

Адамбекова А.Д., Адамбеков Д.А.

**Хpert MTB/RIF- БЫСТРЫЙ, АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ ТЕСТ
АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
В ФТИЗИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ**

A.D. Adambekova, D.A. Adambekov

**Xpert MTB/RIF - RAPID, AUTOMATED ASSAY
OF NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND ITS APPLICATION
OF THE IN TB PRACTICE**

УДК: 616.24-002.5-072.7

Данная обзорная статья представляет общие сведения о тесте Xpert MTB/RIF для диагностики туберкулеза и устойчивости к рифампицину. Xpert MTB/RIF является быстрым, автоматизированным тестом, который может обнаружить туберкулез и устойчивость к рифампицину в течение двух часов. Точное и быстрое выявление туберкулеза и лекарственной устойчивости имеют решающее значение для улучшения выявления пациентов и снижения распространения ТБ.

Ключевые слова: туберкулез, ПЦР, тест Xpert MTB/RIF.

This article has presented an overview of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance. Xpert MTB/RIF is a rapid, automated test that can detect tuberculosis and rifampicin resistance for two hours. Accurate and rapid detection of tuberculosis and multidrug resistance are crucial to improve the detection of patients and reduce the spread of TB.

Key words: tuberculosis, PCR, Xpert MTB/RIF assay.

Введение

Туберкулез (ТБ) является одной из наиболее важных инфекционных причин заболеваемости и смертности среди взрослых. Хотя ТБ и является заболеванием, которое можно эффективно лечить, тем не менее в 2010 году, 8,8 млн. людей заболели активной формой ТБ. Из общего числа новых случаев заболевания туберкулезом, около 13% выявлено у людей, живущих с ВИЧ-инфекцией. Среди людей не инфицированных ВИЧ-инфекцией, 1,1 миллиона человек (14%) и среди ВИЧ позитивных, 350000 человек (31%) умерли от туберкулеза [1].

ТБ с лекарственной устойчивостью, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), который определяется как устойчивость по крайней мере к изониазиду и рифампицину, (двум наиболее важным противотуберкулезным препаратам первой ряда) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ ТБ) (МЛУ-ТБ, а также устойчивость к любым фторхинолонам (например, офлоксацину или моксифлоксацину) и, по крайней мере одному из трех инъекционных препаратов второго ряда (амикацину, капреомицину или каннамицину)) представляет серьезную угрозу для глобального здравоохранения [2].

В 2010 году, по оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) насчитывалось 650000 случаев МЛУ-ТБ. Согласно последним данным ВОЗ, самые высокие показатели в мире МЛУ-ТБ (более, чем 65% у ранее леченных больных) зарегистрированы в нескольких странах бывшего СССР [3].

Во всем мире, значительная часть (~ 35%) больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом, и ошеломляющий процент (~ 85%) больных с МЛУ-ТБ остаются не диагностированными. У больных с диагнозом ТБ, менее чем в 3% проведено культуральное исследование с постановкой ТЛЧ к противотуберкулезным препаратам (ППП) [4]. В дополнение к лекарственной устойчивости, другой важной задачей является выявление ТБ у ВИЧ-инфицированных больных с отрицательным мазком мокроты [5].

Применение теста Xpert MTB/RIF для диагностики ТБ

Точное и быстрое выявление туберкулеза, в том числе с отрицательным мазком и лекарственно-устойчивого ТБ, имеет решающее значение для улучшения результатов лечения пациентов (увеличение доли вылеченных, снижение смертности, развитие вторичной лекарственной устойчивости, снижение неудач лечения и рецидивов) и уменьшения передачи ТБ.

Культуральное исследование, как правило, считается референс стандартом для диагностики туберкулеза и является первым шагом в выявлении устойчивых форм ТБ. Однако, это относительно сложная и медленная по времени получения результатов, методика. Культуральное исследование на плотных средах обычно занимает от 4-х до 8 недель для получения результата и при проведении посевов на жидких средах, результаты получают от 7 до 42 дней. Однако, при первичной изоляции на жидких средах выше уровень контаминации [6]. Кроме того, культуральные исследования должны проводиться в более специализированных лабораториях и высококвалифицированными сотрудниками. В 2010 году ВОЗ одобрила новый, быстрый, автоматизированный тест амплификации нуклеиновых кислот (ТАНК), Xpert MTB/RIF, (Cepheid, Sunnyvale, США), который может одновременно выявлять туберкулез и устойчивость к рифампицину. ВОЗ

рекомендует использование Xpert MTB/RIF в качестве начального диагностического теста для лиц, с подозрением на МЛУ-ТБ или ВИЧ-ассоциированного туберкулеза. Если по результатам Xpert MTB/RIF выявлен ТБ с устойчивостью к рифампицину, то таким пациентам должно быть начато лечение от лекарственно-устойчивого ТБ, в то время как дополнительные образцы мокроты должны быть отправлены на культуральное подтверждение и должен быть проведен ТЛЧ к ПТП 1-го и 2-го [7].

Рифампицин-устойчивость как маркер МЛУ ТБ

Рифампицин действует путем ингибирования бактериальной ДНК-зависимой РНК-полимеразы, кодируемого геном РНК-полимеразы (*rpoB*) [8]. Развитие устойчивости к рифампицину связано с мутациями в ограниченной области гена *rpoB* [9]. Устойчивость к рифампицину может развиваться как монорезистентность или в сочетании с устойчивостью к изониазиду и другим ПТП. В странах с высоким уровнем МЛУ-ТБ, наличие устойчивости к рифампицину само по себе может служить маркером для МЛУ-ТБ [10].

Использование анализа Xpert MTB/RIF для быстрой диагностики ТБ и определения устойчивости к рифампицину

Анализ Xpert MTB/RIF основан на автоматизированной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (молекулярный тест) с использованием Gene Xpert® платформы [11;12;13]. Xpert MTB/RIF является одним тестом, позволяющим обнаружить комплекс микобактерий туберкулеза и устойчивость к рифампицину в течение двух часов после запуска теста. В отличие от обычных ТАНК, Xpert MTB/RIF является уникальным, поскольку обработка образцов, ПЦР-амплификация и детекция объединены в одно замкнутое модульное тестирование - картридж GeneXpert. Все этапы ПЦР анализа полностью автоматизированы и происходят в замкнутом пространстве картриджа. Кроме того, реагент, который используется для разжижения мокроты, обладает мощным туберкулоцидными свойствами и поэтому в значительной степени устраняет проблемы биологической безопасности при тестировании [14]. Эти особенности позволяют использовать данный тест на так называемом «пациент-приближенном» уровне здравоохранения [15]. Xpert MTB/RIF требует непрерывного и стабильного электроснабжения, определённого температурного режима хранения и работы аппарата и ежегодной калибровки модулей [10].

Тестирование проводится на нативных образцах мокроты, на концентрированной, гомогенизированной и деконтаминированной мокроте [11]. В обоих случаях, тестовый материал смешивается с реагентом из набора, перемешивается вручную или на вортексе, и инкубируется при комнатной температуре в течение 15 минут. После инкубации, 2 мл обработанного образца переносятся в картридж,

после чего он устанавливается в модуль аппарата [13].

Ограничения теста Xpert MTB/RIF по обнаружению наименьшего количества колониеобразующих единиц составляет 5 копий геномов ДНК на одну реакцию или 131 колониеобразующих единиц на 1 мл обработанной мокроты [13]. Для сравнения, чтобы увидеть бациллы туберкулеза с помощью микроскопического исследования требуется, по крайней мере 10000 бактерий на 1 мл мокроты [16]. Xpert MTB/RIF обнаруживает как живые, так и мертвые бактерии [17].

Xpert MTB/RIF использует технологию «молекулярного маяка» для обнаружения рифампицин устойчивости. Молекулярные маяки являются нуклеиновыми кислотами, снабженными зондами, которые распознают и сообщают о наличии или отсутствии нормального, рифампицин-чувствительного, «дикого типа» в последовательности генов *rpoB*. Используются пять различных цветных маяков, каждый из которых охватывает отдельную последовательность нуклеиновой кислоты в пределах амплифицированного *rpoB* гена. Когда маяк связывается с соответствующей последовательностью нуклеиновых кислот, он флуоресцирует или «загорается», что является индикатором присутствия одного из последовательностей генов, что является характерным для рифампицин-чувствительного ТБ. Отсутствие связывания маяка или задержка связывания к соответствующей последовательности указывает на возможные мутации, ведущие к развитию устойчивости к рифампицину [6].

Однако, применение теста Xpert не устраняет необходимости в последующих культуральных исследованиях, которые необходимы для контроля проводимого лечения и ТЛЧ, для выявления устойчивости к лекарственным препаратам, кроме рифампицина.

Микроскопия мазка мокроты по Цилю-Нильсену, как метод выявления ТБ

Микроскопия мазка мокроты по Цилю-Нильсену, прямое обследование мазков мокроты на кислотоустойчивые микобактерии (КУМ), является наиболее часто используемым тестом для выявления туберкулеза в условиях ограниченных ресурсов [18]. Преимуществами микроскопии мазка мокроты являются простота, низкая стоимость, скорость получения результатов и высокая специфичность в странах с высокой распространенностью ТБ. Кроме того, при микроскопии мазка мокроты выявляются большинство инфекционных форм туберкулеза, опасных для окружающих. Микроскопия мазка мокроты может выполняться в лаборатории на уровне первичного звена здравоохранения. Недостатками микроскопии являются потребность в специализированном обучении и относительно низкая чувствительность, от 50% до 60% в среднем. Хотя, чувствительность микроскопии может быть улучшена примерно на 10% при флуоресцентной микроскопии [19].

Микроскопия мазка мокроты мало способствует диагностике педиатрического туберкулеза и не выявляет, по определению, ТБ с отрицательным мазком, которые могут составлять от 24% до 61% среди всех случаев легочного туберкулеза у людей, живущих с ВИЧ [20; 21; 22]. Микроскопия не может выявлять лекарственно-чувствительный ТБ и лекарственно-устойчивый ТБ.

Тесты амплификации нуклеиновых кислот (ТАНК)

Тесты амплификации нуклеиновых кислот (ТАНК) являются молекулярными методами, которые могут обнаружить небольшое количество генного материала (ДНК или РНК) от микроорганизмов, таких, как туберкулез. Разнообразные молекулярные амплификационные методы доступны, в их числе ПЦР, является наиболее используемым для обнаружения туберкулеза в странах с высоким доходом.

В развивающихся же странах часто используются методы ПЦР, разработанные в этих же странах, стоимость которых значительно дешевле коммерческих наборов, но полученные результаты, зачастую не состоятельные.

Использование ТАНК недавно было рекомендовано в качестве стандартной практики в США. Основным преимуществом ТАНК является то, что они могут предоставить результаты на несколько недель раньше, чем культуральные исследования [23]. Недостатками являются то, что эти тесты дорогие и сложные для рутинного использования программами борьбы с туберкулезом в странах с ограниченными ресурсами. Кроме того, хотя специфичность ТАНК высока, некоторые тест-системы показали низкую чувствительность, особенно в материале с отрицательным результатом мазка мокроты [24; 25; 26].

Тест-система GenoType® MTBDRplus: преимущества и недостатки

Тест-система GenoType® MTBDRplus (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Германия) используется для детекции ТБ и определения мутаций в генах как *rpoB*, *katG* и *inhA*, ведущих к развитию резистентности к рифампицину и изониазиду [27]. Преимущество данной тест-системы заключается в том, что они могут дать результат для выявления туберкулеза и лекарственной устойчивости от 1 до 2 дней. Анализы обладают высокой чувствительностью (более 97%) и высокой специфичностью (более 99%), для определения устойчивости к рифампицину и, или изониазиду (чувствительность более чем на 90%); специфичность (более 99%) [28]. Недостатками являются то, что данные анализы являются дорогостоящими и должны быть использованы в референс-лабораториях [29]. Эти тесты были одобрены ВОЗ [30].

Заключение

На данном этапе, метод выявления ТБ с помощью теста XpertMTB/RIF, имеет очевидные преимущества как для пациентов (быстрая диагностика заболевания и возможность начать раннее и соответ-

ствующее лечение) и для системы здравоохранения (возможность прервать трансмиссию ТБ в обществе).

Высокая чувствительность для мокроты с положительным результатом мазка мокроты и более низкая чувствительность для образцов с отрицательным мазком, наряду с высокой специфичностью означает, что Xpert MTB/RIF может быть использован в качестве начального диагностического теста на туберкулез у лиц с подозрением на ТБ, МЛУ-ТБ, или ВИЧ-ассоциированного туберкулеза. Xpert MTB/RIF также может быть ценным дополнением у пациентов с отрицательным результатом микроскопии мазка.

Высокая чувствительность и высокая специфичность для Xpert MTB/RIF при обнаружении устойчивости к рифампицину означает, что данный метод может быть использован в качестве начального диагностического теста для определения устойчивости к рифампицину.

Литература:

1. WHO Global Report 2011. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. Geneva:
2. Zumla A, Abubakar I, Raviglione M, Hoelscher M, Ditiu L, McHugh TD, et al. Drug-resistant tuberculosis—current dilemmas, unanswered questions, challenges, and priority needs. *Journal of Infectious Diseases* 2012; 205(Suppl2): S228–40.
3. Zignol M, van Gemert W, Falzon D, Sismanidis C, Glaziou P, Floyd K, et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007–2010. *Bulletin of the World Health Organization* 2012;90(2): 111–119D.
4. Chaisson RE, Nuermberger EL. Confronting multidrug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine*. 2012; 366(23):2223–4.
5. Harries A. How does the diagnosis of tuberculosis in persons infected with HIV differ from diagnosis in persons not infected with HIV? In: Frieden T editor(s). *Toman's tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring - questions and answers*. WHO/HTM/TB/2004.334. Geneva: World Health Organization, 2004:80–3.
6. World Health Organization. Policy framework for implementing new tuberculosis diagnostics. Geneva: World Health Organization, 2011.
7. World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. WHO/HTM/TB/2011.4. Geneva: World Health Organization, 2011.
8. Hartmann G, Honikel KO, Knusel F, Nuesch J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1967;145(3):
9. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341 (8846):647–50. 843–4.
10. World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test. Technical and operational 'How-to'. Practical considerations.

- WHO/HTM/TB/2011.2. Geneva: World Health Organization, 2011.
12. Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens MR, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(7):2495–501.
 13. Cepheid. Brochure: Xpert®MTB/RIF. Two-hour detection of MTB and resistance to rifampicin. http://www.cepheid.com/media/files/eu/brochures/XpertMTB_Broch_R9_EU.pdf. Sunnyvale, Accessed 17 June 2012.
 14. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(1): 229–37.
 15. Banada PP, Sivasubramani SK, Blakemore R, Boehme C, Perkins MD, Fennelly K, et al. Containment of bioaerosol infection risk by the Xpert MTB/RIF assay and its applicability to point-of-care settings. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48(10):3551–7.
 16. Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis - time for a game change. *New England Journal of Medicine* 2011; 363(111): 1070–1.
 17. Toman K. How many bacilli are present in a sputum specimen found positive by smear microscopy? In: Frieden T editor(s). *Toman's tuberculosis: case detection, treatment, and monitoring - questions and answers*. WHO/HTM/TB/ 2004.334. Geneva: World Health Organization, 2004: 11–13.
 18. Miotto P, Bigoni S, Migliori GB, Matteelli A, Cirillo DM. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert® MTB/RIF. *European Respiratory Journal* 2012; 39(5):1269–71.
 19. Tuberculosis coalition for technical assistance. *International Standards for Tuberculosis Care (ISTC). Second Edition*. The Hague: Tuberculosis coalition for technical assistance, 2009.
 20. Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases* 2006; 6(9):570–81.
 21. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases* 2006; 6(10): 664–74.
 22. Getahun H, Harrington M, O'Brien R, Nunn P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet* 2007;369(9578):
 23. Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 196(Suppl 1):S15–27.
 24. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2009; 58(1):7–10.
 25. Flores LL, Pai M, Colford JM Jr, Riley LW. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiology* 2005; 5:55.
 26. Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006; 61(9):783–90.
 27. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One* 2008; 3(2):e1536.
 28. Boyle D, Pai M. UNITAID: Tuberculosis diagnostic technology landscape. Geneva: WHO, 2012.
 29. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal* 2008; 32(5):1165–74.
 30. Nahid P, Kim PS, Evans CA, Alland D, Barer M, Diefenbach J, et al. Clinical research and development of tuberculosis diagnostics: moving from silos to synergy. *Journal of Infectious Disease* 2012; 205(Suppl 2):S159–68.
 31. World Health Organization. *Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)*. Geneva: World Health Organization, 2008.

Рецензент: д.м.н. Китаев М.Н.