



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.2.012>



Виташкевич О.А.¹, Николенко Е.Н.²✉

¹ Республиканская больница Исправительного учреждения «Исправительная колония № 12» управления Департамента исполнения наказаний Министерства внутренних дел Республики Беларусь по Витебской области, Орша, Беларусь

² Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии, Минск, Беларусь

Эффективность лабораторной диагностики туберкулеза на основе применения «быстрых» молекулярно-генетических (GeneXpert, LineProbeAssay) и бактериологических методов анализа, реализованных в Республиканской больнице ИУ «ИК № 12» (обзор результатов исследований)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Виташкевич О.А. – концепция и дизайн статьи; Николенко Е.Н. – редактирование, обзор литературы.

Подана: 22.03.2023

Принята: 02.05.2023

Контакты: nikelen@tut.by

Резюме

Туберкулез со множественной и широкой лекарственной устойчивостью является глобальной проблемой здравоохранения. В Республике Беларусь, несмотря на резкое снижение заболеваемости в последние годы, число случаев туберкулеза со множественной лекарственной устойчивостью остается достаточно высоким: одна треть вновь диагностированных пациентов с туберкулезом и две трети пролеченных пациентов имеют форму со множественной лекарственной устойчивостью. Сложность эпидемиологической ситуации обуславливает высокие требования к качеству лабораторной диагностики туберкулеза, стандартизации исследований, использованию современных диагностических технологий – автоматизированных диагностических систем, молекулярно-генетических исследований. В статье представлен анализ использования молекулярно-генетических методов (Xpert MTB/Rif, LineProbeAssay) в лабораторной диагностике туберкулеза в сравнении с фенотипическими методами: с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 и классических методов исследования. Анализ проводился на основании данных обследования пациентов с туберкулезом, находившихся на лечении в Республиканской больнице ИУ «ИК № 12» за период с 2012 по 2021 год.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерия туберкулеза, молекулярно-генетические методы, фенотипические методы, тесты лекарственной чувствительности

Aksana A. Vitashkevich¹, Alena N. Nikolenka²✉

¹ Republican Hospital of the Correctional Institution "Correctional Facility No. 12" of the Department of Corrections of the Ministry of Internal Affairs of the Republic of Belarus of the Vitebsk Region, Orsha, Belarus

² Republican Scientific and Practical Center of Pulmonology and Phthisiology, Minsk, Belarus

Effectiveness of the Laboratory Diagnostics of Tuberculosis Based on the "Fast" Molecular and Genetic (GeneXpert, LineProbeAssay) and Bacteriological Analysis Methods Implemented in the Republican Hospital of the Correctional Institution "Correctional Facility No. 12": Research Results Review

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Aksana A. Vitashkevich – article concept and design; Alena N. Nikolenka – editing, literature review.

Submitted: 22.03.2023

Accepted: 02.05.2023

Contacts: nikelen@tut.by

Abstract

Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis is a global public health problem. Despite a sharp decline in morbidity in recent years in the Republic of Belarus, the number of multidrug-resistant tuberculosis cases remains quite high: one third of newly diagnosed tuberculosis patients and two thirds of treated patients present a multidrug-resistant form. Challenging epidemiological situation determines high requirements for the quality of tuberculosis laboratory diagnostics, tests standardization, for use of modern diagnostic technologies, i.e. automated diagnostic systems, and molecular and genetic testing. The article presents an analysis of molecular genetic methods (Xpert MTB/Rif, LineProbeAssay) applied in laboratory diagnosis of tuberculosis compared with phenotypic methods: by using BACTEC MGIT 960 automated system and conventional testing methods. The analysis was carried out on the basis of the findings of medical examination of tuberculosis patients who were treated at the Republican Hospital of the Correctional Institution "Correctional Facility No. 12" for the period from 2012 to 2021.

Keywords: tuberculosis, mycobacterium tuberculosis, molecular genetic methods, phenotypic methods, drug sensitivity tests

Заболееваемость туберкулезом и смертность от него к настоящему времени остаются важными медико-социальными проблемами во всем мире, и положить конец эпидемии является одной из задач Целей в области устойчивого развития до 2030 года. Одной из причин сохранения высокого уровня заболеваемости и смертности от туберкулеза является наличие форм со множественной лекарственной устойчивостью [1].



Молекулярно-генетические методы (МГМ) обладают значительными преимуществами с точки зрения расширения масштабов, предусмотренных программой ведения и контроля случаев лекарственно-устойчивого туберкулеза (ТБ), обеспечивая более быструю диагностику, стандартизованное тестирование, потенциально высокую пропускную способность и меньшее число требований в отношении обеспечения биологической безопасности лаборатории [5].

Алгоритмом лабораторной диагностики ВОЗ «быстрые» молекулярно-биологические методы исследования (Xpert MTB/Rif/ULTRA и LineProbeAssay) определены как предпочтительные для первичной диагностики ТБ и определения лекарственной чувствительности (ТЛЧ) к противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТЛС) первой и второй линии. Особенно важна быстрая диагностика в случаях туберкулеза со множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ) при неэффективности проводимой терапии [2, 3]. Основные достоинства МГМ – это скорость получения результата, высокая чувствительность и специфичность.

Система GeneXpert является первой в мире системой, позволяющей выполнять все этапы ПЦР-анализа, включая пробоподготовку образца, экстракцию, амплификацию, детекцию и идентификацию последовательностей нуклеиновых кислот в одном приборе, что значительно снижает риск контаминации и недостоверных результатов [7].

Тесты LineProbeAssay (LPA, Хайн-тест) – GenoTypeMTBDRplus и GenoTypeMTBDRsl – основаны на DNA-STRIP технологии (гибридизации с ДНК-зондами). Эти тесты позволяют обнаружить ДНК микобактерий туберкулезного комплекса и определить чувствительность их к ПТЛС первой (изониазид, рифампицин) и второй (фторхинолоны и аминогликозиды / циклические пептиды, включающие инъекционные антибиотики: анрамицин, амикацин, капреомицин) линии [4].

В 2018 году, после детального изучения всех выявляемых методом LPA мутаций, ВОЗ были разработаны новые правила интерпретации результатов, которые позволили определять лекарственную чувствительность к этионамиду/протионамиду, выделить из группы фторхинолонов отдельно левофлоксацин и моксифлоксацин. Появилась возможность выявлять мутации, ассоциированные с низким и высоким уровнем минимальной ингибирующей концентрации (МИК) изониазида и моксифлоксацина, определяющие эффективность применения высоких доз этих ПТЛС при лечении ТБ. Этим обусловлено основное применение теста LPA – определение лекарственной чувствительности и своевременное выявление пациентов с МЛУ-ТБ и ШЛУ-ТБ.

В Республиканской больнице ИУ «ИК № 12» современные молекулярно-генетические методы (LPA, Xpert MTB/Rif/ULTRA) внедрены в работу в 2012–2014 гг. Применение наряду с МГМ классических и ускоренных методов бактериологической диагностики с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 позволяет дать сравнительную характеристику получаемых результатов.

Все методы характеризуются чувствительностью и специфичностью. Самый простой и дешевый, но наименее чувствительный метод – метод световой бактериоскопии. За период с 2012 по 2021 год было получено 11,6% (10,7–12,5%) положительных результатов. Рост микобактерий туберкулеза (МБТ) на плотных питательных средах (ППС) был получен в 17,9% (16,6–19,2%) от всех посевов, на жидких средах (MGIT) –

27,5% (25,8–29,2%), что подтверждает большую чувствительность жидких питательных сред. При тестировании в системе GeneXpert MTB/Rif с 2014 по 2021 год было получено 29,6% (21,2–37,9%) положительных результатов, из них 54,5% рифампицин-устойчивых штаммов МБТ.

Важным фактором является время оборота теста (BOT), то есть период времени между двумя специфицированными «точками» – назначением исследования и выдачей его результата, включающий в себя преаналитический, аналитический и пост-аналитический этапы. Время получения положительного результата на плотных питательных средах при посеве материала с положительной бактериоскопией составило в среднем 23 сут., с отрицательной бактериоскопией – 32 сут.; на жидких средах – от 13 до 27 сут. соответственно. При суммировании времени получения положительного результата посева и ТЛЧ BOT при посеве на плотные среды составило 53–62 сут. после посева, а с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 – 27–41 сут. Использование «быстрых» методов молекулярно-генетического исследования (Xpert MTB/Rif) позволяет в максимально короткие сроки (2–3 часа) не только получить подтверждение наличия у пациента ДНК МБТ, но и выявить случаи МЛУ-ТБ по обнаружению мутаций в гене *rpoB*, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину. Выполнение теста LPA занимает от 1 до 2 суток, исследование может производиться как с первичным материалом пациента, так и с выделенной культурой МБТ.

При анализе результатов молекулярно-генетических (Xpert MTB/Rif) и бактериоскопических исследований выявлено, что положительные результаты микроскопии регистрировалась только в 66,5% случаев из всех положительных результатов Xpert MTB/Rif (преимущественно со средним и высоким уровнями выявления ДНК микобактерий туберкулезного комплекса). Это подтверждает более высокую чувствительность молекулярно-генетического метода, поэтому ВОЗ рекомендует заменять бактериоскопию мазка по Цилю – Нильсену быстрыми молекулярными тестами [6]. В то же время отрицательный результат Xpert MTB/RIF не гарантирует отсутствия микобактерий туберкулеза в образце. Так, в 5,6% образцов с отрицательным результатом молекулярно-генетического исследования (Xpert MTB/Rif) был выявлен рост микобактерий туберкулеза при посеве на плотные и жидкие питательные среды. 6,4% образцов с положительным результатом Xpert MTB/Rif не дали роста МБТ на питательных средах. Наибольшее количество не подтвержденных посевом результатов регистрировалось при использовании более чувствительной версии GeneXpert MTB/RIF Ultra (при обнаружении низкого уровня МБ туберкулезного комплекса – следы). Выявленное расхождение можно объяснить как порогом чувствительности метода, так и наличием нежизнеспособных микобактерий в диагностическом материале.

При использовании молекулярно-генетического анализа Xpert MTB/Rif совпадение показателей теста лекарственной чувствительности (ТЛЧ) к рифампицину с результатами применения фенотипических методов исследования составило 99,8% (99,7–99,9%), что подтверждает высокую чувствительность метода при значительно меньшем времени оборота теста.

Расхождение результатов ТЛЧ при использовании фенотипических и молекулярно-биологических методов исследования может быть обусловлено различными причинами: неканоническими мутациями, определяющими уменьшение минимальных ингибирующих концентраций, наличием молчащих мутаций (изменение



нуклеотидной последовательности ДНК в исследуемом локусе, что может интерпретироваться как вероятная резистентность; в то же время молчание мутации не приводит к фенотипическим изменениям микроорганизма), гетерорезистентностью в связи с инфицированием пациента двумя различными штаммами, суперинфекцией или сегрегацией одного штамма, представленного чувствительными и резистентными МБ (вследствие неадекватной химиотерапии) [4, 8].

Расхождения результатов определения чувствительности к рифампицину методами молекулярно-генетического исследования (Xpert MTB/Rif) и LPA (LineProbeAssay, Хайн-тест) составили 0,3%. В соответствии с рекомендациями ВОЗ более достоверными считаются результаты LPA, так как в них заложен анализ большего количества мутаций [3].

Совпадение результатов оценки показателей ТЛЧ методом LPA с 2012 по 2021 год с фенотипическими методами составило: изониазид – 99,6% (99,4–99,8%), рифампицин – 98,2% (97,7–98,7%), фторхинолоны – 94,2% (88,9–99,5%), аминогликозиды/циклопептиды – 90,6% (81,2–99,4%). Результаты LPA по высокой концентрации моксифлоксацина достоверно чаще коррелировали с ТЛЧ с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 – совпадение составило 99,1% (98,7–99,5%).

Вариабельность результатов может быть связана с наличием в образце гетерорезистентных штаммов МБТ: с использованием молекулярно-генетических технологий Xpert MTB/Rif и LPA выявляются мутации, идентифицированные МУТ-зондами, если их имеют не менее 5% МБТ в популяции, но МГМ не могут выявить МБТ с мутациями, идентифицированными отсутствием зондов ДТ (дикого типа), если их количество меньше 95% от общей популяции. Если лекарственно-чувствительные микобактерии присутствуют в образце в более высокой концентрации, результат фенотипического ТЛЧ будет чувствительный. Поэтому в соответствии с рекомендациями ВОЗ устойчивость МБТ, обнаруженная МГМ, должна быть подтверждена фенотипически, за исключением отдельных случаев очевидных мутаций с высокой доказательной базой [8].

За время использования МГМ тесты продемонстрировали свою высокую специфичность: с их помощью были идентифицированы микст-культуры – ассоциация МБТ и нетуберкулезных микобактерий (НТМ), что затруднительно при использовании культурального метода. Применение диагностического набора GenoType Mucobacterium CM позволило производить быструю видовую идентификацию нетуберкулезных НТМ в выделенных культурах.

Однако чувствительность LPA GenoTypeMTBDRsl ver.2, рекомендованной производителем для работы с бактериоскопически отрицательными образцами, по полученным нами данным, на нашем опыте все же оказалась невысокой: для успешного прохождения теста образцы материала от пациентов должны были иметь положительный результат бактериоскопии на КУБ (не менее 1+).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетические методы диагностики туберкулеза обладают наиболее высокой чувствительностью и специфичностью. Использование молекулярно-генетических методов в Республиканской больнице ИУ «ИК № 12» сократило сроки диагностики туберкулеза в 3–4 раза. Но, так как ни один лабораторный метод не может обладать 100%-ной достоверностью, расхождения результатов неизбежны. Поэтому

должен применяться основанный на предложенном алгоритме комплексный методический подход с использованием молекулярно-генетических и фенотипических исследований. Выполнение посевов и постановка тестов лекарственной устойчивости с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 признаны ВОЗ «золотым стандартом» лабораторной диагностики туберкулеза.

Исследование из одного образца материала разными методами необходимо как для быстрой диагностики туберкулеза, так и для подтверждения достоверности результатов ТЛЧ. Получение достоверных результатов лабораторной диагностики в максимально короткие сроки – залог своевременной и успешной терапии туберкулеза и предупреждения его распространения.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lomat L.N., Kovalevskiy K.O., Tymofeychik E.S. *Tuberculosis situation in the world and the Republic of Belarus*. Minsk: BSMU. 2023:14. (in Russian)
2. *Diagnosis and treatment of tuberculosis patients (adults, children): Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus 04.04.2019 No., pp. 26–69.* (in Russian)
3. *Laboratory diagnostic procedure and treatment of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis monitoring based on the today's fast molecular methods.* WHO Regional Office for Europe. 2019:40.
4. *Guidelines for GenoType MTBDRsl ver.2.* HAINLIFECEINCE. 2017; 12 p.
5. *Guidelines for laboratory diagnosis of tuberculosis: Order of the Ministry of Health of the Republic of Belarus No. 377.* 2013:124. (in Russian)
6. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis: module 3: diagnosis: rapid diagnostics for tuberculosis detection.* 2021:142.
7. World Health Organization. *Guidelines for the diagnostic test Xpert MTB/Reimplementation. Technical and operational recommendations, practical issues.* 2014:28.
8. *Molecular hybridization tests with type-specific probes for detecting drug-resistant tuberculosis: Guide for interpretation and reporting for laboratory staff and doctors/GLI TB.* 2019:42.