

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА НА БИОПСИЙНОМ МАТЕРИАЛЕ ЛЕГКИХ

Сурков Л.К.¹, Яцкевич Н.В.^{1,2}, Залуцкая О.М.¹,
Шпаковская Н.С.¹, Дюсмикеева М.И.^{1,2}

¹ Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии,

² Белорусский государственный медицинский университет,
Беларусь, Минск

В данной статье авторами показана высокая диагностическая точность молекулярно-генетического теста GeneXpert MTB /Rif для одновременного быстрого выявления ДНК МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину на биопсийном материале легких, полученном при видеоторакокопии, в случаях подозрения на туберкулез или дифференциальной диагностики с туберкулезом у 345 пациентов.

Выявлена высокая степень совпадения положительных результатов молекулярно-генетических тестов в биоптатах легочной ткани с морфологическими признаками активности туберкулезного процесса. Установлена лекарственная устойчивость МБТ к рифампицину непосредственно в очаге воспаления недоагностированная ранее другими методами.

Ключевые слова: молекулярная диагностика, дифференциальная диагностика туберкулеза, эффективность.

DIAGNOSTIC OPPORTUNITIES OF MOLECULAR-GENETIC TESTS IN THE DIAGNOSTICS OF A TUBERCULOSIS BASED ON INVESTIGATION OF LUNG TISSUE BIOPSY SAMPLES

Surkova L.K.¹, Yatskevich N.V.^{1,2}, Zalutskaya O.M.¹,
Shpakovskaya N.S.¹, Dyusmikeeva M.I.^{1,2}

¹ Republican Scientific and Practical Center for Pulmonology and Phthisiology,

² Belorussian State Medical University,
Belarus, Minsk

In this article, the authors showed a high diagnostic accuracy of the GeneXpert MTB / Rif molecular-genetic test for the simultaneous rapid detection of MBT DNA and determination of drug susceptibility to rifampicin on lung tissue biopsy samples obtained by videotoracoscopy in cases of suspected tuberculosis or differential diagnosis with tuberculosis in 345 patients.

A high degree of coincidence of positive results of molecular genetic tests in lung tissue biopsy samples. Drug resistance of MBT to rifampicin directly in the inflammation center, undiagnosed earlier by other methods, has been established.

Key words: molecular diagnostics, differential diagnosis of tuberculosis, efficiency.

Определение чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТЛС) является главным в стратегии лечения туберкулеза с лекарственной устойчивостью, так как позволяет назначить адекватную схему химиотерапии. В то же время определение лекарственной чувствительности МБТ не всегда представляется возможным из-за ограниченности и олигобактериальности туберкулезного процесса.

По данным отчетности по республике Беларусь за 2017 год удельный вес пациентов с туберкулезом с отрицательными результатами микроскопии и посева мокроты составил 20,08%.

Основные принципы и подходы, на которых базируется лабораторная диагностика туберкулеза, изложенные в международных рекомендациях, включают: обязательное проведение на одном диагностическом образце молекулярно-генетических тестов, позволяющих быстро выявить ДНК МБТ в диагностическом материале и одновременно определить лекарственную чувствительность к рифампицину и к другим ПТЛС 1-го и 2-го рядов, выполнение посевов на жидкую и плотную питательные среды, проведение видовой идентификации микобактерий и тестирование лекарственной чувствительности (ТЛЧ) к ПТЛС 1-го и 2-го рядов при отрицательных результатах на предыдущих этапах исследования [1].

Молекулярными методами, одобренными и рекомендованными ВОЗ, являются: картриджная технология GeneXpert MTB /Rif и метод молекулярной гибридизации с типоспецифическими зондами (Line Probe Assay (LPA)).

В Республике Беларусь, как и в России этот метод получил название ДНК-стриповая технология или Hain тест (по названию тест-системы Hain, Life Science, Германия).

В связи с широким внедрением в практику видеоторакоскопической технологии получения биопсийного материала легких значительно возросли возможности детекции ДНК МБТ с одновременным определением лекарственной чувствительности возбудителя непосредственно в очагах воспаления.

В республике разработан и используется в клинической практике алгоритм диагностики заболеваний органов дыхания с использованием малоинвазивных видеоассистированных оперативных вмешательств с интегрированным комплексом методов морфологического, молекулярно-генетического и бактериологического исследования биопсийного материала [2].

Доказана эффективность молекулярно-генетического исследования резецированных участков легких для выявления ДНК МБТ в очагах поражения и определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза [3]. Однако в проведенных ранее исследованиях не оценивались результаты молекулярно-генетического исследования резецированных участков легких в зависимости от характера и степени активности туберкулезных изменений.

Ограниченные возможности морфологической верификации целого ряда патологических процессов при гранулематозном воспалении, характер которого не всегда можно определить гистологически, обосновывают целесообразность дополнительного использования бактериологических и молекулярно-генетических методов исследования биопсийного материала.

Цель исследования: определить диагностическую точность молекулярно-генетического исследования для одновременного быстрого выявления ДНК МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину на биопсийном материале легких у различных категорий пациентов с изменением в легких без бактериовыделения МБТ и сопряженность выявления ДНК МБТ в легочной ткани с особенностями морфологических проявлений и степенью активности туберкулезного процесса.

В исследование включено 345 пациентов (мужчин – 200, женщин – 145) в возрасте от 19 до 67 лет, находившихся на обследовании и лечении в клинике РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии с января 2017 по июнь 2018 года, которым проводилась дифференциальная диагностика туберкулеза с хроническими неспецифическими заболеваниями и опухолями легких и при лабораторном исследовании мокроты не установлено бактериовыделения. Всем пациентам выполнялась диагностическая видеоторакоскопия с резекцией участков легочной ткани с очагами поражений. Образцы легочной ткани (n=345) исследовали комплексом лабораторных методов (молекулярно-генетические исследования, микроскопия мазков из очагов поражения по Цилю-Нильсену, посев на плотную и жидкую питательные среды). Биоптаты исследовали гистологически с окраской гематоксилин-эозином.

При проведении молекулярно-генетических исследований применяли тест GeneXpert MTB /Rif, который является автоматизированной технологией амплификации нуклеиновых кислот в режиме реального времени для быстрого и одновременного выявления туберкулеза и лекарственной устойчивости к рифампицину.

Для изучения сопряженности выявления ДНК МБТ в очагах поражения в легком с особенностями морфологических проявлений туберкулеза методом случайной выборки выделена группа пациентов (n=60) в возрасте от 19 до 62 лет (мужчин – 34, женщин – 26) с верифицированным гистологическим диагнозом туберкулеза легких при выполнении видеоторакоскопии. Вновь выявленных пациентов было 54, с рецидивом – 3, ранее проходивших лечение – 1, с неудачей лечения – 2 пациента.

Для статистической обработки полученных результатов исследования использовали пакет прикладных программ Statistica 10 согласно руководству О.Ю. Ребровой [4]. Сравнительный анализ проводили при помощи критерия χ^2 Пирсона. Отличия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

Сравнительная оценка результатов бактериологического и молекулярно-генетического исследований образцов легочной ткани, полученных при видеоторакоскопии показала, что использование молекулярно-генетического теста при исследовании резецированных участков легких явилось более информативным (в 1,5 раза) по сравнению с классическим культуральным исследованием тех же образцов. При исследовании легочной ткани с использованием молекулярно-генетического теста положительный результат с обнаружением ДНК МБТ в биоптатах легких получен у 109 (31,59%) (109/345) пациентов, из них у 60 (55,0%) (95% ДИ 45,7-64,3) была выявлена устойчивость МБТ к рифампицину.

Суммарно с учетом всех положительных результатов посева на двух питательных средах (плотная и жидкая в Bactec MGIT 960) того же тканевого материала биопсий легкого культура МБТ выделена у 73 (66,97%, 73/109) (95% ДИ – 58,1-75,8) пациентов (табл. 1).

Таблица 1. Сравнительная оценка эффективности выявления МБТ в резецированном материале легких различными методами (n=345)

| Результаты молекулярно-генетические теста | Микробиологические исследования | | | | | | микроскопия мазка | |
|---|---------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| | посев+ Bactec+ | только Bactec+ | только посев+ | посев – Bactec– | только посев– | только Bactec– | КУБ+ | КУБ– |
| | абс., %, 95% ДИ | абс., %, 95% ДИ | абс., %, 95% ДИ | абс., %, 95% ДИ | абс., %, 95% ДИ | абс., %, 95% ДИ | абс., %, 95% ДИ | абс., %, 95% ДИ |
| 1. ДНК МБТ обнаружены (n=109) | 42, 38,53 (29,4-47,7) | 10, 9,17 (3,8-14,6) | 21, 19,27 (11,9-26,7) | 19, 17,43 (10,3-24,6) | 13, 11,93 (5,8-18,0) | 4, 3,67 (0,1-7,2) | 42, 38,53 (29,4-47,7) | 67, 61,47 (52,3-70,6) |
| 2. ДНК МБТ не обнаружены (n=236) | 4, 1,69 (0,0-3,3) | 2, 0,85 (-0,3-2,0) | 4, 1,69 (0,0-3,3) | 173, 73,31 (67,7-78,9) | 43, 18,22 (13,3-23,1) | 10, 4,24 (1,7-6,8) | 5, 2,12 (0,3-4,0) | 231, 97,88 (96,0-99,7) |
| P_{1-2} | <0,001 | <0,01 | <0,001 | <0,001 | >0,05 | >0,05 | <0,001 | <0,001 |

Отрицательный результат теста GeneXpert MTB /Rif получен у 236 (68,41% 236/345) пациентов.

В случаях отрицательного результата теста Xpert MTB /Rif в легочной ткани при бактериологическом исследовании того же тканевого материала на 2-х питательных средах суммарно культура МБТ была выделена у 10 (4,24%, 10/236) (95% ДИ – 1,7-6,8) пациентов, из них у 4-х пациентов были

идентифицированы в дальнейшем нетуберкулезные микобактерии (НТМ) (*M.avium* – 2, *M.fortuitum* – 1, *M.kansasii* – 1), у 4-х – получен рост культуры МБТ только на плотной питательной среде и у 2-х пациентов – только в жидкой питательной среде. При выделении НТМ у одного пациента гистологически в легочной ткани выявлены изменения, характерные для микобактериального воспаления (очаги казеозного некроза, гранулематозное воспаление), у 3-х – хронический бронхит, бронхоэктазы, в том числе с нагноением.

Микроскопия мазка из биопсийного материала позволила выявить кислотоустойчивые микобактерии (КУБ) в 5 случаях (2,12%, ДИ 0,3-4,0) при отсутствии выявления в тех же образцах ДНК МБТ, что позволяло заподозрить наличие микобактериоза, вызываемого НТМ.

Микроскопия мазков как и гистологических срезов, окрашенных по Циль-Нильсену, с целью выявления в очагах воспаления КУБ, как известно, отличается крайне низкой чувствительностью и невозможностью дифференцировать МБТ и НТМ, но имеет практическое значение при дифференциальной диагностике с микобактериозом, при котором выявляется большое количество КУБ в очагах поражения в отличие от туберкулезного воспаления при отрицательных результате GeneXpert MTB /Rif. При положительном тесте GeneXpert MTB /Rif микроскопия мазков по Циль-Нильсену, приготовленных из диагностического материала, позволяла выявить КУБ у 38,53% (42/109), 95% ДИ 29,4-47,7) пациентов, по сравнению с 2,12% – в случае отрицательного теста GeneXpert MTB /Rif ($p < 0,001$).

Отрицательный результат GeneXpert MTB /Rif может быть обусловлен присутствием в образцах ингибиторов полимеразных ферментов и/или количеством МБТ в образце ниже пороговой чувствительности теста. Для повышения чувствительности ряд авторов рекомендует проводить тест параллельно на 2-х образцах, полученных из одного биоптата [5].

Исследование резекционных участков легочной ткани с помощью молекулярно-генетического теста показало достоверно большую разрешающую способность в диагностике туберкулеза по сравнению с культуральным методом посева резецированных участков легочной ткани ($\chi^2=4,894$, $p=0,027$). Гистологическое исследование биопсийного материала легких в комплексе с молекулярно-генетическим исследованием тех же тканевых образцов позволяло получить точные сведения о характере процесса, степени его активности и лекарственной устойчивости МБТ. В дальнейшем, выделение культуры при посеве биопсийного материала легких расширяло диагностические возможности, так как позволяло осуществить видовую идентификацию возбудителя, определение чувствительности МБТ к ПТЛС, а в случае выделения НТМ определить видовую принадлежность.

В группе пациентов с ранее неустановленным бактериовыделением при исследовании мокроты, в случаях выявления ДНК МБТ в биоптатах легких ($n=60$), при гистологическом исследовании этого же материала у всех

пациентов обнаружены морфологические признаки активного туберкулеза. При ретроспективном анализе в данной группе с подозрением на туберкулез было 28 пациентов, с диссеминированным процессом – 3, округлым образованием – 11, полостным образованием – 3 пациента. У 9 пациентов требовалось проведение дифференциального диагноза, в т.ч. у 7 – с хроническим неспецифическим воспалением, у 2 – с опухолью легкого.

Туберкулема с очагами отсева и морфологическими признаками активации процесса в капсуле выявлена у 21 (35,0%) пациента, в т.ч. с распадом – у 10 (47,6%), инфильтративный туберкулез легких – у 26 (43,33%), в т.ч. с распадом – у 8 (30,8%), диссеминированный туберкулез – 4 (6,67%), очаговый – у 4 (6,67%), в т.ч. с распадом – у 1, фиброзно-кавернозный – у 3 (5,0%), другие формы – у 2 (3,33%) пациентов. Распад в очагах туберкулезного воспаления выявлен у 19 (31,67%) пациентов (табл. 2).

Таблица 2. Гистологическая верификация различных форм туберкулеза легких и определение ДНК МБТ в резецированных участках легких у пациентов с ранее неустановленным бактериовыделением (n=60)

| Туберкулез | ДНК МБТ | | Форма туберкулеза легких | | | | | |
|------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|------------------------------|----------------------|
| | Rif устойчивый абс., % | Rif чувствительный абс., % | туберкулема абс., % | инфильтративная абс., % | диссеминированная абс., % | очаговая абс., % | фиброзно-кавернозная абс., % | другие формы абс., % |
| 60 | 27, 45,0 | 33, 55,0 | 21, 35,0 | 26, 43,33 | 4, 6,67 | 4, 6,67 | 3, 5,0 | 2, 3,33 |

Положительный результат теста GeneXpert MTB /Rif в легочной ткани являлся маркером активного туберкулезного воспаления, при этом у 45,0% (27/60) пациентов была выявлена лекарственная устойчивость к рифампицину, неустановленная ранее.

Морфологическая характеристика туберкулеза легких у пациентов с отсутствием бактериовыделения и с положительным тестом GeneXpert MTB /Rif в биоптатах легких представлена в табл. 3.

Таблица 3 Морфологическая характеристика туберкулеза легких при выявлении рифампицин-устойчивой/чувствительной ДНК МБТ в биопсийном материале легких у пациентов с отсутствием МБТ в мокроте (n=60)

| Морфологическая характеристика туберкулеза | Количество пациентов (n=60) | | | ДНК МБТ в легком | | | | | |
|--|-----------------------------|-------|------------|------------------|-------|-----------|--------------------|-------|-----------|
| | | | | Rif устойчивый | | | Rif чувствительный | | |
| | абс. | % | 95% ДИ | абс. | % | 95% ДИ | абс. | % | 95% ДИ |
| Туберкулема | 21 | 35,0 | 22,9-47,1 | 10 | 47,62 | 26,2-68,9 | 11 | 52,38 | 31,0-73,7 |
| в т.ч. с распадом | 10 | 47,61 | 134,9-60,2 | 7 | 70,00 | 41,6-98,4 | 3 | 30,00 | 1,6-58,4 |
| Инфильтративный | 26 | 43,33 | 30,8-55,9 | 12 | 46,15 | 26,9-65,3 | 14 | 53,85 | 34,6- |

| | | | | | | | | | |
|----------------------|---|------|-----------|---|--------|------------|---|-------|------------|
| | | | | | | | | | 73,0 |
| в т.ч. с распадом | 8 | 30,8 | 19,0-42,4 | 4 | 50,00 | 15,3-84,6 | 4 | 50,00 | 15,3-84,6 |
| Диссеминированный | 4 | 6,67 | 0,4-12,9 | 2 | 50,00 | 1,0-99,0 | 2 | 50,00 | 1,0-99,0 |
| Очаговый | 4 | 6,67 | 0,4-12,9 | 2 | 50,00 | 1,0-99,0 | 2 | 50,00 | 1,0-99,0 |
| в т.ч. с распадом | 1 | 25,0 | 14,5-36,6 | 1 | 100,00 | 100-100 | - | - | - |
| Фиброзно-кавернозный | 3 | 5,0 | -0,5-10,5 | 1 | 33,33 | -20,0-86,6 | 2 | 66,67 | 13,3-120,0 |
| Казеома плевры | 2 | 3,33 | -1,2-7,9 | 0 | 0,00 | 0-0 | 2 | 100,0 | 100 |

При ретроспективном анализе данных гистологического исследования легочной ткани у пациентов с положительным результатом молекулярного теста в биоптатах легочной ткани, полученных при видеоторакоскопии, морфологические предпосылки для бактериовыделения (наличие распада в туберкулезе и в зоне очагово-инфильтративного казеозного поражения, наличие полости с внутренним казеозно-некротическим слоем) выявлены у 23 (38,33%) пациентов. Достоверные различия в характере морфологических проявлений туберкулеза при лекарственной чувствительности/резистентности к рифампицину не выявлены.

Дополнительное использование молекулярно-генетического метода GeneXpert MTB /Rif на биопсийном материале при морфологической диагностике позволяет обнаружить ДНК МБТ и одновременно определить лекарственную чувствительность МБТ к рифампицину непосредственно в очагах воспаления. Молекулярный тест показал более высокую диагностическую значимость при исследовании резецированных участков ткани по сравнению с классическими культуральными методами исследования этих же образцов легочной ткани и позволял значительно сократить сроки получения результата лекарственной чувствительности / резистентности МБТ (до 2-х дней) в сравнении с культуральным посевом и ТЛЧ (1,5-2 месяца).

При проведении морфологической диагностики в случаях подозрения на туберкулез или дифференциальной диагностики туберкулеза, особенно без бактериовыделения, наряду с гистологическим исследованием в обязательном порядке должен быть проведен молекулярный тест GeneXpert MTB /Rif на образцах диагностического биопсийного материала для быстрого выявления наличия в биоптате ДНК МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину и/или молекулярно-генетический метод LPA для выявления более расширенного спектра лекарственной резистентности к ПТЛС 1-го и 2-го рядов, в дальнейшем для этих же образцов следует выполнить культуральное исследование с выделением культуры, ее видовой идентификацией и ТЛЧ

бактериологическим методом. В случаях с выделением НТМ определить вид и лекарственную чувствительность к антибактериальным препаратам.

Прямое тестирование лекарственной чувствительности МБТ непосредственно в биопсийных образцах в кратчайший срок позволяет получить данные о резистентности МБТ и назначить своевременно соответствующую схему химиотерапии, а в дальнейшем после выделения культуры МБТ из тканевого материала и определения лекарственной чувствительности бактериологическим или молекулярно-генетическими методами провести коррекцию схемы химиотерапии.

Заключение. Выявлена высокая степень совпадения положительного результата молекулярно-генетического теста GeneXpert MTB /Rif в биоптатах легочной ткани с морфологическими признаками активности туберкулезного процесса. У пациентов с туберкулезом легких с ранее неустановленным бактериовыделением выполнение видеоторакоскопии с комплексным молекулярно-генетическим и гистологическим исследованием биопсийного материала позволяло выявить при позитивном тесте GeneXpert MTB /Rif морфологические признаки активного туберкулезного процесса в 100% случаях, в том числе с распадом у 38,33% пациентов, и у 45,0% пациентов установить лекарственную устойчивость к рифампицину, ранее не диагностированную другими методами.

Список литературы

1. Алгоритм лабораторной диагностики и мониторинга лечения туберкулеза с лекарственной устойчивостью на основе применения современных быстрых молекулярных методов // ВОЗ. Европейское респираторное общество. – 2017. – 29с. с.http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0004/336118/ELI-TB-Laboratory-diag_algorithm-Rus.Pdf?ua=1

2. Яцкевич, Н.В. Алгоритм диагностики заболеваний органов дыхания с использованием малоинвазивных видеоассистированных операционных вмешательств / Н.В. Яцкевич, Л.К. Суркова, Д.С. Котович [и др.] // Проблемы диагностики и лечения рифампицин-устойчивого туберкулеза на современном этапе: материалы междунар. науч.-практ. конф. «Новые подходы к диагностике и лечению туберкулеза», г. Минск, 11-12 декабря 2017г. – С.102-104.

3. Белоусова, Н.В. Характеристика клинически значимых биологических свойств возбудителя туберкулеза, выделенных из резецированных участков легких больных туберкулезом: автореф. дис.... канд. биол. наук, – Екатеринбург, 2013. – 24с.

4. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ. Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Среда. 2002 – 312с.

5. Севастьянова, Э.В. Современные алгоритмы микробиологической диагностики туберкулеза / Э.В. Севастьянова, Л.Н. Черноусова // Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96. – №7. – С.11-17. Doi:10.21292/2075 –1230 –2018 –96-7-11-17.

Репозиторий БГМУ