

СРАВНЕНИЕ КАРТРИДЖНОЙ ТЕХНОЛОГИИ XPERT MTB/RIF С МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

С.Н. Андреевская, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, М.В. Буракова, И.А. Васильева, Л.Н. Черноусова
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва

COMPARISON OF XPERT MBT/RIF CARTRIDGE TECHNOLOGY WITH MICROBIOLOGICAL METHODS FOR MBT DETECTION AND DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING

S.N. Andreevskaya, T.G. Smirnova, E.E. Larionova, M.V. Burakova, I.A. Vasiljeva, L.N. Chernousova

С целью сравнения результатов выявления МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину с использованием тест-системы Xpert MTB/RIF и классическими микробиологическими методами было исследовано 104 образца мокроты, полученных от больных туберкулезом легких из клиники ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН. Кроме того, в задачу исследования входило изучение влияния концентрирования диагностических образцов на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF. Показано, что Xpert MTB/RIF являлся наиболее чувствительным, так как был положительным в 78,2% случаев, по сравнению со световой микроскопией нативной мокроты, выявляющей 48,5% случаев, люминесцентной микроскопией осадка мокроты – 67,3%, культуральным исследованием на среде Левенштейна-Йенсена – 56,4% и на BACTEC MGIT 960 – 71,3%. Концентрирование образца мокроты не оказывало существенного влияния на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF. Образцы, в которых были выявлены НТМ, при использовании теста Xpert MTB/RIF были зафиксированы как отрицательные, что свидетельствует о высокой специфичности метода. Было показано полное совпадение результатов определения устойчивости к рифампицину на биологических микрочипах и в системе Xpert MTB/RIF.

Ключевые слова: технология Xpert MTB/RIF, сравнение с данными микробиологических исследований BACTEC MGIT 960

104 sputum samples obtained from the patients with pulmonary tuberculosis in the Central Research Institute for Tuberculosis of the Russian Academy of Medical Sciences were studied in order to compare the results of MBT detection and identification of drug susceptibility to rifampicin using test system Xpert MBT/RIF and classical microbiological methods. In addition, the aim of the research was to study the effect of concentrating of diagnostic specimens to an increase of the test Xpert MBT/RIF sensitivity. The Xpert MBT/RIF demonstrated most sensitivity with positive results in 78,2% of cases to compare with the native light microscopy of sputum, detecting 48,5% of cases, fluorescent microscopy of sputum sediment – 67,3%, cultural method with Lowenstein-Jensen medium – 56,4% and on BACTEC MGIT 960 – 71,3%. Concentration of sputum samples had no significant effect on the increase of the test sensitivity. Samples with identified non-tuberculous mycobacteria by the test Xpert MTB/RIF were recorded as negative ones, showing high specificity of the method. Complete coincidence of the results of rifampicin resistance detection using biological microchips and the system Xpert MBT/RIF was found.

Keywords: Xpert MBT/RIF technology, comparison with the data of microbiological examination on BACTEC MGIT 960.

Введение

В Российской Федерации за последнее десятилетие зарегистрирован неуклонный рост туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ). Так с 2004 по 2012 гг., на фоне снижения заболеваемости (с 83,3 до 68,1 случаев на 100 тыс. населения) и распространенности туберкулеза (с 218,3 до 157,7 случаев на 100 тыс. населения), распространенность МЛУ-ТБ выросла почти в 2 раза (с 14,2 до 24,6 на

100 тыс. населения) [1, 2]. Быстрое выявление МЛУ-ТБ необходимо для своевременного распределения потоков поступающих больных (МЛУ / не-МЛУ) и направления их в специализированные отделения, где они будут получать оптимальную терапию. Для ускоренного выявления МЛУ-ТБ в настоящее время широко применяют молекулярно-генетические методы, направленные на выявление мутаций в геноме микобактерий туберкулеза (МБТ), обуславливающих устойчивость

к рифампицину и изониазиду, а нередко и только к рифампицину, так как устойчивость к рифампицину считается надежным индикатором МЛУ МБТ.

Тест Xpert MTB/RIF™, проводимый с помощью анализатора GeneXpert™ (Cepheid, США) – это новый полностью автоматизированный метод молекулярной диагностики для выявления ДНК МБТ и определения устойчивости к рифампицину. Данный тест был одобрен ВОЗ в декабре 2010 г. Тест Xpert MTB/RIF основан на полимеразной цепной реакции (ПЦР). В нем используется картридж с системой замкнутого цикла, благодаря чему можно одновременно выявлять ДНК МБТ и определять устойчивость к рифампицину через 2 часа после получения диагностического материала от больного.

Цель работы – сравнение результатов выявления МБТ и определения чувствительности к рифампицину с использованием тест-системы Xpert MTB/RIF, классическими микробиологическими методами (микроскопия нативного и концентрированного образцов мокроты, культуральное исследование образцов на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена) и в системе автоматического определения роста BACTEC MGIT 960 (BD, США), а также изучение влияния концентрирования диагностических образцов на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF.

Материалы и методы

Диагностический материал. 104 образца мокроты от больных туберкулезом легких из клиники Центрального НИИ туберкулеза РАМН. Все исследования проводили из одной и той же порции диагностического материала.

Микроскопия с окраской по Ziehl-Neelsen. Для данного исследования использовали нативную мокроту. Приготовление растворов для окраски и процедуру окрашивания проводили согласно Приказу Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3]. Исследовали мазки с помощью микроскопа Olympus CKX 41 с увеличением 1000х.

Микроскопия с окраской люминесцентными красителями проводилась из осадка мокроты, предварительно разжиженной и деконтаминированной раствором BBLMycoPrepNALC-NaOH (BD, США). Мазки окрашивали аурамином ОО и родамином С (Приказ Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3]). Микроскопию мазков осуществляли при помощи микроскопа Olympus CKX 41 с увеличением 400х.

Выявление МБТ на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) осуществляли при культивировании осадка мокроты, предварительно разжиженной и деконтаминированной раствором BBLMycoPrepNALC-NaOH (BD, США), согласно Приказу Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3].

Культуральный метод выявления МБТ на жидких средах в системе BACTEC MGIT 960 (BD, USA) проведен согласно стандартному протоколу изготовителя [4]. Все положительные

культуры подвергали контролю на видовую специфичность (принадлежность к МБТ). Для определения кислотоустойчивости выросшей культуры проводили микроскопию мазков по Ziehl-Neelsen [3]. Если в положительной пробирке MGIT подтверждалось присутствие кислотоустойчивых бактерий, проводили иммунохроматографический экспресс-тест BD MGIT TB с ID для качественного определения антигена комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (МБТК) МРТ64. Тест проводили согласно инструкции изготовителя. При положительном результате теста делается вывод о присутствии в образце МБТК. При отрицательном результате теста и положительном результате микроскопии с окраской по Ziehl-Neelsen делали вывод о наличии кислотоустойчивых бактерий, не относящихся к МБТК. В этом случае использовали ДНК-стриповую технологию (HainLifescience), включающую два вида тестов для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий (НТМБ): GenoType *Mycobacterium* CM/AS. Исследование проводили согласно инструкции изготовителя. Для контроля роста в системе BACTEC MGIT 960 неспецифической микрофлоры проводили посев культуры на кровяной агар. При наличии роста микроорганизмов на кровяном агаре через 24 часа инкубации при 37°C делали вывод о контаминации исследуемого материала неспецифической микрофлорой.

Определение лекарственной чувствительности МБТ методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена проводили согласно Приказу Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3].

Определение лекарственной чувствительности МБТ с использованием автоматизированной системы BACTECMGIT 960 к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда осуществляли согласно стандартному протоколу производителя (BD, США) [4].

Выявление МБТ и определение чувствительности к рифампицину с использованием теста XpertMTB/RIF. Исследование выполняли с помощью набора реагентов и картриджей Xpert MTB/RIF на анализаторе GeneXpert (Cepheid, США), согласно инструкции изготовителя. Для исследования использовали как образцы нативной мокроты, так и осадок мокроты, предварительно разжиженной и деконтаминированной раствором BBLMycoPrepNALC-NaOH (BD, США).

Определение чувствительности к изониазиду и рифампицину на биологических микрочипах осуществляли с использованием набора «ТБ-биочип» (ООО Биочип, Россия), согласно инструкции изготовителя. Выделение ДНК проводили в роботизированной системе для автоматического раскапывания жидкостей EVO 150 (TECAN, Швеция) с набором реагентов «М-Сорб-Туб-Автомат» (НПК «Синтол», Россия) согласно инструкции изготовителя. Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклере «Терцик» (ДНК-Технология, Россия), инкубацию биочипов для осуществления гибридизации проводили в гибридизационной печи LabLine

Табл. 1. Несовпадения при выявлении МБТ с использованием теста Xpert MTB/RIF

№ культуры	Результат выявления					
	Xpert MTB/RIF		Световая микроскопия нативной мокроты	Люминесцентная микроскопия осадка мокроты	Посев на среду Л-Й	БАСТЕС MGIT 960
	нативная мокрота	осадок мокроты				
8 CDC	+	–	–	9 КУМ	–	–
27 CDC	+	–	–	–	–	–
56 CDC	–	+	–	–	+	+
98 CDC	–	+	–	–	–	+

– – отрицательный результат
+ – положительный результат

(LabLine, США), визуализацию результатов осуществляли с использованием чип-детектора и программного обеспечения, разработанного ООО «Биочип».

Результаты

Сравнение выявления МБТ с использованием теста Xpert MTB/RIF и микробиологическими методами. При микроскопии нативного образца мокроты, окрашенного по Ziehl-Neelsen, в 54 образцах не было обнаружено КУМ, в шести образцах визуализировались единичные КУМ, в 14 образцах содержание КУМ соответствовало «1+», в 13 – «2+» и в 17 – «3+». Таким образом, методом световой микроскопии было выявлено 50 образцов, содержащих КУМ.

Микроскопия осадка мокроты с окраской люминесцентными красителями выявила 72 образца, содержащие КУМ. Из них в 10 случаях визуализировались единичные КУМ, содержание КУМ на «1+» было выявлено в 13 образцах, на «2+» – в 14 образцах и на «3+» в 35 образцах.

При культивировании диагностических образцов на среде Левенштейна-Йенсена не было получено роста культуры в 44 случаях, в трех были зафиксированы проросты вследствие контаминации посторонней микрофлорой. Для 57 образцов мокроты был получен специфический рост на среде.

При исследовании клинического материала в системе автоматической регистрации роста BACTEC MGIT 960 32 образца были зарегистрированы как отрицательные, 72 – как положительные. Идентификация культур показала, что три из них представляли собой НТМБ (одна культура *M. avium* и две культуры *M. kansasii*).

При тестировании образцов мокроты в анализаторе GeneXpert с тест-системой Xpert MTB/RIF было выявлено по 77 положительных образцов, как при использовании для анализа нативной мокроты, так и при работе с осадком мокроты. В четырех случаях результаты выявления МБТ в нативной мокроте и в осадке не совпали: два образца, зафиксированные как положительные при анализе нативной мокроты, были отрицательны при работе с осадком, а еще два образца, наоборот, были положительными при анализе осадка мокроты, но отрицательными в случае исследования нативной мокроты (табл.1).

При сравнении не совпавших результатов теста Xpert MTB/RIF, полученных при разных способах обработки образцов, с бактериологическими методами было показано, что положительный результат в двух случаях (образцы 8 CDC и 98 CDC) был получен только одним из бактериологических методов, а для образца 27 CDC положительным был только тест Xpert MTB/RIF. Полученные результаты свидетельствуют о низком содержании МБТ в образце и отражают вероятностный процесс попадания в анализ микобактериальных клеток. Однозначного влияния концентрирования мокроты на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF не отмечено.

Если учитывать суммарный результат теста, т.е. считать его положительным, если положительное значение было получено при анализе хотя бы одного из вариантов образца, то использование Xpert MTB/RIF позволило выявить 79 положительных образцов. Далее при сравнении результатов теста Xpert MTB/RIF с микробиологическими методами будут учитываться суммарные результаты теста.

При сравнении чувствительности методов из анализа были исключены образцы, представленные НТМБ. Положительные результаты бактериоскопии считали специфическими только при их подтверждении культуральными исследованиями или тестом Xpert MTB/RIF. Поэтому число положительных результатов световой микроскопии снизилось на один, т.к. в этом образце была обнаружена *M. avium*, а число положительных результатов люминесцентной микроскопии осадка мокроты сократилось на четыре, так как в одном случае также была выявлена *M. avium*, а в трех случаях результат не был подтвержден ни одним методом, что свидетельствовало о наличии в мазке посторонней кислотоустойчивой флоры. Результаты сравнения чувствительности методов представлены в таблице 2.

Сравнение результатов выявления МБТ разными методами показало, что суммарно тест Xpert MTB/RIF выявил дополнительно 30 положительных образцов по сравнению с микроскопическим исследованием нативного образца мокроты, 11 образцов по сравнению с люминесцентной микроскопией осадка, 22 по сравнению с результатами посева на среду Левенштейна-Йенсена и 7 – по сравнению с исследованием в системе BACTEC MGIT 960.

Табл. 2. Сравнение чувствительности методов выявления МБТ

Метод	Число положительных результатов (из 101 образца)	% выявления
Световая микроскопия нативной мокроты	49	48,5
Люминесцентная микроскопия осадка мокроты	68	67,3
Культуральное исследование на среде Левенштейна-Йенсена	57	56,4
Культуральное исследование в системе BACTEC MGIT 960	72	71,3
Тест Xpert MTB/RIF (нативная мокрота)	77	76,2
Тест Xpert MTB/RIF (осадок мокроты)	77	76,2
Тест Xpert MTB/RIF (суммарные результаты)	79	78,2

Только в одном случае результаты теста Xpert MTB/RIF были отрицательным при положительном результате BACTEC MGIT 960 (результаты бактериоскопии и культурального исследования на среде Левенштейна-Йенсена были для этого образца также отрицательными).

Таким образом, было показано, что тест Xpert MTB/RIF наиболее чувствителен среди всех представленных методов, особенно по сравнению с бактериоскопией нативной мокроты и культуральным исследованием на среде Левенштейна-Йенсена.

Следует отметить, что образцы, в которых были выявлены НТМБ, при использовании теста Xpert MTB/RIF были расценены как отрицательные, что свидетельствует о высокой специфичности метода.

Сравнение определения чувствительности к рифампицину с использованием теста Xpert MTB/RIF и культуральными методами. Анализ определения устойчивости к рифампицину с использованием теста Xpert MTB/RIF показал, что результаты, полученные для нативной мокроты и для осадка мокроты, полностью совпадали между собой для каждого образца. Суммарно этим методом было определено, что 24 положительных образца чувствительны, а 55 – устойчивы к рифампицину.

Сравнение определения чувствительности к рифампицину методом Xpert MTB/RIF и культуральными методами показало идентичные результаты.

Расхождения были обнаружены в случае несовпадения культурального определения лекарственной чувствительности к рифампицину методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена и в системе BACTEC MGIT 960. Так, для одного образца, определенного тестом Xpert MTB/RIF как устойчивый к рифампицину, устойчивость была подтверждена методом абсолютных концентраций, но в системе BACTEC MGIT 960 культура была определена как чувствительная к рифампицину. Для четырех образцов, чувствительных к рифампицину по тесту Xpert MTB/RIF, результат был подтвержден на BACTEC MGIT 960, но методом абсолютных концентраций культуры были определены как устойчивые к рифампицину.

Для этих пяти спорных образцов, а также для восьми образцов, положительных по данным теста Xpert MTB/RIF (три устойчивых и пять чувствительных к рифампицину), но отрицательных при проведении культуральных исследований, в целях

подтверждения полученных результатов были определены мутации на биологических микрочипах «ТБ-биочип» и было показано полное совпадение результатов, полученных этими методами.

Кроме того, для всех образцов (за исключением одного), которые по результатам теста Xpert MTB/RIF были устойчивы к рифампицину, культуральными методами была выявлена устойчивость к изониазиду, что подтверждает возможность использования устойчивости к рифампицину в качестве маркера МЛУ МБТ.

Заключение

При сравнении результатов выявления МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину с использованием тест-системы Xpert MTB/RIF и классическими микробиологическими методами на 104 образцах мокроты больных туберкулезом легких (диагностированным на основании клинических и рентгенологических данных) показано, что тест Xpert MTB/RIF являлся наиболее чувствительным, так как был положительным в 78,2% случаев, по сравнению со световой микроскопией нативной мокроты (48,5% положительных результатов), люминесцентной микроскопией осадка мокроты (67,3%), культуральным исследованием на среде Левенштейна-Йенсена (56,4%) и на BACTEC MGIT 960 (71,3%). Концентрирование образца мокроты не оказывало существенного влияния на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF.

Образцы, в которых были выявлены НТМБ, при использовании теста Xpert MTB/RIF были расценены как отрицательные, что свидетельствует о высокой специфичности метода.

Определение чувствительности к рифампицину с использованием теста Xpert MTB/RIF подтверждалось, по крайней мере, одним культуральным методом. В случае несовпадения результатов определения устойчивости к рифампицину, полученных культуральными методами, а также для образцов, положительных при использовании теста Xpert MTB/RIF, для которых не было получено культуры, проводили исследование на биологических микрочипах. Было показано полное совпадение результатов устойчивости к рифампицину на биологических микрочипах и в системе Xpert MTB/RIF.

Таким образом, в результате проведенного исследования доказана высокая степень совпадения результатов теста Хpert MTB/RIF с микробиологическими методами при выявлении МБТ и определении их лекарственной чувствительности и подтверждена высокая чувствительность теста Хpert MTB/RIF.

Работа была поддержана грантом «Влияние на лечение туберкулеза стратегии, основанной на внедрении Хpert MTB/RIF исследовании» RUB1-31073-MO-11 CRDF 2012 – 2012.

Литература

1. Туберкулез в Российской Федерации 2011 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – М., 2013. – 280 с. (<http://www.mednet.ru/images/stories/files/CMT/tbreview2011.pdf>).
2. Нечаева О.Б. Ситуация по туберкулезу и работе противотуберкулезной службы Российской Федерации в 2012 г. (<http://www.mednet.ru>).
3. Приказ Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
4. Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. Руководство по работе с системой BACTEC MGIT 960, 2006.

Сведения об авторах

Андреевская Софья Николаевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, кандидат медицинских наук
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91
e-mail: andsofia@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, кандидат медицинских наук
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91

Ларионова Елена Евгеньевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, кандидат биологических наук
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91

Буракова Марина Владимировна – врач-фтизиатр, младший научный сотрудник отдела фтизиатрии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.

Васильева Ирина Анатольевна – руководитель отдела фтизиатрии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук, профессор
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
e-mail: vasil39@list.ru

Черноусова Лариса Николаевна – руководитель отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, доктор биологических наук, профессор
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91