

УДК 616-002.5-007

Оценка результатов выявления микобактерий, полученных различными методами исследования

Э.В. Севастьянова, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, И.Ю. Андриевская,
С.Н. Андреевская, Л.Н. Черноусова

Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва

Evaluation of the results of Mycobacterium detection, obtained by different studies methods

E. Sevastyanova, E. Larionova, T. Smirnova, I. Andrievskaya,
S. Andreevskaya, L. Chernousova

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow

© Коллектив авторов, 2018 г.

Резюме

На большом клиническом материале проведена сравнительная оценка эффективности использования в лабораторной практике различных методов выявления микобактерий. Охарактеризованы достоинства и ограничения для традиционных и современных ускоренных микробиологических и молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза. Сопоставлены результаты исследований, выполненных различными методами, и показано, что в настоящее время для повышения эффективности диагностики туберкулеза существует необходимость в параллельном использовании одновременно комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов.

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

Summary

Much clinical material was used to evaluate the efficiency of using different studies methods for detection of Mycobacterium in laboratory practice. Advantages and restrictions of traditional and modern accelerated microbiological and molecular-genetic methods for tuberculosis diagnosis were characterized. The results of studies performed by different methods were compared and it was shown that a set of microbiological and molecular-genetic methods should be concurrently employed to enhance the efficiency of tuberculosis diagnosis.

Keywords: tuberculosis, microbiological tuberculosis diagnosis, molecular-genetic studies, efficiency of *Mycobacterium* detection

Введение

Внедрение в клиническую практику стандартной модели лабораторного обследования, разработанной с учетом всех необходимых требований, позволит исключить излишнее дублирование анализов в лабораториях и выполнение нецелесообразных ис-

следований, не дающих дополнительной информации лечащему врачу, что существенно сократит производственную нагрузку на лаборатории и тем самым позволит улучшить качество их работы.

К сожалению, в настоящее время ни одна из технологий, применяемых в микробиологической диагностике туберкулеза (микроскопические,

бактериологические и молекулярно-генетические методы исследования), не позволяет дать полную характеристику возбудителя, поэтому возникает необходимость дублирования исследований разными методами. Наиболее дорогостоящим является дублирование исследований на уровне выявления возбудителя в диагностическом материале.

Согласно приказу Минздрава от 29.12.14 № 951 в медицинских организациях фтизиатрического профиля при постановке диагноза «туберкулез» обязательными методами исследования являются люминесцентная микроскопия, молекулярно-генетическое на наличие маркеров ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ), культуральное — на жидкой и плотной питательных средах [1].

В соответствии с последними международными рекомендациями для диагностики пациентов с подозрением на туберкулез предпочтение должно отдаваться молекулярным диагностическим тестам и посевам на жидких средах [2]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует при проведении первичной диагностики туберкулеза заменять традиционное исследование микроскопии мазка быстрыми молекулярными тестами. Последующее микроскопическое исследование мазка мокроты, выполняемое исключительно с целью оценки бактериальной нагрузки и степени контагиозности пациента, рекомендуется проводить только при получении положительного результата быстрого молекулярного теста.

Цель исследования

Провести сравнительную оценку эффективности и анализ целесообразности применения различных методов исследований для выявления МБТ. Рассмотреть возможность отказаться от использования классических методов микробиологической диагностики туберкулеза, заменив их быстрыми молекулярными тестами, введенными в стандартный алгоритм лабораторных исследований.

Материалы и методы исследования

Выявление микобактерий из различных видов диагностического материала, полученного от пациентов, обследуемых с целью диагностики и контроля химиотерапии туберкулеза, проводили с использованием следующих методов: люминесцентной микроскопии; 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).

Первичную идентификацию культуры проводили с использованием ID-теста TB Ag MPT64 Rapid (Standard Diagnostics, Корея) и микроскопией препаратов с окраской по Цилю–Нильсену. Видовую идентификацию микобактерий осуществляли с использованием молекулярного метода, основанного на множественной обратной гибридизации с ДНК-зондами GenoType CM/AS (Hain Lifescience, Германия).

Результаты и их обсуждение

Проведено сравнительное исследование показателей эффективности (доли исследований с положительными результатами среди всех исследований данного вида) различных методов выявления МБТ. Исследование проводили на разных видах диагностических материалов, выделенных от больных туберкулезом или другими заболеваниями органов дыхания, находящихся на лечении в клинике ЦНИИТ.

Первоначально в исследование были включены 2642 больных, которым назначалось микробиологическое исследование для выявления возбудителя туберкулеза из одного образца диагностического материала разными методами одновременно. Таким образом, каждый из испытуемых образцов исследовали комплексно тремя методами: люминесцентная микроскопия, посев на жидкую среду с последующим культивированием в анализаторе BACTEC MGIT 960 и ПЦР-РВ. Результаты проведенных исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1

Сравнительная эффективность выявления микобактерий из одного образца диагностического материала различными методами исследования

Число обследованных больных		Число больных с положительными результатами выявления микобактерий различными методами					
		люминесцентная микроскопия		BACTEC MGIT 960		ПЦР-РВ	
абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
2642	100	722	27,3	869	32,9	1404	53,1

Из полученных данных (табл. 1) следует, что наиболее высокая эффективность выявления МБТ (53,1%) наблюдалась для метода ПЦР-РВ (разница с другими методами достоверна, $p < 0,05$).

Следует заметить, что в приведенный анализ, кроме больных с верифицированным диагнозом «туберкулез», вошли пациенты с дифференциальными диагнозами и больные с неспецифическими заболеваниями легких, что автоматически увеличило количество отрицательных результатов для всех методов.

Кроме того, в исследование были включены пациенты, обследуемые как с целью диагностики, так и контроля химиотерапии туберкулеза, что также объясняет относительно невысокие показатели выявления микобактерий в целом и не слишком большое преимущество в положительных результатах, полученных культуральным методом, по сравнению с методом микроскопии.

Тем не менее проведенное исследование позволило сделать однозначный вывод о том, что использование молекулярно-генетического метода дает возможность получить достоверно более высокий процент положительных результатов в сравнении с традиционными микробиологическими методами. Кроме того, важным достоинством метода ПЦР-РВ является также быстрота получения результатов.

Однако, несмотря на преимущества, молекулярно-генетические методы, как уже указывалось выше, используют в лабораторной практике для выявления МБТ в тандеме с микроскопическим и культуральным методами исследования, что регламентировано нормативными документами [1, 3]. Вместе с тем сверхнормативная нагрузка негативно сказывается на эффективности и качестве работы лаборатории, в связи с чем необходима оптимизация схемы микробиологического обследования пациентов с целью диагностики и последующего контроля химиотерапии туберкулеза для снижения количества выполняемых анализов.

В этой связи мы провели анализ лабораторных данных, полученных в отделе микробиологии ЦНИИТ, с целью оценить необходимость дублирования исследований по выявлению микобактерий разными методами диагностики, выполняемыми из одного образца диагностического материала.

Для данного анализа были отобраны 2692 образца мокроты, выделенных от больных туберкулезом и поступивших в лабораторию из лечебных подразделений ЦНИИТ. Из каждой порции мокроты выполняли одновременно посев на жидкую среду для культивирования в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960, а также исследование на наличие ДНК МБТ методом ПЦР-РВ. Указанный молекулярно-генетический метод, использующий отечественные тест-системы, широко применяется в РФ и хорошо себя зарекомендовал.

В ходе проводимого исследования для 118 образцов из 2692 (4,4% случаев, что не превышало допустимой нормы) не удалось получить каких-либо достоверных результатов исследования методом посева ввиду контаминации этих посевов посторонней микрофлорой. В то же время для указанных 118 образцов положительные результаты методом ПЦР-РВ были получены в 46 случаях (39%), а отрицательные — в 72 случаях (61%).

Таким образом, метод ПЦР-РВ дал возможность выявить наличие ДНК МБТ и в дальнейшем протестировать лекарственную устойчивость молекулярным методом в образцах, для которых были получены неинтерпретируемые результаты методом ВАСТЕС MGIT 960. Количество таких случаев составило 1,7% общего числа взятых в настоящее исследование образцов.

Далее было установлено, что из 2692 исследованных образцов 35 дали положительные результаты методом ВАСТЕС MGIT 960 при отрицательных результатах, полученных методом ПЦР-РВ, а в ходе дальнейших исследований было выявлено наличие в этих 35 образцах нетуберкулезных микобактерий.

Таким образом, общее число случаев, при которых метод ПЦР-РВ показал отсутствие в материале ДНК МБТ, а использование метода ВАСТЕС MGIT 960 позволило получить и в дальнейшем идентифицировать культуру, определив ее видовую принадлежность к нетуберкулезным микобактериям, составило 1,3%. Отметим, что информация о наличии у больного нетуберкулезных микобактерий чрезвычайно важна для клиницистов при постановке правильного диагноза и назначении схемы лечения.

Для оставшихся 2539 образцов мокроты было проведено сравнение показателей удельного веса возможных сочетаний положительных и отрицательных результатов наличия МБТ, полученных обоими методами. Данные сравнительного изучения результативности методов ВАСТЕС MGIT 960 и ПЦР-РВ представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сопоставление положительных и отрицательных результатов выявления МБТ из образцов мокроты, выделенных от больных туберкулезом, при использовании методов ВАСТЕС MGIT 960 и ПЦР-РВ

Результаты	ПЦР-РВ+	ПЦР-РВ-	Всего
ВАСТЕС+	854 (33,7%)	95 (3,7%)	949 (37,4%)
ВАСТЕС-	379 (14,9%)	1211 (47,7%)	1590 (62,6%)
Всего	1233 (48,6%)	1306 (51,4%)	2539 (100%)

Из приведенных в табл. 2 данных следует, что в 2539 образцах положительные результаты выявления МБТ методом посева на жидкие среды в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 были получены для 949 образцов (37,4%), а положительные результаты обнаружения ДНК МБТ методом ПЦР-РВ — для 1233 образцов (48,6%).

При этом были обнаружены расхождения в результатах, полученных разными методами из одного образца. Количество случаев с положительным результатом ПЦР-РВ при отрицательном результате

посева на BACTEC MGIT 960 составило 379 (14,9%), в то время как отрицательный результат ПЦР-РВ при положительном результате посева на BACTEC MGIT 960 наблюдался в 95 случаях (3,7%).

Отметим, что в данном эксперименте расчетное значение чувствительности метода ПЦР-РВ по отношению к методу BACTEC MGIT 960, являющемуся «золотым стандартом» диагностики для выявления МБТ, составило 90%.

Далее мы оценили чувствительность (по отношению к методу BACTEC MGIT 960) еще одного ускоренного метода молекулярно-генетической диагностики, а именно: картриджной технологии, выполняемой с помощью набора реагентов Xpert MTB/RIF на анализаторе GeneXpert. Указанный метод одобрен и рекомендован к использованию Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), как обладающий хорошими диагностическими характеристиками и позволяющий получать своевременные и достоверные данные для клинического и эпидемиологического использования.

Результаты проведенного в ЦНИИТ сравнительного исследования методов Xpert MTB/RIF и BACTEC MGIT 960 представлены в табл. 3. Анализ результатов позволяет сделать вывод о том, что при использовании метода Xpert MTB/RIF также имели место расхождения в результатах с методом BACTEC MGIT 960 (табл. 3). В данном опыте чувствительность метода Xpert MTB/RIF относительно метода BACTEC MGIT 960 составила 91,7%, что согласуется с данными литературы [2, 4].

Таблица 3

Сопоставление положительных и отрицательных результатов обнаружения МБТ методами BACTEC MGIT 960 и GeneXpert MTB/RIF

Результаты	Xpert MTB/RIF+	Xpert MTB/RIF-	Всего
BACTEC +	66 (34,4%)	6 (3,1%)	72 (37,5%)
BACTEC-	19 (9,9%)	101 (52,6%)	120 (62,5%)
Всего	85 (44,3%)	107 (55,7%)	192 (100%)

Кроме того, представлялось интересным провести сравнение между собой двух различных молекулярно-генетических методов исследования (метода ПЦР-РВ и метода GeneXpert MTB/RIF) и оценить степень расхождения получаемых с их помощью результатов по обнаружению в диагностическом материале ДНК МБТ.

Результаты данного исследования представлены в табл. 4. Анализ полученных данных показал, что изучаемые молекулярно-генетические методы не позволили получить 100% совпадения результатов обнаружения ДНК МБТ. Вместе с тем было отмечено, что метод ПЦР-РВ обладает несколько более высокой чув-

ствительностью по сравнению с методом GeneXpert MTB/RIF (табл. 4).

Таблица 4

Сопоставление показателей выявления ДНК МБТ различными молекулярно-генетическими методами исследования

Результаты	Xpert MTB/RIF+	Xpert MTB/RIF-	Всего
ПЦР-РВ+	127 (34,6%)	23 (6,3%)	150 (40,9%)
ПЦР-РВ-	6 (1,6%)	211 (57,5%)	217 (59,1%)
Всего	133 (36,2%)	234 (63,8%)	367 (100%)

Сопоставление и анализ результатов использования культурального и молекулярно-генетических методов позволяют сделать вывод о том, что эти методы являются взаимодополняющими, и для получения максимально достоверных и информативных результатов наличия микобактерий в диагностическом материале необходимо использовать различные методы исследования в комплексе. Ускоренные молекулярно-генетические методы, обязательные к применению, как обеспечивающие высокую эффективность и быстроту получения результатов, должны быть, тем не менее, параллельно продублированы классическими микробиологическими методами диагностики туберкулеза.

Известно, что метод посева на жидкие среды с использованием автоматического микробиологического анализатора BACTEC MGIT 960 не только обладает высокой диагностической чувствительностью, но и позволяет получить культуру, которую в дальнейшем подвергают идентификации, что дает возможность выявлять наличие в образце как МБТ, так и нетуберкулезных микобактерий.

Следует отметить, что преимуществом культурального метода с применением автоматизированной системы является высокая эффективность стандартизованных на уровне сертифицированных по ISO 9001 производств реагентов и сред, а также использование заданных протоколов исследований. В то же время основное преимущество молекулярно-генетических методов выделения ДНК МБТ и определения мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, состоит в том, что эти методы являются быстрыми, позволяя получить результаты в очень короткий временной период. Минимизация ручного труда, имеющая место при использовании как автоматизированных бактериологических анализаторов, так и современных молекулярно-генетических методов, снижает вероятность ошибок оператора при выполнении исследований указанными методами.

Таким образом, проведенный нами анализ лабораторных данных выявил значительные и неоспоримые

преимущества современных диагностических методов (бактериологический автоматизированный метод с применением жидких питательных сред и анализатора ВАСТЕС MGIT 960, молекулярно-генетический метод ПЦР-РВ) по сравнению с традиционным методом микроскопии. Однако метод микроскопии, обладающий относительно невысокой чувствительностью, также продолжает сохранять свою актуальность, так как позволяет быстро и с минимальными финансовыми затратами выявлять наиболее эпидемически значимых больных туберкулезом с массивным бактериовыделением.

Необходимость дублирования молекулярно-генетических исследований методом микроскопии связана с тем, что, хотя методы микроскопии и являются, как известно, наименее чувствительными, однако отечественная законодательная база, определяющая классификацию пациентов и наличие бактериовыделения, основывается именно на результатах этого исследования. Несмотря на то, что молекулярно-генетические методы имеют значительно более высокую чувствительность, чем метод микроскопии, по их результатам клиницисты не могут судить о заразности больного и обосновывать диагноз, который ставится на основании комплекса исследований. От того каким именно методом выявлены МБТ, зависит и диагноз, и лечение, и контроль лечения. Для эпидемиологов и врачей очень важно знать, насколько больной туберкулезом опасен для окружающих, и такое понятие, как бактериовыделение, выявленное микроскопически и/или посевом, определяется соответствующими методами.

Кроме того, метод микроскопии может помочь заподозрить наличие у пациента нетуберкулезных микобактерий в тех случаях, когда молекулярно-генетический метод показал отсутствие в образце ДНК МБТ, а в мазке были выявлены кислотоустойчивые микобактерии (КУМ).

В связи с вышеизложенным, на наш взгляд, не рекомендуется исключать микроскопическое исследование на наличие КУМ из схемы обследования, проводимого в специализированных противотуберкулезных учреждениях с целью диагностики и контроля химиотерапии туберкулеза.

Что касается первичного обследования лиц с подозрением на туберкулез по месту жительства, то в настоящее время во всех клинико-диагностических лабораториях (КДЛ) учреждений первичной медико-санитарной помощи (ПМСП) для выявления КУМ используется метод микроскопии по Цилю–Нильсену. В соответствии с рекомендациями ВОЗ он может быть заменен на современный молекулярно-генетический метод Xpert MTB/RIF, к существенным достоинствам которого можно отнести простоту проведения исследования и отсутствие строгих требований к зониро-

ванию рабочих помещений, в связи с чем этот метод (в отличие от метода ПЦР-РВ) не требует развертывания полноценной ПЦР-лаборатории и может использоваться не только в специализированных лабораториях противотуберкулезных учреждений, но и в КДЛ учреждений ПМСП.

Однако следует иметь в виду, что расходные материалы для метода Xpert MTB/RIF являются дорогостоящими, а кроме того, использование в КДЛ только лишь данного метода не позволит заподозрить у пациента наличия нетуберкулезных микобактерий и, соответственно, такого заболевания, как микобактериоз. В настоящее время приказ МЗ РФ регламентирует, что в непрофильных медицинских организациях обязательным диагностическим исследованием при подозрении на туберкулез является микроскопическое исследование трех проб мокроты на наличие КУМ методами Циля–Нильсена или люминесцентным, а при получении отрицательного результата микроскопического исследования мокроты проводится молекулярно-генетическое исследование на наличие маркеров ДНК МБТ [1].

Заключение

Суммируя результаты проведенных исследований, отметим, что сочетанное использование в алгоритмах и схемах обследования комплекса различных диагностических методов, неизбежно дублирующих друг друга, является в настоящее время вынужденной необходимостью, позволяющей получить максимально точные, достоверные и всеобъемлющие результаты, характеризующие возбудитель туберкулеза.

«Золотым стандартом», обеспечивающим высокую диагностическую чувствительность выявления микобактерий, является метод посева на жидкие среды с последующим культивированием в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960.

Вместе с тем преимуществами молекулярно-генетических методов выявления ДНК МБТ являются высокая эффективность и быстрота получения результатов. Положительный результат молекулярно-генетических исследований при наличии минимальных признаков активности туберкулезного процесса позволяет, значительно сокращая время диагностического процесса, быстро приступить к лечению активного туберкулеза, имея при этом определенные данные и о лекарственной устойчивости МБТ.

В то же время положительный результат микроскопического исследования позволяет судить о наличии бактериовыделения и характеризует степень инфекционности пациента, а при отрицательном результате молекулярного теста позволяет предположить присутствие нетуберкулезных микобактерий.

Таким образом, сопоставляя и анализируя результаты исследований, выполненных различными методами, можно сделать заключение о том, что в настоящее время для повышения эффективности диа-

гностики туберкулеза необходимо параллельное использование одновременно комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов.

Список литературы

1. Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания: приказ МЗ РФ от 29.12.14 № 951. М., 2014. Ob utverzhdenii metodicheskikh rekomendacij po sovershenstvovaniyu diagnostiki i lecheniya tuberkuleza organov dyhaniya: prikaz MZ RF ot 29.12.14 N 951. Moscow, 2014.
2. Алгоритм лабораторной диагностики и мониторинга лечения туберкулеза легких и туберкулеза с лекарственной устойчивостью на основе применения современных быстрых молекулярных методов // Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. 2017. 29 с. URL: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/336118/ELI-TB-Laboratory_diag_algorithm_RUS.pdf?ua=1. Algoritm laboratornoj diagnostiki i monitoringa lecheniya tuberkuleza legkih i tuberkuleza s lekarstvennoj ustojchivost'yu na osnove primeneniya sovremennyh bystryh molekulyarnyh metodov //
3. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. РОФ. М., 2015. 35 с. Federal'nye klinicheskie rekomendacii po organizacii i provedeniyu mikrobiologicheskoy i molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki tuberkuleza. ROF. Moscow, 2015. 35 s.
4. Севастьянова Э.В., Пузанов В.А., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н. Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследования для диагностики туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 1. С. 35–40. Sevastyanova E.V., Puzanov V.A., Smirnova T.G., Larionova E.E., Chernousova L.N. Ocenka kompleksa mikrobiologicheskikh i molekulyarno-geneticheskikh metodov issledovaniya dlya diagnostiki tuberkuleza // Tuberkulez i bolezni legkih. 2015. N 1. S. 35–40.

Поступила в редакцию 14.06.2018 г.

Сведения об авторах:

Севастьянова Элина Викторовна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; e-mail: elinasev@yandex.ru;

Ларионова Елена Евгеньевна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией микробиологической диагностики туберкулеза Центрального научно-исследовательского института туберкулеза; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; e-mail: larionova_ena@mail.ru;

Смирнова Татьяна Геннадьевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; e-mail: s_tatka@mail.ru;

Андреевская Ирина Юрьевна — младший научный сотрудник отдела микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; e-mail: andrievskaya.iri@mail.ru;

Андреевская Софья Николаевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; e-mail: andsofia@mail.ru;

Черноусова Лариса Николаевна — доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом микробиологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза; 107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2; e-mail: Ichernousova@mail.ru.