

ИНФОРМАТИВНОСТЬ БЫСТРЫХ МЕТОДОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ОПЫТ ИЗУЧЕНИЯ ТЕСТА НА ПРОКАЛЬЦИТОНИН В ОЦЕНКЕ АКТИВНОСТИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПРИ ДЕСТРУКТИВНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

Л. В. ПАНОВА, Е. С. ОВСЯНКИНА, М. М. АВЕРБАХ, Ф. А. ПОЛУЭКТОВА, О. А. ПИСКУНОВА

INFORMATIVE VALUE OF RAPID MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC TESTS AND EXPERIENCE IN STUDYING A PROCALCITONIN ASSAY IN THE EVALUATION OF THE ACTIVITY OF A MYCOBACTERIAL POPULATION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH DESTRUCTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

L. V. PANOVA, E. S. OVSYANKINA, M. M. AVERBAKH, F. A. POLUEKTOVA, O. A. PISKUNOVA

ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва

Проведенное исследование показало, что особенностью больных деструктивным туберкулезом легких детско-подростковой группы является частое отсутствие мокроты – в 64,7% случаев. Информативность исследования мокроты на ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) методом полимеразной цепной реакции достоверно выше, чем смыва с ротоглотки, – 100 и 20,5% соответственно ($p < 0,001$). Лекарственная чувствительность МБТ методом биочипов определена только у 16 (23,5%) из 68 больных из-за отсутствия или малого количества ДНК в диагностическом материале. Стартовые режимы химиотерапии этим больным были назначены с учетом определенной устойчивости. В остальных 52 (72,5%) случаях, до получения тестов на лекарственную чувствительность или при отсутствии бактериовыделения, были назначены эмпирические режимы химиотерапии, учитывающие возможный риск лекарственной устойчивости МБТ по данным анамнеза и результатов клинико-рентгенологического обследования. Первые результаты по изучению уровня прокальцитонина у больных деструктивным туберкулезом легких детей и подростков позволяют предположить, что положительный результат теста свидетельствует о высокой активности микобактериальной популяции. У больных с положительным результатом теста на прокальцитонин, в отличие от больных с отрицательным результатом, бактериовыделение достоверно чаще выявлялось как методом люминесцентной микроскопии, так и методом посева на Bactec-960: 85,7 и 20,8% соответственно ($p < 0,001$), 100 и 50,0% соответственно ($p < 0,005$).

Ключевые слова: деструктивный туберкулез, дети, подростки, тест на лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза, прокальцитонин.

The performed investigation showed that the specific feature of a group of children and adolescents with destructive pulmonary tuberculosis is the frequent absence of sputum (64.7%). The informative value of sputum examination for *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) DNA by a polymerase chain reaction assay was significantly higher than that of oropharyngeal lavage (100 and 20.5%, respectively; $p < 0.001$). Drug resistance in MBT was determined by a microarray test in only 16 (23.5%) out of 68 patients for lack or paucity of DNA in the diagnostic material. Initial chemotherapy regimens were used in these patients in terms of definite resistance. In the other 52 (72.5%) cases, empirical chemotherapy regimens taking into account the possible risk for drug resistance in MBT from their history data and clinical and X-ray findings were given before drug resistance tests or in the absence of bacterial excretion. The first estimates of procalcitonin levels in the children and adolescents with destructive pulmonary tuberculosis may suggest that the positive tests are indicative of the high activity of a mycobacterial population. In the patients with positive procalcitonin tests, unlike those with negative ones, bacterial excretion was significantly more frequently detected by both luminescence microscopy and inoculation Bactec MGIT 960: 85.7 and 20.8%, respectively ($p < 0.001$), 100 and 50.0%, respectively ($p < 0.005$).

Key words: destructive tuberculosis, children, adolescents, drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, procalcitonin.

В «Докладе о глобальной борьбе с туберкулезом, 2012 г.», подготовленном Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), впервые отражена проблема заболеваемости туберкулезом детей. В документах ВОЗ говорится о сложности диагностики туберкулеза у детей и подростков при помощи микробиологических методов [2]. Отсутствие мокроты у большей части пациентов этой возрастной группы, даже при наличии деструктивных изменений в легких, не позволяет выявить возбудителя заболевания и провести тесты на лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза (МБТ) [1, 3]. По данным официальной статистики, деструктивные

формы диагностированы у 13,4% впервые выявленных детей с туберкулезом легких и у 37,3% подростков. Доля бактериовыделителей составила 4,6% среди детей и 26,9% среди подростков (данные по РФ за 2011 г.) [5].

В последние годы в мировой и отечественной фтизиатрии уделяется большое внимание внедрению быстрых методов определения лекарственной чувствительности МБТ. Это молекулярно-генетические методы: определение лекарственной чувствительности на биологических микрочипах (тест-системы «ТБ-биочип», «ТБ-биочип-2»), применение ДНК-стриповой технологии (набор

«GenoTypeMTBDRsl»), анализатора GeneXpert (набор реагентов Xpert MTB/RIF) и автоматизированная система с использованием жидких сред Bactec MGIT 960. Однако в диагностическом материале часто оказывается недостаточное для детекции количество ДНК МБТ [4]. В научных публикациях мы не встретили работ, отражающих значимость быстрых методов определения лекарственной чувствительности МБТ при назначении стартовых режимов химиотерапии в детско-подростковой группе больных.

Поиск биологических маркеров инфекции, служащих ориентиром активности бактериальной популяции и тяжести заболевания, остается актуальной проблемой. Воспаление, возникающее после какой-либо формы тканевого повреждения, сопровождается продукцией цитокинов и белков острой фазы, определение которых может свидетельствовать о наличии воспаления и степени его тяжести. Воспалительные процессы в целом очень схожи независимо от их причины. Одним из наиболее значимых лабораторных методов диагностики инфекции, появившихся в последние годы, является определение уровня прокальцитонина (ПКТ) плазмы крови.

Внутриклеточный предшественник кальцитонина – ПКТ – был открыт F. Moysa et al. в 1975 г. В отсутствие инфекции экстратиреоидная продукция ПКТ и, соответственно, транскрипция CALC-I гена подавлена и ограничивается селективной экспрессией в нейроэндокринных клетках, обнаруживаемых главным образом в щитовидной железе и легком. При тяжелой системной инфекции ПКТ продуцируется тканями вне щитовидной железы. Многочисленными исследованиями показана потенциальная способность использования определения ПКТ для диагностики степени выраженности инфекционных процессов. При этом выработка ПКТ стимулируется липополисахаридами и иными подобными биологически активными субстанциями.

В научной литературе мы не встретили работ по изучению уровня ПКТ при туберкулезной инфекции у детей и подростков.

Цель исследования – изучение информативности быстрых методов определения лекарственной чувствительности МБТ для назначения стартовых режимов химиотерапии и изучение значимости теста на ПКТ при оценке активности микобактериальной популяции у детей и подростков с деструктивным туберкулезом легких.

Материалы и методы

С целью изучения информативности быстрых методов определения лекарственной чувствительности МБТ (биологические микрочипы, Bactec-960) для назначения стартовых режимов химиотерапии проведено когортное проспективное исследование.

В исследование было включено 68 впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких. Детей в возрасте 12-14 лет было 12 человек, подростков (15-17 лет) – 56 человек.

Структура клинических форм деструктивного туберкулеза легких представлена на рис.

Как видно из рис., наиболее часто диагностирован инфильтративный туберкулез – в 89,7% (61 человек) случаев, далее по частоте встречаемости: очаговый – в 4,5% (3 человека), казеозная пневмония – в 2,9% (2 человека), туберкулема – в 2,9% (2 человека) случаев.

Следует отметить, что продуктивный кашель на момент поступления в клинику отмечен только у 35,0% больных. В этой связи сбор мокроты для исследования на МБТ у остальных 65,0% пациентов представлял определенные трудности. При отсутствии мокроты проводили забор смыва с ротоглотки (СРГ).

В качестве диагностического материала для исследования на МБТ мокрота получена у 24 (35,3%), СРГ – у 44 (64,7%) из 68 впервые выявленных больных.

С целью изучения значимости определения уровня ПКТ у больных деструктивным туберкулезом легких проведено когортное проспективное исследование в группе из 38 детей и подростков в возрасте от 3 до 17 лет. Из 38 больных у 3 диагностирована казеозная пневмония, у 21 – инфильтративный туберкулез, у 6 – диссеминированный туберкулез, у 8 – фиброзно-кавернозный туберкулез. В исследование были включены как впервые выявленные больные – 17 человек, так и больные, поступившие на повторное лечение, – 21 человек.

Для определения концентрации ПКТ в плазме крови использован полуколичественный иммунохроматографический метод экспресс-диагностики (BRAHMS PCT-Q). В диагностический набор входят одна тестовая стрип-полоска и одна пипетка. С помощью пипетки в лунку стрипа наносили



Рис. Структура клинических форм впервые выявленного деструктивного туберкулеза легких

200 мкл (6 капля) плазмы. Время инкубации – 30 мин при комнатной температуре. Через 30 мин определяли концентрацию ПКТ в образце путем сравнения интенсивности окрашивания тестовой линии с окрашенными блоками на карточке сравнения. При концентрации ПКТ < 0,5 нг/мл (отсутствие опытной полоски на плашке) результат считали отрицательным. При концентрации 0,5 нг/мл и более опытная полоска принимала красный цвет, при этом интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации ПКТ (референсный ряд значений: до 0,5 нг/мл, от 0,5 до 2 нг/мл, от 2 до 10 нг/мл, 10 нг/мл и более).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования диагностического материала на ДНК МБТ методом ПЦР представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что информативность исследования мокроты на ДНК МБТ методом ПЦР значительно выше, чем СРГ, – 100 и 20,5% соответственно ($p < 0,001$). В общей сложности процент обнаружения ДНК МБТ методом ПЦР в диагностическом материале составил 48,5% (33 человека).

Результаты исследования МБТ на лекарственную чувствительность методом биологических чипов поступают в клинику через 3 дня с момента сдачи диагностического материала, что позволяет использовать полученные данные для назначения стартовых режимов химиотерапии.

В табл. 2 представлены данные определения лекарственной чувствительности МБТ методом

биочипов. Как видно из табл. 2, из 33 больных, в диагностическом материале которых была обнаружена ДНК МБТ, в 17 (51,5%) случаях количество ДНК было недостаточным для определения лекарственной чувствительности. В 16 (48,5%) случаях проведены тесты на лекарственную чувствительность: в 8 (24,2%) – определена чувствительность к изониазиду (Н), рифампицину (R) и офлоксацину (Ox); устойчивость к Н определена в 3 (9,1%) случаях, множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) в 5 случаях (в 3 (9,1%) случаях – HR, в 2 (6,1%) случаях – HROx).

Таким образом, из 68 впервые выявленных больных деструктивным туберкулезом легких определить лекарственную чувствительность МБТ методом биологических микрочипов удалось только у 23,5% (16 человек) пациентов. Этой группе пациентов химиотерапия была назначена с учетом данных о лекарственной чувствительности МБТ.

Пациентам, у которых ДНК МБТ не была обнаружена (35 человек) или ее количество было недостаточным для определения лекарственной чувствительности (17 человек), были назначены эмпирические режимы химиотерапии с учетом риска лекарственной устойчивости МБТ по анамнестическим данным и результатам клинико-рентгенологического обследования.

В этой же когорте больных (68 человек) проведена оценка значимости исследования диагностического материала на Bactec-960 с целью определения лекарственной чувствительности МБТ. Результаты исследования МБТ на лекарственную чувствительность на аппарате Bactec-960 поступают в клинику в сроки от 35 до 48 дней

Таблица 1

Результаты исследования диагностического материала на ДНК МБТ методом ПЦР

Диагностический материал	Число больных	ДНК МБТ методом ПЦР	
		обнаружена	не обнаружена
Мокрота	24 100%	24 100%	0
СРГ	44 100%	9 20,5% $p_{1,2} < 0,001$	33 79,5%
Всего	68 100%	33 48,5%	35 51,5%

Таблица 2

Результаты определения лекарственной чувствительности МБТ методом биологических микрочипов

Число больных с обнаруженной ДНК МБТ	Результаты определения лекарственной чувствительности МБТ					
	не определена в связи с малым количеством ДНК	определена	в том числе			
			чувствительность к HROx	устойчивость к Н	устойчивость к HR	устойчивость к HROx
33 100%	17 51,5%	16 48,5%	8 24,2%	3 9,1%	3 9,1%	2 6,1%

от момента сдачи диагностического материала. Из 68 больных рост МБТ из мокроты и СРГ получен у 41 (60,3%) пациента. Во всех случаях при получении роста МБТ проводили тесты на определение лекарственной чувствительности к препаратам I ряда. Информативность исследования диагностического материала (мокрота, СРГ) на МБТ на Bactec-960 представлена в табл. 3.

Как видно из табл. 3, информативность исследования мокроты на МБТ на Bactec-960 достоверно выше, чем исследование СРГ, – 100 и 38,6% соответственно ($p < 0,001$).

В отличие от метода ПЦР-диагностики, когда обнаруженного количества ДНК может оказаться недостаточно для определения лекарственной чувствительности МБТ, при получении роста МБТ на Bactec-960 всегда проводятся тесты на лекарственную чувствительность. Однако в связи с тем, что результаты тестов на Bactec-960 поступали в клинику в сроки от 35 до 48 дней от момента сдачи диагностического материала, они не могут быть использованы для назначения стартовых режимов химиотерапии. По нашим данным, к моменту получения тестов у большинства больных назначение эмпирического режима химиотерапии с учетом сведений об источнике инфекции и клинической характеристики процесса позволяет получить положительную динамику заболевания в виде прекращения бактериовыделения.

Результаты исследования на лекарственную чувствительность МБТ представлены в табл. 4.

С эпидемической точки зрения наибольшее значение имеет выявление больных с МЛУ МБТ. Таких пациентов в нашей когорте было 12 человек.

Как видно из табл. 4, МЛУ МБТ на аппарате Bactec-960 определена у 12 больных. В том числе у 5 больных МЛУ МБТ была определена и методом биологических чипов, что позволило назначить химиотерапию сразу же с учетом этих результатов. У 7 пациентов на момент назначения химиотерапии данные о МЛУ МБТ отсутствовали. Этим пациентам были назначены эмпирические режимы: 1 получал лечение по I режиму, 6 – по IIb режиму. Из 6 пациентов, получавших IIb режим, у 4 прекращение бактериовыделения отмечено через 1 мес. лечения, еще у 1 – через 2 мес., что можно расценивать как преодоление лекарственной устойчивости. У 1 из 6 пациентов прекращение бактериовыделения достигнуто через 7 мес. химиотерапии. У данного пациента по результату микробиологического исследования только к 2 мес. лечения на аппарате Bactec-960 определена широкая лекарственная устойчивость МБТ [устойчивость к изониазиду, рифампицину, фторхинолону и одному из инъекционных аминогликозидов (канамицину, амикацину) или полипептиду (капреомицину)]. Прекращение бактериовыделения удалось достичь после смены режима химиотерапии (по результатам теста

Таблица 3

Результаты исследования диагностического материала на МБТ на Bactec-960

Диагностический материал	Число больных	Рост МБТ получен	Рост МБТ не получен
Мокрота	24 100%	24 100%	0
СРГ	44 100%	17 38,6% $p_{1,2} < 0,001$	27 61,4%
Всего	68 100%	41 60,3%	27 39,7%

Таблица 4

Результаты исследования на лекарственную чувствительность МБТ на Bactec-960

Спектр лекарственной устойчивости МБТ	Число больных
Чувствительность к HRSE	9 (22,0%)
Устойчивость к S	8 (19,5%)
Устойчивость к H	3 (7,3%)
Устойчивость к E	1 (2,4%)
Устойчивость к HR	3 (7,3%)
Устойчивость к HS	5 (12,2%)
Устойчивость к HSE	3 (7,3%)
Устойчивость к HRS	2 (4,9%)
Устойчивость к HRSE	7 (17,1%)
Всего	41 (100%)

на лекарственную чувствительность на плотных питательных средах). В то же время прогрессирования процесса не наблюдали.

Эти результаты свидетельствуют об ограниченных методологических возможностях ранней диагностики лекарственной устойчивости у детей и подростков, прежде всего из-за ограниченных возможностей получения самого информативного диагностического материала – мокроты, что обусловлено возрастными физиологическими особенностями.

В этой связи предприняли попытку изучить уровень ПКТ как биологического маркера инфекции, позволяющего косвенно оценить тяжесть заболевания и активность бактериальной популяции у больных туберкулезом детей и подростков.

Изучение уровня ПКТ у больных деструктивным туберкулезом легких показало, что из 38 больных у 14 (36,8%) тест на ПКТ дал положительный результат (в диапазоне от 0,5 до 2,0 нг/мл), у 24 (63,2%) – отрицательный.

В табл. 5 представлено распределение больных по клиническим формам туберкулеза в зависимости от результата теста на ПКТ.

В результате исследования установлено, что у всех пациентов с казеозной пневмонией (3 человека) результат теста на ПКТ положительный. Из 6 больных диссеминированным туберкулезом легких получен положительный результат у 3, из 21 больного с инфильтративным туберкулезом – у 6, из 8 больных с ФКТ – у 2. Достоверных различий между группами больных с отрицательным

и положительным результатом теста на ПКТ в зависимости от формы туберкулеза легких не получено.

Однако проведенный анализ позволил выявить взаимосвязь положительного результата теста с бактериовыделением. Так, у всех больных с положительным тестом на ПКТ, в отличие от больных с отрицательным тестом, в диагностическом материале были обнаружены МБТ: в 100% (14 человек) и 50,0% (12 человек) соответственно ($p < 0,005$) (табл. 6).

Как видно из табл., у больных с положительным тестом на ПКТ бактериовыделение достоверно чаще выявлялось как методом люминесцентной микроскопии, так и методом посева на Bactec-960: 85,7 и 20,8% соответственно ($p < 0,001$), 100 и 50,0% соответственно ($p < 0,005$).

Таким образом, первые результаты исследования уровня ПКТ у больных деструктивным туберкулезом легких могут свидетельствовать о высокой активности микобактериальной популяции у пациентов с положительным результатом теста, что необходимо учитывать прежде всего при определении тактики лечения и прогноза заболевания.

Заключение

Установлено, что у впервые выявленных детей и подростков с деструктивным туберкулезом легких из-за отсутствия мокроты основным диагностическим материалом для исследования на ДНК МБТ методом ПЦР чаще является СРГ (64,7%). Однако ДНК МБТ в СРГ обнаруживает

Таблица 5

Распределение больных по клиническим формам туберкулеза в зависимости от результата теста на прокальцитонин

ПКТ +		ПКТ -	
Клиническая форма	Число человек	Клиническая форма	Число человек
Казеозная пневмония	3	Казеозная пневмония	0
Инфильтративный	6	Инфильтративный	15
Диссеминированный	3	Диссеминированный	3
Фиброзно-кавернозный	2	Фиброзно-кавернозный	6
Всего	14	Всего	24

Таблица 6

Соотношение результатов теста на прокальцитонин с результатами исследования диагностического материала на МБТ

Значение теста на ПКТ	Число больных	МБТ «+»	Метод обнаружения МБТ		
			ДНК МБТ методом ПЦР обнаружена	Люминесцентная микроскопия, КУМ обнаружены	Bactec-960, рост МБТ получен
ПКТ +	14 100%	14 100%	12 85,7%	12 85,7%	14 100%
ПКТ -	24 100%	12 50,0% $p_{1,2} < 0,005$	15 62,5%	5 20,8% $p_{1,2} < 0,001$	12 50,0% $p_{1,2} < 0,005$

ся достоверно реже, чем в мокроте, – 20,5 и 100% соответственно ($p < 0,001$). Лекарственная чувствительность МБТ методом биочипов определена только в 23,5% случаев в связи с отсутствием и малым количеством ДНК в СРГ. В то же время этот материал следует рассматривать в качестве диагностического, так как в ряде случаев он дает дополнительную возможность получения информации о лекарственной чувствительности МБТ. Ограниченные возможности ранней диагностики лекарственной устойчивости МБТ у детей и подростков определяют необходимость применения эмпирических режимов химиотерапии с учетом риска лекарственной устойчивости МБТ по анамнестическим и клиничко-рентгенологическим данным (76,5%). Первые результаты исследования ПКТ у больных деструктивным туберкулезом легких свидетельствуют о его высоком уровне реагирования при активности микобактериальной популяции. У больных с положительным тестом на ПКТ, в отличие от больных с отрицательным тестом, бактериовыделение достоверно чаще выявлялось как методом люминесцентной микроскопии, так и методом посева на Bactec-960: 85,7 и 20,8% соответственно ($p < 0,001$), 100 и 50,0% соответственно ($p < 0,005$). Этот факт необходимо учитывать прежде всего при определении тактики лечения и прогнозе заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дети и туберкулез. От отсутствия достаточного внимания до действий. – Электронная версия. – 2013. // www.action.org/magas/general/Children and TB Update.
2. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом, 2012 г. Основные положения. Электронная версия // www.who.int/ru/
3. Овсянникова Е. С., Папова Л. В., Фирсова В. А. и др. Структура клинических форм и особенностей течения туберкулеза с деструкцией легочной ткани у детей старшего возраста и подростков // Туб. – 2012. – № 1. – С. 10-13.
4. Черноусова Л. Н., Севостьянова Э. В., Андреевская С. Н. и др. Алгоритм микробиологических исследований для диагностики туберкулезной инфекции // Метод. пособие для врачей № УМО-17-28/248 от 12.07.2011 – М., 2011. – 52 с.
5. Шилова М. В. Туберкулез в России в 2011 г. // Монография. – М. – Ростов-на-Дону, 2013.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Панова Людмила Владимировна

ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН,

доктор медицинских наук, старший научный сотрудник
детско-подросткового отдела.

107564, г. Москва, ул. Яузская аллея, д. 2.

Тел.: 8 (499) 785-90-05.

E-mail: amtm50@mail.ru

Поступила 11.04.2014