинством данных тест-систем является то, что «испытываемые» препараты используют в нескольких микроразведениях.

В то же время, у клиницистов возникает вопрос, как интерпретировать полученные с помощью тест-системы MycoTB значения МИК ПТП. Доктор V. LaBombardi из Mount Sinai Medical Center (New York, USA), исходя из своего практического опыта, разработал критерии, позволяющие выявить штаммы *M. tuberculosis* с низким уровнем устойчивости к ПТП и любезно поделился своими наработками. V. LaBombardi полагает, что основываясь на значениях МИК лекарственных препаратов, клиницисты могут выбрать оптимальный для больного режим лечения.

В Центре в системе MycoTB оценивали чувствительность/устойчивость *M. tuberculosis* к 12 препаратам I и II ряда (стрептомицин, изониазид, рифампицин, этамбутол, рифабутин, ПАК, этионамид, циклосерин, офлоксацин, моксифлоксацин, аминацин, канамицин) [5].

В результате проведенного сравнительного анализа определения ЛЧ *M. tuberculosis* к этим химиопрепаратам с помощью тест-системы MycoTB, автоматизированной системы Bactec 960 и метода абсолютных концентраций (АК) на плотной среде Левенштейна-Йенсена было установлено:

- Имеет место высокий процент совпадений данных, полученных при определении ЛЧ с помощью MycoTB и других (ранее применявшихся) методов.
- Тест-система MycoTB имеет преимущества, связанные со стандартизацией процесса (химиопрепараты внесены в лунки планшетов) и возможностью определения степени устойчивости изолята *M. tuberculosis*, так как используются несколько концентраций препарата.
- Метод определения ЛЧ с помощью тест-системы MycoTB существенно превосходит по скорости метод АК. Он также

имеет преимущества перед BACTEC 960, так как в последнем случае определение ЛЧ осуществляется последовательно, вначале к препаратам первого ряда и только после получения результатов – второго ряда. Кроме того, метод значительно проще технически, чем исследования в системе BACTEC 960.

Подобным же образом, в системе MycoTB «Sensititre» была изучена чувствительность медленнорастущих НТМБ (*M. xenopi*, *M. kansasii*) к 9 и быстрорастущих (*M. chelonae group* и *M. fortuitum group*) к 12 химиопрепаратам. В итоге установлена высокая степень совпадения с результатами, полученными другими (на жидких и плотных средах) методами [10] (о преимуществах данного метода речь шла выше).

Несмотря на то, что существующие бактериологические методы определения ЛЧ микобактерий достаточно эффективны, это не исключает необходимость разработки и применения молекулярно-генетических методов, которые:

- позволяют получить результат в более короткие сроки (1-2 дня), в том числе (при наличии определенного числа микобактерий) до начала культивирования;
- позволяют определить конкретные причины (мутации) развития ЛЧ (что требует, разумеется, особой трактовки).

В Центре для широкого практического применения с целью определения ЛЧ *M. tuberculosis* к основным препаратам I ряда (изониазиду и рифампицину) широко используют молекулярно-генетические тест-системы «ТБ-БИОЧИП» (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) и только к рифампицину «Xpert MTB/RIF» (Cepheid, США). «Xpert MTB/RIF» обладает двумя важными достоинствами, а именно, исключением этапа пробоподготовки диагностического материала, связанного с риском контаминации образцов во время экстракции ДНК, и высокой чувствительностью.

Следует подчеркнуть, что во фтизиатрических лечебных учреждениях, где проводится диагностическая бронхоскопия, применение «Xpert MTB/RIF» позволяет с высокой чувствительностью за 2,5 часа получить сведения о наличии *M. tuberculosis* устойчивых к рифампицину (суррогатному маркеру МЛУ) в БАЛ и бронхиальных смывах пациентов (где другие молекулярные тесты малоэффективны). Однако существует недостаток, связанный, прежде всего, с самой технологией применения ПЦР в реальном времени для определения лекарственной чувствительности. Метод имеет ограничения в анализе количества исследуемых генов ДНК *M. tuberculosis* и/или смысловых замен (мутаций). В то же время, изониазид является широко применяющимся ПТП, определение чувствительности к которому крайне важно. Монорезистентность *M. tuberculosis* к изониазиду развивается гораздо быстрее, чем к рифампицину.

В Центре проведен сравнительный анализ эффективности тест-систем «Xpert MTB/RIF», «ТБ-БИОЧИП» и «GenoType MTBDRplus» по выявлению *M. tuberculosis* и определению их

лекарственной чувствительности для ускоренной лабораторной диагностики туберкулеза. Совпадение с результатами бактериологического определения лекарственной чувствительности к рифампицину для «Xpert MTB/RIF», рифампицину и изониазиду для «ТБ-БИОЧИП» и «GenoType MTBDRplus» составило 100,0%, 97,4% и 100,0% соответственно [12].

Для оценки ЛЧ к препаратам резервного ряда (фторхинолоны, аминогликозиды) используют две тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» (ООО «БИОЧИП – ИМБ», Россия) и «GenoType MTBDRsl» (Hain Lifescience GmbH, Германия), принадлежащие к технологиям гибридизационного анализа на биочипах и на стрипах GenoType®.

«ТБ-БИОЧИП-2» позволяет выявлять 9 типов мутаций, определяющих устойчивость к фторхинолонам в области гена *gyrA* *M. tuberculosis*. Чувствительность и специфичность метода составляет 93,3% и 100,0% соответственно [12, 21]. Совпадение результатов с бактериологическим определением чувствительности к фторхинолонам в респираторном материале составляет 93,3%, в культурах – 98,2% [21].

Тест «GenoType MTBDRsl» позволяет определять лекарственную чувствительность *M. tuberculosis* к фторхинолонам по анализу 6 мутаций в гене *gyrA*, к аминогликозидам по 2 мутациям в гене *rrs* и этамбутолу по 2 мутациям в гене *embB*. Чувствительность и специфичность теста по данным F. Brossier и соавт. (2010) 87,0% и 96,0% для фторхинолонов; 100,0% для амикацина; 77,0% и 100,0% для канамицина; 80,0% и 98,0% для капреомицина и 57,0% и 92,0% для этамбутола соответственно [23].

Молекулярно-генетические технологии, основанные на методе гибридизационного анализа на стрипах, или молекулярные биочипы обладают важными преимуществами, поскольку позволяют анализировать одновременно большинство или все известные мутации, связанные с развитием устойчивости *M. tuberculosis* к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам, аминогликозидам и др. препаратам.

Для молекулярного определения лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к фторхинолонам и аминогликозидам с помощью данных тестов можно проводить анализ только генов *gyrA* и *rrs* соответственно, что недостаточно, так как приводит к получению ложноотрицательных результатов. Избежать это можно, изучая и другие гены (*gyrB*, *eis*), мутации в которых также ответственны за формирование лекарственной устойчивости к этим группам препаратов.

В Центре было также проведено исследование по анализу мутаций в генах *gyrA* с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2» и *gyrB* методом конформационного полиморфизма длин одноцепочечных фрагментов (SSCP). В случае обнаружения конформационного отличия на электрофореграмме анализируемого образца от контроля (чувствительный штамм H₃₇Rv) проводили секвенирование. Исследования подтвердили, что

значительное количество мутаций сосредоточено в гене *gyrA* и в меньшем проценте случаев в *gyrB*. Несмотря на это, исследование одновременно двух генов необходимо для ускоренного и более точного молекулярного определения лекарственной чувствительности МБТ к фторхинолонам, что в свою очередь значительно повышает корреляцию результатов с данными микробиологических исследований [12].

На сегодняшний день единственной доступной коммерческой тест-системой, позволяющей выявлять мутации в генах, ответственных за устойчивость *M. tuberculosis* к инъекционным ПТП резервного ряда, является GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience, Германия), однако с ее помощью можно определить только замены A1401G и G1484T в гене *rrs*.

В Центре анализ мутаций в гене *rrs* проводили с помощью GenoType MTBDRsl, промоторную область гена *eis* изучали с помощью метода SSCP. Для определения типа мутаций в *eis* проводили секвенирование тех образцов ДНК, в которых на электрофореграмме были выявлены конформационные отличия от контроля (чувствительный штамм H₃₇Rv). Все изоляты, устойчивые к капреомицину, содержали мутацию A1401G в *rrs* гене. Изоляты с генотипами A1401G, G10A в обоих генах были также устойчивыми к обоим препаратам. Установлена абсолютная перекрестная устойчивость культур к канамицину и капреомицину с заменой A1401G в *rrs* гене. В то же время кросс-резистентность между этими препаратами не наблюдалась в изолятах с мутациями в промоторной области гена *eis* [12].

В итоге молекулярный анализ промоторной области гена *eis* *M. tuberculosis* позволил идентифицировать 26,0% изолятов, устойчивых к канамицину, дополнительно к 74,0% изолятам с мутациями в гене *rrs*. Можно с уверенностью сказать, что промоторная область гена *eis* является перспективным молекулярным маркером устойчивости *M. tuberculosis* к канамицину, а исследование только гена *rrs* не позволяет получить полностью достоверную информацию о наличии устойчивости к этому препарату.

Таким образом, можно с уверенностью сказать, что молекулярно-генетические технологии вошли в лабораторную диагностику туберкулеза и являются в настоящее время неотъемлемой частью «микобактериологических» исследований. За относительно короткий период с начала применения первых молекулярных диагностикомов на основе метода ПЦР, позволяющих быстро (в течение нескольких часов) выявлять *M. tuberculosis* непосредственно в диагностическом материале пациента и проводить внутривидовую идентификацию, были внедрены новые молекулярные технологии – биологические микрочипы, ПЦР в реальном времени и ряд других методов. С их помощью решают более сложные задачи, в частности выявление устойчивых штаммов возбудителя к противотуберкулезным препаратам и видовую идентификацию нету-

беркулезных микобактерий. Кроме того, с развитием роботизированной техники и компьютерных технологий появляются более сложные приборы, позволяющие минимизировать ручной труд и тем самым повысить качество исследований.

Заключение

Сегодня существуют серьезные возможности, как для «этиологической» диагностики туберкулеза и микобактериозов, так и для определения лекарственной чувствительности возбудителей этих заболеваний. В плане диагностики туберкулеза в настоящее время во многих лабораториях практически отказываются от культивирования микобактерий на плотных средах и используют для этих целей автоматизированные системы с жидкими средами. Если речь идет о мокроте и большинстве других видов биологического материала – это BACTEC 960, а крови – в первую очередь, BACTEC 2050 (реже VersaTREK).

Для идентификации *M. tuberculosis* сегодня, наряду с бактериоскопией, используют различные молекулярно-генетические методы, которые часто позволяют обнаружить микобактерии не только после получения культуры, но и сразу в клиническом материале (мокроте и др.). Подобным же образом идентифицируют и нетуберкулезные микобактерии. Иммунологические методы, в первую очередь серологические (определение антигенов и антител), сегодня, несмотря на очень большую историю их использования, не находят существенного применения из-за невысокой специфичности и/или чувствительности (в разных ситуациях). Клеточные тесты *in vitro*, основанные, главным образом, на оценке продукции ИФН-γ, с использованием антигенов, специфических для *M. tuberculosis*, в настоящее время находят свою нишу – в первую очередь, в тех ситуациях, когда может быть высказано предположение о латентной туберкулезной инфекции.

Что касается определения лекарственной чувствительности микобактерий, то сегодня, ранее широко применявшиеся культуральные (в плотных средах) и биохимические методы в крупных, хорошо оснащенных лабораториях практически не используют. Лекарственную чувствительность, как правило, определяют на жидких средах (в автоматизированных системах). Среди таких методов, в первую очередь, тест-система Sensititre (MycobTB), основанная на микроразведениях. Подобную же тест-систему используют и для определения лекарственной чувствительности нетуберкулезных микобактерий. Широкое применение сегодня находят молекулярно-генетические методы оценки ЛЧ. Для препаратов I ряда – это «ТБ-БИОЧИП-1» и «GeneXpert MBT/RIF», а для резервных, в том числе фторхинолонов и аминогликозидов – «ТБ-БИОЧИП-2» и «GenoType MTBDRsl».

Литература

1. Борисов С.Е., Лукина Г.В., Слогоцкая Л.В. и др. Скрининг и мониторинг туберкулёзной инфекции у ревматологических больных, получающих генно-инженерные биологические препараты // Туберкулёз и болезни легких. – 2011. – № 6. – С. 42-50.
2. Дорожкова И.Р., Фрейман Г.Е., Мороз А.М. Централизованная микобактериологическая лаборатория – необходимый компонент фтизиатрической службы крупных городов России // Пробл. туб. – 2007. – №10. – С. 40-43.
3. Дорожкова И.Р., Фрейман Г.Е., Макарова М.В., Литвинов В.И. Микробиологические исследования во фтизиатрии и централизованная микобактериологическая служба // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И.Литвинова, А.М.Мороза, – М.:ЗАО «Информационные технологии в медицине» – 2013. – С. 45-79.
4. Земскова З.С., Дорожкова И.Р. Скрыто протекающая туберкулёзная инфекция. – М.:Медицина. – 1984. – 224 с.
5. Исаева Ю.Д., Крылова Л.Ю., Макарова М.В., Букатина А.А., Гикало М.Б. Сравнительное изучение определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёза с помощью тест-системы Sensititre MucosTB и других культуральных методов // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И.Литвинова, А.М.Мороза, – М.:ЗАО «Информационные технологии в медицине» – 2013. – С. 111-120.
6. Исаева Ю.Д., Крылова Л.Ю., Букатина А.А., Макарова М.В., Мороз А.М. Выявление *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И.Литвинова, А.М.Мороза, – М.:ЗАО «Информационные технологии в медицине» – 2013. – С. 121-141.
7. Литвинов В.И., Макарова М.В., Краснова М.А. Нетуберкулёзные микобактерии. – М.:ЗАО «Информационные технологии в медицине» – 2008. – 254 с.
8. Литвинов В.И. Латентная туберкулёзная инфекция – иммунологические и другие аспекты // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – М. – 2011. – т.15. – № 1. – С. 17-31.
9. Литвинов В.И., Куликовская Н.В., Ванеева Т.В. Иммунодиагностика туберкулёза. Современные методы выявления антигенов и антител. Проточная цитометрия // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И.Литвинова, А.М.Мороза, – М.:ЗАО «Информационные технологии в медицине» – 2013. – С. 201-225.
10. Литвинов В.И., Макарова М.В., Краснова М.А. Нетуберкулёзные микобактерии и диагностика микобактериозов // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И.Литвинова, А.М.Мороза, – М.:ЗАО «Информационные технологии в медицине» – 2013. – С. 257-280.
11. Митинская Л.А. Туберкулёз у детей. – М.:ЗАО «Кудесники». – 2004. – 196 с.
12. Носова Е.Ю., Краснова М.А., Букатина А.А., Гикало М.Б. Молекулярно-генетические исследования в лабораторной диагностике туберкулёза и определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* // В кн.: Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И.Литвинова, А.М.Мороза, – М.:ЗАО «Информационные технологии в медицине» – 2013. – С. 142-169.
13. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. – СПб.:Мед. пресса. – 2005. – 224 с.
14. Слогоцкая Л.В., Литвинов В.И., Филиппов А.В. и др. Чувствительность нового кожного теста «ДИАСКИНТЕСТ®» при туберкулёзной инфекции у детей и подростков // Пробл. туб. и болезней легких. – М. – 2010. – №1. – С. 10-15.
15. Степаншина В.Н., Низова А.В., Мухина Т.Н. и др. Определение критических концентраций канамидина, капреомицина и офлоксацина, используемых для оценки лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена // Методические рекомендации. ФГУН ГНЦПМБ. М. – 2009. – 12 с.
16. Ahmad S. Pathogenesis, immunology and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection // *Clinical and Developmental Immunology*. – 2010. – P. 1-17.
17. Al-Orainey I. Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? // *Ann. Thorac. Med.* – 2009. – V. 4(1). – P. 5-9.
18. Altet-Gomez N., De Souza-Galvao M., Latorre I. et al. Diagnosing TB infection in children: analysis of discordances using in vitro tests and the tuberculin skin test // *Eur. Respir. J.* – 2011. – V. 5. – P. 1166-1174.
19. American Thoracic Society Target tuberculin Testing and treatment of latent tuberculosis infection MMWR Recommend Rep. – 2000. – V. 49. – P. 1-51.
20. Andersen P., Doherty T., Pai M. et al. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? // *Trends Mol. Med.* – 2007. – V. 13. – P. 175-182.
21. Antonova O., Gryadunov D., Lapa S. et al. Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips. // *Bull Exp Biol Med.* – 2008. – V. 145. – P. 108-13.
22. Bergamini B., Losi M., Vaienti F. et al. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents // *Pediatrics*. – 2009. – V. 123. – P. 419-424.
23. Brossier F., Veziris N., Aubry A., et al. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – V. 48. – P. 1683-1689.
24. Carrara S., Vincenti D., Petrosillo N. et al. Use of a T-cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – V. 38. – P. 754-756.
25. CLSI. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard – second edition // CLSI document M24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2011.
26. Farmer P., Bayona J., Becerra M. et al. The dilemma of MDR-TB in the global era // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 1998. – V. 2. – P. 869-876.
27. Griffith D., Aksamit T., Brown-Elliott B. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2007. – V. 175. – P. 367-416.
28. Hall L., Jude K., Clark S. et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtitre plate format // *J. Vis. Exp.* – 2011. – V. 24(52). – P. 3094. doi: 10.3791/3094.

29. Heifets L. *Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria* // *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2004. – V. 25. – P. 283-295.
30. Hussain R., Talat N., Shahid F. et al. *Longitudinal tracking of cytokines after acute exposure to tuberculosis: association of distinct cytokine patterns with protection and disease development* // *Clin. Vaccine Immunol.* – 2007. – V. 14. – P. 1578-86.
31. Krüüner A., Yates M., Drobniewski F. *Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentration of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of Mycobacterium tuberculosis* // *Clinical Microbiology*. – 2006. – V. 44(3). – P. 811-818.
32. Laal S., Skeyiky Y. *Immune based methods* // In: *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. Cole S. (ed). – ASM press, Vashington, DC. – 2005. – P. 71-83.
33. Latorre I., De Souza-Galvao M., Ruiz-Manzano J. et al. *Quantitative evaluation of T-cell response after specific antigen stimulation in active and latent tuberculosis infection in adults and children* // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – V. 65. – P. 236-246.
34. Leung W., Law K., Leung V. et al. *Comparison of intracellular cytokine flow cytometry and an Enzyme immunoassay for evaluation of cellular immune response to active tuberculosis* // *Clinical and Vaccine Immunology*. – Mar. – 2009. – P. 344 – 351.
35. Menzies D., Pai M., Comstock G. *Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research* // *Ann. Intern. Med.* – 2007. – V. 146. – P. 340-354.
36. NCCLS. *Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; approved standard- second edition*. CLAI document M24-A2, Wayne, Pa. – 2011.
37. Rüsç-Gerdes S., Pfyffer G., 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* // *Clinical Microbiology*. – 2006. – V. 44(3). – P. 688-692.
38. Steingart K., Henry M., Laal S. et al. *A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis extrapulmonary tuberculosis* // *Thorax*. – 2007. – V. 62. – P. 911-918.
39. Wallace R., Glassroth J., Griffith D. et al. *Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria (American Thoracic Society Statement)* // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 1997. – V. 156. – P. 1-25.
40. Winthrop K. *Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria: an epidemiologist's view* // *Future Microbiol.* – 2010. – V. 5(3). – P. 343 –345.
41. Woo P., Lau S., Teng J. et al. *Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories* // *Clin Microbiol Infect.* – 2008. – V. 14. – P. 908-934.
42. Wood R., Racow K., Bekker L. et al. *Lipoarabinomannan in urine during tuberculosis treatment: association with host and pathogen factors and mycobacteriuria* // *BMC Infect Dis.* – 2012. – V. 12. – p 47-62.

Сведения об авторе

Литвинов Виталий Ильич – научный руководитель Государственного казенного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН

Адрес: г. Москва, 107014, ул. Стромынка, дом 10

Тел. (499) 268-00-05. Факс (499) 785-20-82

e-mail: mnpccdir2012@yandex.ru