

ОЦЕНКА КОМПЛЕКСА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Э. В. СЕВАСТЬЯНОВА, В. А. ПУЗАНОВ, Т. Г. СМЕРНОВА, Е. Е. ЛАРИОНОВА, Л. Н. ЧЕРНУСОВА

ASSESSMENT OF A SET OF MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC STUDIES FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

E. V. SEVASTYANOVA, V. A. PUZANOV, T. G. SMIRNOVA, E. E. LARIONOVA, L. N. CHERNOUSOVA

ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва

На большом клиническом материале (исследовано более 9 500 диагностических образцов) проведена сравнительная оценка эффективности использования в лабораторной практике различных микробиологических и молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза. Выявлены преимущества современных ускоренных методов (бактериологический метод с применением жидких сред и анализатора Bactec MGIT 960, молекулярно-генетические методы) по сравнению с традиционными методами диагностики туберкулеза (микроскопия, культуральный на плотных питательных средах) как в сроках получения результатов, так и в эффективности выявления микобактерий. Сопоставлены результаты исследований, выполненных различными методами, и показано, что для повышения эффективности диагностики туберкулеза существует необходимость в параллельном использовании одновременно комплекса традиционных и ускоренных микробиологических и молекулярно-генетических методов.

Ключевые слова: туберкулез, микробиологическая диагностика туберкулеза, молекулярно-генетические методы, эффективность выявления микобактерий.

Much clinical material (more than 9,500 diagnostic samples) was used to evaluate the efficiency of using different microbiological and molecular genetic studies for the diagnosis of tuberculosis in laboratory practice. Current accelerated techniques (a bacteriological assay with liquid media and a Bactec MGIT 960 analyzer, as well as molecular genetic studies) compared to traditional methods for tuberculosis diagnosis (microscopy, dense media culture) were found to have advantages in the time spent to obtain results and in the efficient detection of mycobacteria. The results of studies performed by different methods were compared and it was shown that a set of traditional and accelerated microbiological and molecular genetic methods should be concurrently employed to enhance the efficiency of tuberculosis diagnosis.

Key words: tuberculosis, microbiological tuberculosis diagnosis, molecular genetic studies, efficiency of mycobacterial detection.

Лабораторная диагностика туберкулеза (ТБ) включает комплекс различных методов исследования, в том числе традиционно используемые, а также новые ускоренные, как микробиологические, так и молекулярно-генетические [4, 6]. В этой связи для повышения эффективности работы бактериологических лабораторий (БЛ) медицинских организаций фтизиатрического профиля необходима оптимизация алгоритма проводимых ими лабораторных исследований с учетом преимуществ и ограничений применяемых в лабораторной практике методов диагностики и контроля химиотерапии ТБ.

Цель исследования – сравнительная оценка показателей эффективности (доли исследований с положительными результатами среди всех исследований данного вида) микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований, выполненных в отделе микробиологии ЦНИИТ РАМН в течение последних нескольких лет из различных видов диагностического материала, полученного от больных с установленным диагнозом ТБ, а также больных с другими заболеваниями органов

дыхания и пациентов консультационно-поликлинического отделения.

Материалы и методы

Выявление микобактерий (МБ) из различных видов диагностического материала, полученного от пациентов, обследуемых с целью диагностики и контроля химиотерапии ТБ, проводили с использованием следующих методов: люминесцентной микроскопии; культурального на плотной питательной среде (ППС) Финна-П; культурального на жидкой питательной среде (модифицированная среда Middlebrook 7H9) в автоматизированной системе Bactec MGIT 960; полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (Синтол, Россия); GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США).

Результаты и обсуждение

Итоговые результаты рутинных исследований, выполненных по запросам клиницистов в течение

2012 г. с целью выявления МБ в образцах различного диагностического материала (в том числе исследования для диагностики ТБ), представлены в табл. 1.

Анализ лабораторных данных выявил преимущества современных ускоренных методов (бактериологического метода с применением жидких питательных сред и анализатора Bactec MGIT 960, молекулярно-генетических методов) по сравнению с традиционными методами диагностики ТБ (микроскопией, культивированием на ППС) как в сроках получения результатов, так и в результативности выявления МБ.

Преимущества автоматизированных систем обеспечиваются в том числе и высокой эффективностью стандартизованных на уровне сертифицированных по ISO9001 производств реагентов и сред, а также поддержанием стандартных протоколов исследований. Основное преимущество молекулярно-генетических методов состоит в том, что они являются быстрыми методами, позволяющими получить результаты в сравнительно короткий временной период. Следует также отметить, что сокращение объемов ручного труда, имеющее место при использовании как автоматизированных бактериологических анализаторов, так и современных молекулярно-генетических методов, снижает вероятность ошибок оператора при выполнении исследований указанными методами.

Из полученных данных (табл. 1) следует, что использование анализатора Bactec MGIT 960, а также молекулярно-генетических методов позволяло получить более высокий процент положительных результатов в сравнении с люминесцент-

ной микроскопией и культивированием на ППС. Так, эффективность выявления МБ для всех обследованных в 2012 г. больных, находившихся на лечении в ЦНИИТ, и пациентов консультативно-поликлинического отделения составила: люминесцентная микроскопия – 15,7%; культивальный метод на ППС – 12,9%; культивирование в системе Bactec MGIT 960 – 23,8%; метод ПЦР-РВ – 37,3%; метод GeneXpert MTB/RIF – 35,8%. Помимо этого, сроки получения результатов современными ускоренными методами были существенно сокращены.

Анализируя полученные данные, следует отметить относительно невысокий (по сравнению с микроскопией и посевом на жидкие среды) показатель выявления МБ культивальным методом на ППС. Это может объясняться различными причинами, в первую очередь – специфическим контингентом обследованных пациентов (в основном преобладали исследования для ранее леченных больных ТБ, обследуемых с целью контроля химиотерапии). Настоящий факт указывает на преимущество промышленно изготовленной жидкой питательной среды для выделения подвергавшихся воздействию противотуберкулезных препаратов (ПТП) штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) у преобладающего числа длительно леченных больных ТБ.

Наибольшее число положительных результатов было получено при обнаружении ДНК МБ молекулярно-генетическими методами. Их преимущество перед традиционными методами было отмечено для всех видов исследованного диагностического материала, но особенно это было ха-

Таблица 1

Сравнительная эффективность выявления МБ различными методами исследований, выполненных в 2012 г.

Метод исследования	Число исследований			
	Все исследования*		В том числе исследования для диагностики**	
	всего	из них с положительным результатом	всего	из них с положительным результатом
Люминесцентная микроскопия	9 629	1 509 (15,7%)	3 430	383 (11,2%)
Культивальный на плотных питательных средах	5 370	694 (12,9%)	1 649	152 (9,2%)
Культивальный на жидких питательных средах (Bactec MGIT 960)	4 129	982 (23,8%)	1 584	256 (16,2%)
ПЦР в режиме реального времени	6 872	2 561 (37,3%)	2 205	493 (22,4%)
GeneXpert MTB/RIF	383	137 (35,8%)	238	72 (30,3%)

Примечание: * – исследования, выполненные из различных образцов диагностического материала, полученного от больных ТБ и другими заболеваниями, находившихся на лечении в ЦНИИТ, а также от пациентов с неустановленным диагнозом из консультативно-поликлинического отделения, ** – исследования для диагностики, выполненные как для пациентов с неустановленным диагнозом из консультативно-поликлинического отделения, так и выполненные до начала лечения для госпитализируемых в ЦНИИТ больных ТБ и другими заболеваниями, в том числе диагностические исследования для впервые выявленных больных, а также ранее леченных (с рецидивом заболевания, после проведенных неэффективных курсов химиотерапии и др.).

бактерию для мочи и других внелегочных материалов (рис. 1-3).

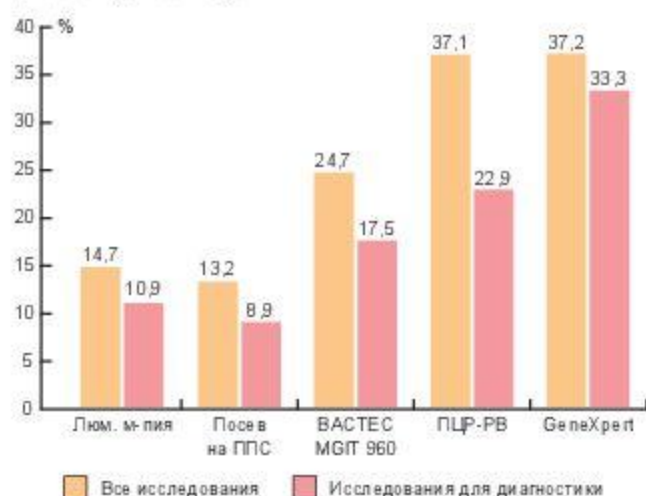


Рис. 1. Эффективность выявления МБ из мокроты и других отделяемых трахеобронхиального дерева различными методами исследования в 2012 г.

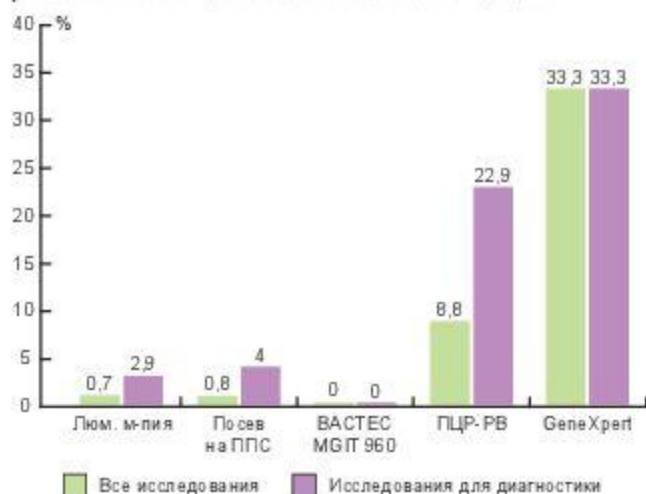


Рис. 2. Эффективность выявления МБ из мочи различными методами исследования в 2012 г.

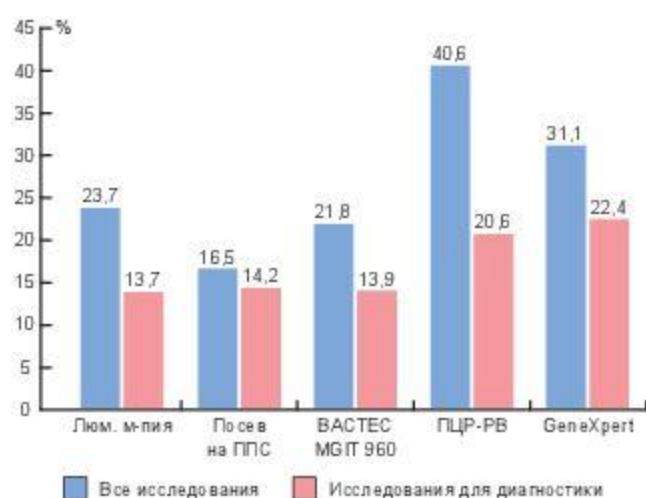


Рис. 3. Эффективность выявления МБ из образцов других «внелегочных» материалов различными методами исследования в 2012 г.

Например, при исследовании мочи эффективность выявления МБ составила: методом люминесцентной микроскопии – 0,7%; культуральным методом на ППС – 0,8%; методом ПЦР-РВ – 8,8%. Высокие показатели, полученные в данном случае для метода GeneXpert (33,3%), можно объяснить тем, что в связи с высокой стоимостью этого исследования общее количество проведенных указанным методом исследований было относительно небольшим, при этом проводился специальный отбор показанных пациентов для обследования.

Следует также подчеркнуть, что, хотя культуральный метод на ППС значительно уступал молекулярно-генетическим методам по эффективности выявления МБ из мочи, его результативность была выше, чем культурального метода на жидких средах. Известно, что в соответствии с инструкциями производителя жидкая среда, используемая для культивирования в анализаторе Bactec MGIT 960, не рекомендована для проведения посевов мочи в связи с низкой результативностью для данного вида диагностического материала, что подтвердили исследования. Таким образом, целесообразность применения традиционного культурального метода на ППС (в комплексе с другими методами), особенно при проведении диагностических исследований, не вызывает сомнений.

Дальнейший анализ результатов исследований подтвердил сделанные ранее выводы. В табл. 2 представлены результаты, полученные методом ПЦР-РВ с расшифровкой их по отдельным видам диагностического материала, поступившего в лабораторию в период с начала 2012 г. по сентябрь 2013 г. За указанный период времени методом ПЦР-РВ было исследовано 9 543 образца, из них 3 374 (35,4%) образца имели положительный результат. При этом наиболее высокие показатели выявления МБ методом ПЦР-РВ были зарегистрированы для операционного материала (58,6%), мокроты (40%) и других отделяемых трахеобронхиального дерева.

Анализ данных, приведенных в табл. 2, также позволяет отметить, что в отличие от микроскопических и культуральных методов, имеющих традиционно низкую эффективность при исследовании таких материалов, как моча и кровь, применение метода ПЦР-РВ для исследования указанных видов диагностического материала позволило получить в изучаемый период времени значительно более высокий процент положительных находок – 7,1% для мочи и 2,8% для менструальной крови.

Был также проведен сравнительный анализ результативности различных традиционных и современных методов исследования, выполненных исключительно из одной порции диагностического материала.

С этой целью каждый из испытуемых образцов диагностического материала исследовали комплексно тремя методами: люминесцентной микроскопии, культивирования в анализаторе Bactec MGIT 960

и ПЦР-РВ. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 3.

Как следует из представленных данных, полученные результаты исследований соответствовали закономерностям, установленным ранее. Наиболее высокая эффективность выявления МБ (для всех исследованных видов образцов и групп пациентов) наблюдалась для метода ПЦР-РВ.

Таким образом, проведенный анализ позволяет сделать вывод о том, что методы культивирования с использованием автоматизированных анализаторов и жидких питательных сред, а также молекулярно-генетические методы исследования в обязательном порядке должны быть включены в стандартные алгоритмы выявления МБ, используемые в специализированных БЛ. На рис. 4 показана примерная схема применения комплекса микробиологических и молекулярно-генетических исследований, согласно которой для диагностики и контроля химиотерапии ТБ, наряду с традиционными, используются современные ускоренные методы исследования.

Необходимо подчеркнуть, что представленные в данной схеме лабораторные методы, направленные на диагностику ТБ или микобактериозов,

Таблица 2

Эффективность выявления МБ методом ПЦР-РВ из различных видов диагностических материалов в период с 2012 г. по сентябрь 2013 г.

Материал	Всего исследований	Результаты ПЦР-РВ		% положительных результатов
		ПЦР+	ПЦР-	
Мокрота	6 325	2 550	3 775	40,3
Операционный материал*	851	499	352	58,6
БАЛ	463	69	394	14,9
Моча	282	20	262	7,1
Экссудат	83	15	68	18,1
Аспират, браш-биоптат	378	123	255	32,5
СВДП, ПВБ	903	82	821	9,1
Кровь	64	1	63	1,6
Менструальная кровь	145	4	141	2,8
Пунктат	11	3	8	27,3
Плевральная жидкость	38	8	30	21,0
Всего	9 543	3 374	6 169	35,4

*Примечание:** – легочная ткань; туберкулема; лимфоузел; плевра; эмпиема; казеоз; стенка каверны, кисты; содержимое туберкулемы, каверны, кисты; некротические массы и др., БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж, ПВБ – промывные воды бронхов, СВДП – смыв с верхних дыхательных путей.

Таблица 3

Сравнительная эффективность выявления МБ из одного образца диагностического материала различными методами исследования в 2011-2013 гг.

Число исследованных образцов		Число положительных результатов выявления МБТ			
		люминесцентная микроскопия абс. (%)	Bactec MGIT 960 абс. (%)	ПЦР-РВ абс. (%)	
Все выполненные исследования для всех групп пациентов и видов диагностического материала		6 012 (100%)	1 327 (22,1%)	1 677 (27,9%)	2 438 (40,6%)
в том числе исследования	выполненные из мокроты (все диагнозы)	3 754 (100%)	910 (24,2%)	1 272 (33,9%)	1 591 (42,4%)
	для больных туберкулезом из мокроты	2 694 (100%)	710 (26,4%)	985 (36,6%)	1 282 (47,6%)
	для в/в больных из любого мат-ла (все диагнозы)	2 660 (100%)	478 (18,0%)	645 (24,2%)	889 (33,4%)
	для в/в больных туберкулезом из любого мат-ла	1 323 (100%)	303 (22,9%)	408 (30,8%)	607 (45,9%)
	для в/в больных туберкулезом из мокроты	959 (100%)	224 (23,4%)	327 (34,1%)	428 (44,6%)
	для р/л больных из любого мат-ла (все диагнозы)	2 218 (100%)	645 (29,1%)	758 (34,2%)	1 141 (51,4%)
	для р/л больных туберкулезом из любого мат-ла	1 754 (100%)	548 (31,2%)	642 (36,6%)	1 007 (57,4%)
	для р/л больных туберкулезом из мокроты	1 295 (100%)	399 (30,8%)	511 (39,5%)	660 (51,0%)

Примечание: в/в – впервые выявленный (больной), р/л – ранее леченный (больной).



Рис. 4. Схема проведения микробиологических и молекулярно-генетических исследований для диагностики и контроля химиотерапии ТБ в специализированной БЛ

не являются конкурентными или взаимоисключающими, а, напротив, оптимально дополняют друг друга. Любой из методов имеет право на существование при условии, что он дает возможность диагностировать МБ, особенно в отсутствие результатов других методов лабораторной диагностики.

Например, молекулярно-генетические методы определения лекарственной устойчивости (ЛУ) не всегда подходят для прямого применения, так как в клиническом образце может не содержаться достаточного количества ДНК МБТ, что делает необходимым применение традиционных культуральных исследований с возможностью дальнейшего использования полученной культуры МБТ для определения ЛУ молекулярными и лекарственной чувствительности (ЛЧ) культуральными методами. Кроме того, спектр ПТП, устойчивость к которым может определяться молекулярными методами, пока недостаточен.

В то же время методы микроскопии, обладающие относительно невысокой чувствительностью, сохраняют свою актуальность, так как позволяют быстро (и с минимальными финансовыми затратами) выявлять больных ТБ с массивным бактериовыделением, представляющих наибольшую эпидемическую опасность.

Таким образом, использование возможно широкого спектра лабораторных методов для исследования разных видов диагностического материала позволяет в итоге с помощью как минимум одного из них выделить культуру или ДНК МБ.

Подтверждением корректности тезиса о необходимости применения для диагностики ТБ всех доступных методов в комплексе являются данные ретроспективной, за 9 кварталов наблюдения (2011 г. – I кв. 2013 г.), оценки 554 случаев ПЦР-отрицательных результатов диагностики ТБ при обязательной бактериологической (бактериоскопическими

и/или культуральными методами) верификации инфекционного заболевания среди больных ТБ и/или микобактериозами [5]. Из них 115 исследований различного диагностического материала (мокрота, БАЛ, аспираты, стенки каверн, казеоз и др.) были проведены 58 пациентам, у которых впоследствии был диагностирован ТБ, сочетанный с микобактериозом или же микобактериоз. Первичную идентификацию культуры проводили с использованием ID-теста TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics, Корея) и микроскопией препаратов с окраской по Цилю – Нельсону. Видовую идентификацию МБ осуществляли с использованием молекулярного метода, основанного на множественной обратной гибридизации с ДНК-зондами GenoType CM/AS (Hain Lifescience, Германия).

У 52 из 58 пациентов при отрицательных результатах ПЦР-диагностики только методом люминесцентной микроскопии были выявлены кислотоустойчивые микобактерии в 5 диагностических образцах, только культуральными методами с использованием технологии Bactec MGIT 960 и ППС Финна-II – в 61 образце, обоими микробиологическими методами (микроскопии и культуральным) – в 40 образцах. После исключения из общего числа исследований ожидаемо отрицательных результатов ПЦР-диагностики у больных микобактериозами определено, что у 2-4% больных ТБ лабораторное подтверждение специфичности процесса было возможно только микробиологическими методами при негативных результатах исследований молекулярно-генетическим методом.

В настоящее время в качестве общепринятых мировых стандартов рассматриваются культивирование в автоматизированных системах на жидких питательных средах в сочетании с молекулярно-генетическими методами исследования (применяемыми для идентификации и определения ЛУ МБТ). Однако это не исключает необходимость исполь-

зования традиционного метода культивирования и определения ЛЧ на ППС. Кроме того, в условиях ограниченного финансирования сохраняют актуальность некоммерческие ускоренные методы определения ЛЧ, в том числе метод, основанный на использовании нитратредуктазного теста [1].

С другой стороны, развитие технологий в области диагностики ТБ неизбежно приведет к появлению модернизированных и новых методов, позволяющих с минимальными трудозатратами и в кратчайшие сроки проводить выявление, идентификацию и определение ЛЧ возбудителя. Поэтому алгоритм проведения лабораторных исследований будет непрерывно совершенствоваться с учетом внедрения новых технологий, сначала на уровне референс-лабораторий, а в случае подтверждения высокой эффективности методов – и в региональных практических БЛ.

Широкое внедрение методов, направленных на ускоренное выявление возбудителя и определение ЛЧ МБ, позволяет при поступлении больного в стационар в более короткие сроки определять ЛУ МБТ, выявлять нетуберкулезные МБ и назначать адекватный режим химиотерапии в интенсивную фазу лечения, что в итоге позволяет сократить сроки абациллирования, повысить эффективность лечения и предотвратить (или снизить риск) распространение лекарственно-устойчивых штаммов МБТ.

Несмотря на то что современные лабораторные диагностические технологии в последние годы все более активно внедряются в практику региональных специализированных БЛ, тем не менее в значительной части лабораторий они, к сожалению, используются недостаточно. Однако Федеральные клинические рекомендации [2, 3] диктуют необходимость внедрения в БЛ медицинских организаций фтизиатрического профиля субъектов Российской Федерации полного комплекса ускоренных и традиционных методов диагностики ТБ и микобактериозов для обеспечения современных стандартов лечения. Очевидно, что обеспечение комплексного лабораторного сопровождения больных возможно только в хорошо оснащенных и централизованных лабораториях.

Заключение

Анализ лабораторных данных выявил преимущества современных ускоренных методов (бактериологического метода с применением жидких сред и анализатора Вастес MGIT 960, молекулярно-генетических методов исследования) по сравнению с традиционными методами диагностики ТБ как в сроках получения результатов, так и в эффективности выявления МБ. Следует подчеркнуть, что особенно при исследовании внелегочных диагностических материалов эффективность молекулярно-генетических методов оказалась существенно выше, чем эффективность традиционных микробиологических методов.

Тем не менее классические микробиологические методы исследования остаются востребованными и должны использоваться в лабораторной практике для диагностики ТБ.

Для получения достоверных и информативных результатов наличия МБТ в диагностическом материале и данных ЛЧ возбудителя необходимо проводить комплексные лабораторные исследования. Наряду с традиционными методами исследования, ускоренные молекулярно-генетические методы, как обеспечивающие достаточную эффективность при сокращении сроков получения результатов, должны быть в обязательном порядке включены в стандартные алгоритмы и схемы выявления МБ и определения ЛЧ возбудителя, используемые в практической работе специализированных БЛ медицинских организаций фтизиатрического профиля субъектов Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барило В. Н., Севастьянова Э. В., Чернушова Л. Н. Ускоренное определение лекарственной чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам резервного ряда микробиологическими методами исследования // Туб. – 2011. – № 10. – С. 22–27.
2. Васильева И. А., Аксенова В. А., Эргешов А. Э. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Трида», 2014. – 56 с.
3. Васильева И. А., Аксенова В. А., Эргешов А. Э. и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Трида», 2014. – 72 с.
4. Ерохин В. В., Чернушова Л. Н., Пузанов В. А. и др. Методические материалы к проведению цикла тематического усовершенствования «Лабораторная диагностика туберкулеза». – М.: Р.Валент, 2012. – 702 с.
5. Пузанов В. А., Мартынова Л. П., Коваленко О. О. Проблемы лабораторной диагностики туберкулеза и микобактериозов в неспециализированных медицинских учреждениях // Клин. лаб. диагн. – 2013. – № 9. – С. 77.
6. Чернушова Л. Н., Севастьянова Э. В., Андреевская С. Н. и др. Алгоритм микробиологических исследований для диагностики туберкулезной инфекции: Методическое пособие для врачей. – М., 2011. – 49 с.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Севастьянова Элина Викторовна
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН,
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник отдела микробиологии,
107564, г. Москва, ул. Яузская аллея, д. 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-91.
E-mail: elinasev@yandex.ru

Поступила 29.08.2014



Министерство здравоохранения РФ

ЗАСЕДАНИЕ

профильной комиссии по специальности
«Фтизиатрия» при главном фтизиатре
Минздрава России

16 марта 2015 г.



г. Москва,
гостиница «Holiday Inn»,
ул. Лесная, д. 15

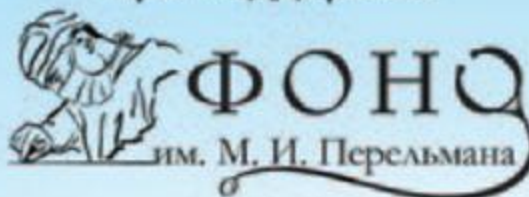
Электронная регистрация участников:

www.rus.tibl-journal.com

Технический
организатор
мероприятия:

НЬЮТЕРРА

При поддержке:



Информационный
партнер:

**ТУБЕРКУЛЁЗ
И БОЛЕЗНИ
ЛЁГКИХ**