

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

С.Г. Сафонова, Е.Ю. Носова, К.Ю. Галкина, И.Р. Дорожкова

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

MODERN CONCEPT OF EXPRESS DIAGNOSTICS AND DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS BY BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC METHODS

S.G. Safonova, E.Yu. Nosova, K.Yu. Galkina, I.R. Dorozhkova

Разработан и внедрен в повседневную практику алгоритм микобактериологического и молекулярно-генетического обследования пациентов, применяемый для диагностики туберкулеза и микобактериозов в Московском научно-практическом Центре борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы.

*Исследование единого посевого осадка диагностического материала с применением молекулярно-генетических методов позволяет уже через 48 часов предвидеть наличие МЛУ и/или ШЛУ *M. tuberculosis* и при получении роста МБТ из диагностического материала на жидкой питательной среде (BACTEC™ MGIT™ 960) проводить ускоренное определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) к препаратам I и/или II ряда.*

Такая практика позволяет провести полноценное лабораторное обследование пациента и получить результаты посева и определения ЛЧ к препаратам I и/или II ряда в течение менее одного месяца.

Ключевые слова: *микобактерии туберкулеза, диагностика туберкулеза, современные ускоренные микробиологические и молекулярно-диагностические методы*

Введение

Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу среди постоянного населения г. Москвы в последние годы не только стабилизировалась, но и наметилась тенденция к ее улучшению [6]. К снижению числа впервые выявленных больных с деструктивными формами туберкулеза и прерыванию эпидемиологической цепочки распространения инфекции привело, в частности, применение ускоренных методов диагностики и раннего выявления бактериовыделителей.

An algorithm of mycobacteriological and molecular-genetic examinations of patients applicable for tuberculosis and mycobacteriosis diagnostics was worked out and implemented into the routine practice of Moscow Research and Clinical Center for TB Control of Moscow Government Health Department.

*Investigation of the one whole inoculate by molecular-genetic methods permits to foresee the MDR or XDR drug resistance of *M. tuberculosis* within 48 hours and if there is MTB growth from the sample on a liquid medium (BACTEC™ MGIT™ 960) we can perform accelerate drug susceptibility testing (DST) for the first- and/or second-line antituberculosis drugs.*

Such practice permits to carry out a comprehensive laboratory examination of patients and get the results of inoculation and DST for the first- and/or second-line drugs during a month.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis diagnostics, modern express mycobacteriological and molecular-genetic methods*

Однако в столице сохраняются группы населения, требующие, из-за высокой заболеваемости туберкулезом, пристального внимания как противотуберкулезной службы, так и органов социальной опеки. Кроме того, в течение последних лет в г. Москве отмечен неуклонный рост числа зарегистрированных больных ВИЧ-инфекцией, среди которых имеет место существенное увеличение доли лиц, состоящих под наблюдением у фтизиатра и обследованных на туберкулез – с 13,8% в 2007 г. до 89,8% в 2015 г. [6].

В связи с этим максимально быстрое выявление возбудителя заболевания сохраняет определяющее значение для успеха всего комплекса противотуберкулезных мероприятий.

Одним из самых быстрых и дешевых методов диагностики является микроскопическое исследование, позволяющее выявить в диагностическом материале кислотоустойчивые микобактерии, к числу которых относится и возбудитель туберкулеза. Это дает возможность максимально быстро выявить больных-бактериовыделителей, наиболее опасную в эпидемическом отношении группу пациентов. В то же время диагностическая ценность микроскопии ограничена разрешающей способностью метода. Больные с малыми формами заболевания без деструкции легочной ткани выделяют незначительное количество микобактерий, которое может быть ниже предела обнаружения методом микроскопического исследования [5].

Наиболее достоверным в диагностике туберкулеза является культуральный метод, позволяющий выделять возбудителя даже при наличии в исследуемом материале всего нескольких десятков жизнеспособных клеток. При культуральном исследовании диагностического материала более 50% его отрицательных по данным микроскопического исследования образцов могут давать рост кислотоустойчивых микроорганизмов на питательных средах, как микобактерий туберкулезного комплекса – *M. tuberculosis complex* (МБТ), так и нетуберкулезных микобактерий (НТМБ). По сравнению с микроскопическим исследованием культуральные методы дают возможность определения видовой принадлежности возбудителя и определения чувствительности к основным и резервным препаратам.

Таким образом, до настоящего времени культуральные методы играют ключевую роль в диагностике микобактериальных инфекций. Однако возбудителю туберкулеза свойственно чрезвычайно медленное размножение на плотных питательных средах (классический метод культивирования). Появление роста на плотных питательных средах отмечается в среднем через 3–4 недели после посева, а отрицательный результат выдается только через 10–12 недель культивирования.

В последние десятилетия широко используют автоматизированные системы культивирования на жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9* (ВАСТЕС™ MGIT™ 960, Becton Dickinson). Данные автоматизированные системы высокопроизводительны и предоставляют реальные перспективы для ускоренного выявления возбудителя в течение 5–11 дней, определения его лекарственной чувствительности (ЛЧ) и для повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулеза в целом.

В последние годы в лабораторной микробиологической практике все более широкое применение находят молекулярно-генетические методы, основанные на исследовании ДНК и генных мутаций возбудителя [9, 13, 14]. В этой области также произошли качественные изменения. Появились роботизи-

рованные станции для автоматизации этапа выделения ДНК микобактерий из диагностического материала и культур, который является основным любого молекулярно-генетического исследования. Автоматизация этого процесса позволяет повысить качество проводимых молекулярных исследований за счет исключения негативного влияния «человеческого фактора» и увеличить поток исследований. Усовершенствование непосредственно молекулярных технологий, которые позволяют не только выявлять возбудителя из диагностического материала пациентов, но и определять генетические детерминанты устойчивости к противотуберкулезным препаратам, а также проводить идентификацию нетуберкулезных микобактерий [11, 12]. Это ПЦР в реальном времени, на основе которой создана тест-система Xpert MTB/Rif и гибридационный анализ как на стрипах (MTBDR*plus*, MTBDR*sl*, GenoType Mycobacterium CM/AS), так и на биологических микрочипах («ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2») [3].

Проведенные ранее исследования на диагностическом материале больных туберкулезом и выделенных культурах МБТ показали, что совпадение результатов определения ЛЧ МБТ на ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и тест-системах «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» составило 97,8%, а теста Xpert MTB/Rif – 98,9% [2, 3, 4, 7].

Несомненно, эти методы должны стать обязательным составным компонентом стандартных схем микробиологических исследований и сочетать основанные на фенотипических свойствах возбудителя микробиологические методы (тинкториальные, культуральные, биохимические и др.) и молекулярно-генетические технологии.

В ходе реорганизации противотуберкулезных учреждений в г. Москве на основании положений Порядка оказания медицинской помощи больным туберкулезом [5] и Федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью [8] в централизованной бактериологической лаборатории МНПЦ борьбы с туберкулезом [1] разработан, испытан и поэтапно внедрен в практику унифицированный единый алгоритм обследования пациентов различных категорий с целью ранней диагностики туберкулеза, дифференциации его от микобактериозов и определения лекарственной чувствительности возбудителя.

Материалы и методы исследования

В настоящее время в МНПЦ борьбы с туберкулезом проводится ускоренное микробиологическое обследование следующих групп пациентов:

а) пациенты, обратившиеся в медицинские учреждения общей лечебной сети или противотуберкулезной службы по поводу клинических и/или рентгенологических симптомов, позволяющих заподозрить наличие туберкулезной инфекции;

б) впервые выявленные больные туберкулезом до начала лечения;

в) больные с подозрением и/или с рецидивом заболевания до начала лечения;

г) пациенты указанных выше категорий, нуждающиеся в оценке эффективности проводимого лечения (контроль химиотерапии);

д) больные туберкулезом, прервавшие лечение и не обследованные более двух месяцев;

ж) не обследованные больные, переведенные из других противотуберкулезных учреждений;

з) больные, прошедшие перерегистрацию, которым вновь начато лечение, после досрочного прекращения или неэффективного курса лечения.

Единый алгоритм ускоренного обследования включает проведение следующих микробиологических и молекулярно-генетических исследований из единой порции обработанного осадка диагностического материала:

- люминесцентную микроскопию;
- молекулярно-генетическое исследование осадка диагностического материала с целью предварительного определения наличия лекарственной устойчивости (ЛУ) к основным препаратам I (рифампицин и изониазид) и II (фторхинолонам) ряда. Выделение ДНК из единого осадка диагностического материала осуществляется с использованием автоматизированной станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) и набора реагентов «М-Сорб-Туб» (ООО «НПФ СИНТОЛ», Россия) с последующим выявлением и количественным определением ДНК МБТ с помощью тест-системы «Амплитуб-РВ» методом ПЦР в реальном времени. Определение лекарственной чувствительности МБТ к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам проводится с использованием «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2».

- культуральные исследования на жидкой (в системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960) и плотной (Левенштейна-Йенсена) питательных средах для выделения микобактерий;

- молекулярно-генетическое исследование (с использованием «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2») выделенных культур с целью определения наличия множественной ЛУ и ЛУ к фторхинолонам как критерия для последующего одновременного определения ЛЧ к препаратам I и II ряда на жидкой питательной среде с использованием анализатора ВАСТЕС™ MGIT™ 960.

Для проведения исследований используют фармакопейные субстанции всех препаратов II ряда, для которых были опубликованы критические концентрации в рекомендациях ВОЗ 2014 года.

Определение лекарственной чувствительности МБТ к циклосерину проводят на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена из-за отсутствия сведений о критической концентрации на жидкой питательной среде.

При выделении культуры микобактерий с помощью тестов GenoType Mycobacterium CM/AS и микробиологических методов проводят идентификацию возбудителя (МБТ и/или НТМБ).

Ускоренная диагностика туберкулеза у больных ВИЧ инфекцией проводится с помощью тест-системы в формате картриджа Xpert MTB/RIF, которая позволяет одновременно не только выявлять ДНК МБТ, но и определять ЛУ к рифампицину. Применение теста Xpert MTB/Rif позволяет проводить исследование не только обработанного осадка диагностического материала, предназначенного для посева на жидкие среды, но и материала, полученного от больных туберкулезом различных локализаций (биоптаты, содержимое брюшной полости, содержимое лимфатических узлов, кровь моча, кал и пр.). Данная технология исключает дополнительный этап выделения ДНК, что чрезвычайно важно для работы с различным диагностическим материалом от ВИЧ инфицированных больных. Полный цикл исследования в молекулярном анализаторе до интерпретации результатов занимает 2,5 часа [2, 10].

Программное обеспечение работы осуществляли с помощью лабораторной информационной системы «АЛИСА», разработанной отделом «Лабораторные информационные системы» ЗАО «Фирма Гален» совместно с сотрудниками отдела проблем лабораторной диагностики МНПЦ борьбы с туберкулезом. Программа сертифицирована и обеспечивает регистрацию и анализ результатов микробиологических и молекулярно-генетических исследований централизованной бактериологической лаборатории и отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Результаты исследования

По данным молекулярных исследований за 2014–2015 гг. по единому алгоритму обследования пациентов различных категорий было исследовано 21 708 проб диагностического материала от 10 443 пациентов (4404 пациентов – в 2014 г., 6039 – в 2015 г.). В г. Москве в 2014 г. и 2015 г было зарегистрировано 2699 и 2747 впервые выявленных больных, соответственно. В 2014 г. был исследован диагностический материал и/или культура микобактерий от 781 (28,9%) впервые выявленного больного, в 2015 г. эта цифра достигла 1129 и составила 41,0% от всех зарегистрированных больных этой категории. Результаты представлены в таблице 1.

За указанный период среди обследованных впервые выявленных больных бактериовыделители в среднем составили 53,6%, а доля больных с МЛУ МБТ – 23,3%. При этом из-за недостаточной концентрации ДНК в пробе с помощью молекулярно-генетических методов не удалось определить ЛЧ МБТ в среднем в 11,7% случаев.

С помощью теста Xpert MTB/Rif в 2014 г. исследовано 1183 пробы диагностического материала от 626 пациентов и

Таблица 1. Результаты проведенных в 2014–2015 гг. в рамках единого алгоритма молекулярно-генетических исследований

| Впервые выявленные больные туберкулезом | Количество больных | | | |
|---|--------------------|-------|---------|-------|
| | 2014 г. | | 2015 г. | |
| | абс. | % | абс. | % |
| Всего зарегистрировано | 2699 | 100,0 | 2747 | 100,0 |
| Обследовано по единому алгоритму | 781 | 28,9 | 1129 | 41,1 |
| ДНК МБТ+ | 421 | 53,9 | 603 | 53,4 |
| в том числе: | | | | |
| МБТ с МЛУ | 91 | 21,6 | 148 | 24,5 |
| монорезистентные МБТ | 49 | 11,6 | 83 | 13,8 |
| МБТ, сохранившие чувствительность | 225 | 53,5 | 311 | 51,6 |
| ДНК МБТ+ без ЛЧ | 56 | 13,3 | 61 | 10,1 |

Таблица 2. Результаты проведенных в 2014–2015 гг. исследований диагностического материала от больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез с помощью системы GeneXpert

| Показатели | Количество больных | | | |
|---|--------------------|-------|---------|-------|
| | 2014 г. | | 2015 г. | |
| | абс. | % | абс. | % |
| Всего обследовано | 228 | 100,0 | 294 | 100,0 |
| ДНК МБТ+ | 77 | 33,8 | 78 | 26,5 |
| в том числе: | | | | |
| генотип «рифампицин-устойчивые» | 37 | 48,0 | 33 | 42,3 |
| генотип «рифампицин-чувствительные» | 35 | 45,5 | 40 | 51,3 |
| генотип не определен (недостаточная концентрация ДНК МБТ) | 5 | 6,5 | 5 | 6,4 |

в 2015 г. – 732 пробы от 566 пациентов, из которых с коинфекцией ВИЧ/туберкулез было, соответственно, 228 (319 исследований, кратность – 1,39) и 294 чел. (400 исследований, кратность – 1,36) (табл. 2). Генотип «рифампицин-устойчивые» в среднем составил 45,2% из всех выявленных ДНК МБТ в диагностическом материале данных пациентов. Таким образом, около половины всех выявленных МБТ обладают МЛУ, что подтверждено микробиологическими результатами определения ЛЧ.

При анализе полученных данных совпадение результатов определения ЛЧ МБТ к препаратам I и II ряда на ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и на плотной среде Левенштейна-Йенсена составило 98,3%. Совпадение результатов определения ЛЧ МБТ на ВАСТЕС™ MGIT™ 960 и на тест-системах «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» – 97,8%, теста Xpert MTB/Rif – 98,9%.

Заключение

Таким образом, использование разработанной методики ускоренного определения ЛЧ к препаратам II ряда с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС™ MGIT™ 960, тест-систем «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» и теста Xpert MTB/Rif позволяет в пределах одного месяца произвести выделение возбудителя туберкулеза, его идентификацию и одновременное определение ЛЧ к препаратам I, и II ряда.

Следует отметить, что указанные лабораторные методы диагностики туберкулеза, в том числе ускоренные, не являются взаимозаменяемыми. Так, отрицательный результат люминесцентного микроскопического исследования не всегда указывает на отсутствие в диагностическом материале микобактерий. В таких случаях более информативным следует считать результаты неоднократных культуральных исследований, особенно с применением жидкой питательной среды.

Молекулярно-генетические методы не всегда позволяют получить положительный результат, так как в диагностическом материале может содержаться недостаточное количество ДНК микобактерий. В таких случаях молекулярно-генетические методы применимы для исследования выделенных культур микобактерий. Кроме того, вышеописанные молекулярно-генетические методы позволяют оценивать наличие ЛУ только к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам.

Однако широкое применение ускоренных методов диагностики туберкулеза и определения ЛЧ позволяет в более короткие сроки выделить и идентифицировать возбудитель заболевания (МБТ и/или НТМБ), что способствует правильной этиологической диагностике и служит основанием для начала адекватной химиотерапии, а также для информации об особенностях распространения данного заболевания.

Литература

1. Дорожкова И.Р., Фрейман Г.Е., Мороз А.М. Централизованная микобактериологическая лаборатория – необходимый компонент фтизиатрической службы крупных городов России // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2007. – № 10. – С. 40-43.

2. Краснова М.А., Носова Е.Ю., Галкина К.Ю. и соавт. Применение Xpert MTB/RIF для молекулярной диагностики туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2015. – № 4. – С. 29-33.
3. Носова Е.Ю., Краснова М.А., Галкина К.Ю. и соавт. Сравнительная оценка эффективности молекулярных тест-систем «ТБ-БИОЧИП», Xpert MTB/RIF и GenoType MTBDRplus для быстрого определения мутаций, ответственных за лекарственную устойчивость Mycobacterium tuberculosis complex, в респираторном материале пациентов московского региона // Мол. биология. – 2013. – Т. 47. – № 1. – С. 1-8.
4. Носова Е.Ю., Галкина К.Ю., Антонова О.В. и др. Молекулярно-биологический микрочип «ТБ-БИОЧИП-2» для определения чувствительности Mycobacterium tuberculosis с множественной лекарственной устойчивостью к фторхинолонам у больных с впервые выявленным и хроническим течением туберкулеза // Вестник РАМН. – 2008. – № 3. – С. 16-19.
5. Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи больным туберкулезом / приказ Минздрава России от 15.11.2012 г. № 932 н. [Электронный ресурс] URL: <https://www.rosminzdrav.ru/documents/9119-prikaz-ministerstva-zdravoohraneniya-rossiyskoy-federatsii-ot-15-noyabrya-2012-g-932n-ob-utverzhdenii-poryadka-okazaniya-meditsinskoj-pomoschi-bolnym-tuberkulezom> (Дата обращения 29.06.2016).
6. Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, 2014 г. / Под ред. Е.М. Богородской и В.И. Литвинова. – М.: МНПЦБТ, 2015. – 168 с.
7. Скотникова О.И., Галкина К.Ю., Носова Е.Ю. и соавт. Характеристика чувствительности Mycobacterium tuberculosis к рифампицину и изониазиду посредством определения мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA*, *oxyR*, *kasA* различными молекулярно-биологическими методами // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 8. – С. 42-45.
8. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. – 3-е изд. – М., 2015. – 68 с.
9. Boehme C. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 363. – P. 1005-1015.
10. Chang H., Heo S., Yoo K. et al. Detection of mycobacterium tuberculosis complex using real-time polymerase chain reaction // Korean J. Lab. Med. – 2008. – Vol. 28. с. – P. 103-108.
11. Genotype MTBDRplus: a further step toward rapid identification of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – P. 393-394.
12. Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V. et al. Gel-based microarrays in clinical diagnostics in Russia // Expert. Rev. Mol. Diagn. – 2011. – Vol. 11. – N. 8. – P. 839-853.
13. Nyendak M.R., Lewinsohn D.A., Lewinsohn D.M. New diagnostic methods for tuberculosis // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 22. – P. 174-182.
14. O'Grady J., Maeurer M., Mwaba P. et al. New and improved diagnostics for detection of drug-resistant pulmonary tuberculosis // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2011. – Vol. 17. – N. 3. – P. 134-141.

Сведения об авторах

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (499) 268-08-76, факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: safonova.s.g.@inbox.ru

Носова Елена Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33, тел. /факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: ma68@rambler.ru

Галкина Ксения Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук.

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (499) 268-70-33, факс + 7 (499) 785-20-82

Дорожкова Инна Рафаиловна – главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (499) 268-70-33, факс + 7 (499) 785-20-82