

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПЦР В РЕАЛЬНОМ
ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА
И ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ
ТУБЕРКУЛЕЗА К РИФАМПИЦИНУ В БИОПТАТАХ
ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ**

*Суркова Л.К., Яцкевич Н.В., Залуцкая О.М., Шпаковская Н.С.,
Дюсьмикеева М.И.,*

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

В данной статье показана диагностическая значимость ПЦР в реальном времени для одновременной диагностики туберкулеза и определения устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину в биоптатах легочной ткани, сделан вывод, что при проведении морфологической диагностики в случаях подозрения на туберкулез или дифференциальной диагностики туберкулеза наряду с гистологическим исследованием в обязательном порядке должен быть проведен молекулярный тест Xpert MTB/RIF на образцах диагностического биопсийного материала для быстрого выявления наличия в биоптате ДНК МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, молекулярный тест Xpert MTB/RIF, биоптат ДНК МБТ, определение лекарственной чувствительности к рифампицину, множественно и широко лекарственно-устойчивый туберкулез.

**DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF PCR IN REAL TIME FOR ONE-
TIME DIAGNOSTICS OF TUBERCULOSIS AND DETERMINATION OF
SUSTAINABLE MYCOBACTERIA OF TUBERCULOSIS TO RIFAMPICIN
IN BIOPATA
PULMONARY TISSUE**

*Surkova L.K., Yatskevich N.V., Zalutskaya OM, Shpakovskaya N.S.,
Dusmikeeva M.I.*

*Republican Research and Practical Center for Pulmonology and Tuberculosis,
Belarus, Minsk*

This article shows the diagnostic significance of real-time PCR for the simultaneous diagnosis of tuberculosis and the determination of the resistance of mycobacterium tuberculosis to rifampicin in lung tissue biopsies, concluded that when morphological diagnosis was performed in cases of suspected tuberculosis or differential diagnosis of tuberculosis, along with a histological study must necessarily be carried out molecular test Xpert MTV / RIF on samples of diagnostic biopsy

material for rapid identification The presence of MBT in DNA biopsy samples and the determination of drug sensitivity to rifampicin.

Key words: *real-time PCR, Xpert MTB / RIF molecular test, MBT DNA biopapat, determination of drug susceptibility to rifampicin, multiply and widely drug-resistant tuberculosis.*

Выявление и определение чувствительности МБТ к противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТЛС) является главным в стратегии лечения множественно и широко лекарственно-устойчивого туберкулеза (МЛУ/ШЛУ-ТБ), так как позволяет назначить соответствующую схему химиотерапии. В то же время выявление и определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ) не всегда представляется возможным из-за ограниченности и олигобактериальности туберкулезного процесса.

Основные принципы и подходы, на которых базируется микробиологическая диагностика туберкулеза, включают обязательное проведение на одном образце диагностического материала комплекса методов: молекулярно-генетических исследований, позволяющих быстро выявить ДНК МБТ в диагностическом материале и одновременно провести тестирование лекарственной чувствительности (ТЛЧ) к ПТЛС, посевов на жидкую и плотную питательные среды для выделения культуры и видовой идентификации микобактерий.

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

Цель исследования: определить диагностическую точность молекулярно-генетического исследования для одновременного быстрого выявления ДНК МБТ и определения чувствительности к рифампицину параллельно с гистологическим исследованием биопсийного материала легких у различных категорий пациентов, в том числе без бактериовыделения, 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 в 2017-2018 гг., которым проводилась дифференциальная диагностика туберкулеза легких с другими нетуберкулезными заболеваниями, имеющими сходные клинко-рентгенологические проявления и при лабораторном исследовании мокроты (микроскопия, молекулярно-генетические и бактериологическое исследования) не установлено бактериовыделение. Всем пациентам выполнялась диагностическая видеоторакоскопия с резекцией участков легочной ткани с очагами поражений. Образцы легочной ткани (n=345) исследовали комплексом

лабораторных методов (молекулярно-генетических, микроскопия мазков из материала по Цилю-Нильсену, посев на плотную и жидкую питательные среды). Биоптаты исследовали гистологически с окраской гематоксилин-эозином.

При проведении молекулярно-генетического исследования применяли систему Gene Xpert (тест Xpert MTB/RIF), которая является автоматизированной технологией ПЦР в режиме реального времени для одновременного выявления ДНК МБТ и устойчивости к рифампицину.

Для изучения сопряженности выявления ДНК МБТ в очагах поражения в ткани легкого с особенностями морфологических проявлений туберкулеза методом случайной выборки выделена группа пациентов (n=34) в возрасте от 19 до 62 лет (мужчин – 23, женщин – 11) с верифицированным гистологически туберкулезом легких при выполнении видеоторакоскопии.

Для статистической обработки полученных результатов исследования использовали пакет прикладных программ Statistica 10. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Сравнительная оценка бактериологического и молекулярно-генетического исследований образцов легочной ткани, полученных при видеоторакоскопии, показала, что использование молекулярно-генетического теста Xpert MTB/RIF 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 молекулярного теста положительный результат в биоптатах легких получен у 109 (31,59%) (109/345) пациентов, из них у 60% (95% ДИ 45,7-64,3) была выявлена устойчивость МБТ к рифампицину. Суммарно с учетом всех положительных результатов посева на питательных средах того же тканевого материала легкого культура МБТ выделена у 73 (66,99%, 73/109) (95% ДИ – 58,1-75,8) ($\chi^2=4,894$, $p=0,027$).

Отрицательный результат молекулярного теста получен у 236 (68,4%, 236/345) пациентов. В случаях отрицательного результата теста Xpert MTB/RIF в легочной ткани при бактериологическом исследовании того же тканевого материала культура МБТ была выделена у 10 пациентов (4,23%, 10/236) (95% ДИ – 1,7-6,8) $p < 0,001$, из них у 4-х были идентифицированы в дальнейшем нетуберкулезные микобактерии (НТМ) (*M. avium* – 2, *M. fortuitum* – 1, *M. kansasii* – 1), в 6-х случаях выделена культура МБТ.

При положительном результате теста Xpert MTB/RIF микроскопия мазков по Цилю-Нильсену, приготовленных из диагностического тканевого материала, позволила выявить КУБ у 38,5% (42/109), 95% ДИ 29,0-47,6) пациентов по сравнению с 2,18%, $p < 0,001$ в случае отрицательного результата теста.

Исследование резецированных участков легочной ткани с помощью молекулярно-генетического теста показало достоверно большую разрешающую способность в диагностике туберкулеза по сравнению с культуральными

методами посева легочной ткани. Гистологическое исследование биопсийного материала легких в комплексе с молекулярно-генетическим исследованием тех же тканевых образцов позволяло получить более 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, провести определение чувствительности МБТ к более расширенному спектру ПТЛС, а в случае выделения НТМ определить видовую принадлежность.

В группе пациентов (n=34) с ранее не установленным бактериовыделением при исследовании мокроты, выявлена высокая степень совпадения положительного результата молекулярного теста Xpert MTB/Rif в биоптатах легочной ткани с наличием морфологических признаков активного туберкулеза.

Туберкулема с очагами отсева и морфологическими признаками активации процесса в капсуле выявлена у 13 (38,24%) пациентов, в т. ч. с распадом – у 4 (30,71%), инфильтративный туберкулез легких – у 15 (44,12%), в т. ч. с распадом – у 6 (40,0%), очаговый – у 4 (11,76%) пациентов, фиброзно-кавернозный – у 1 (2,94%), кавернозный – у 1 (2,94%) пациента. Распад в очагах туберкулезного воспаления выявлен у 12 (35,29%) пациентов, у 13 (38,24%) пациентов было выявлена лекарственная устойчивость к рифампицину не установленная ранее.

Дополнительное использование молекулярно-генетического теста Xpert MTB/RIF на биопсийном материале легких при морфологической верификации туберкулеза позволяет обнаружить ДНК МБТ и одновременно определить лекарственную чувствительность МБТ к рифампицину непосредственно в очагах воспаления.

При проведении морфологической диагностики в случаях подозрения на туберкулез или дифференциальной диагностики туберкулеза наряду с гистологическим исследованием в обязательном порядке должен быть проведен молекулярный тест Xpert MTB/RIF на образцах диагностического биопсийного материала для быстрого выявления наличия в биоптате ДНК МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину.