

Ким Т.М.

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОГО ТУБЕРКУЛЕЗА

Ким Т.М.

ДАРЫЛЫК ТУРУКТУУЛУК КУРГАК УЧУКТУ ДИАГНОСТИКАЛОО ЫКМАЛАРЫ

T.M. Kim

DIAGNOSIS OF DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

УДК: 617/5-616:216.3

С возникновением проблемы туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) во всем мире стала ощущаться потребность в быстром тестировании на лекарственную чувствительность (ТЛЧ). Корреляция между фенотипическим и генотипическим ТЛЧ остается проблематичной. При выборе методов следует учитывать аспекты их пригодности и стабильности, в том числе перспективы для полного охвата населения. Ни один из тестов не является совершенно точным. Для подтверждающего анализа и эпидемиологического мониторинга по-прежнему будет востребован традиционный, длительный по времени метод ТЛЧ.

Ключевые слова: туберкулез, множественная лекарственная устойчивость, микобактерия туберкулеза.

Кургак учук дарынын көп даарыларга туруктуу түрлөрүнүн пайда болушу менен бүткүл дүйнөдө даарынын пайдалуулугун тез арада аныктоо ыкмаларынын (ДПТА) зарылчылыгы сезилди. Микробтун фенотиптик жана генотиптик даарыга сезгичтигин аныктоо ыкмаларынын корреляциялык байланышын табуу абдан татаал. Тестирилөө жолдорун табуу учурунда алардын жагымдуу, стабилдүү жана перспективасын кароо зарыл, себеби ал ыкма бүткүл элге колдонулушу керек. Азырынча бир дагы ыкма тактыгы менен аныктай элек. Тастыктоо анализ үчүн жана эпидемиологиялык мониторинг өткөрүүгө мурункудай эле традициялык жана көп убакыт талап кылган ыкмалардын талабы зарыл.

Негизги сөздөр: кургак учук, дарылык туруктуулук, кургак учуктун микобактериясы.

With the emergence of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), the need for rapid drug susceptibility testing (DST) is felt globally. Correlation between phenotypic and genotypic DST remains problematic. For the choice of methods, appropriateness and sustainability should be considered in conjunction with the prospects for complete population coverage. No test is fully accurate. Conventional slow DST will still be needed for confirmation and for epidemiological monitoring.

Key words: tuberculosis, multidrug-resistant, mycobacterium tuberculosis.

Традиционный метод тестирования на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) микобактерии туберкулеза (МБТ) по-прежнему востребован для подтверждающего анализа и эпидемиологического мониторинга. Однако бактериологические методы выявления МБТ требуют длительного периода времени (до 3-х месяцев) и сведения о лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза становятся известны практически к моменту завершения

интенсивной фазы лечения. Таким образом, больным туберкулезом лёгких с самого начала назначается эмпирическое лечение без достоверной информации о наличии лекарственной устойчивости МБТ. С появлением туберкулеза с множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) нарастает актуальность проблемы внедрения в практику новых ускоренных методов тестирования на лекарственную чувствительность.

В настоящее время все методы определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) можно разделить на две группы: фенотипические (культуральные методы с использованием плотных и жидких питательных сред) и генотипические (молекулярно-генетические методы) [2].

При фенотипическом ТЛЧ определяется воздействие препаратов на интенсивность размножения или метаболизм бактерий.

Традиционные методы (ТЛЧ) *Mycobacterium tuberculosis*, включающие в себя такие, как метод пропорций и метод абсолютных концентраций, являются довольно трудоемкими и продолжительными. Для получения результата требуется как минимум, 6 недель с момента посева мокроты на твердую питательную среду Левенштейна-Йенсена.

Метод пропорций, используемый в микробиологических лабораториях большинства стран мира, был предложен Канетти в 1963г. и конкретизирован в 1985г. Миддлбруком. Он основан на сравнении количества выросших колоний на среде с препаратом и на среде без препарата с различными концентрациями бактериальной суспензии. Результаты теста учитывают на 28-й день (для устойчивых штаммов) и на 40-й день (для чувствительных штаммов) после посева. Культура микобактерий считается устойчивой, если на среде с противотуберкулезными препаратами (ППП) первого ряда вырастает более 1% КОЕ (колониеобразующих единиц) по сравнению с количеством КОЕ на контрольной питательной среде. Критерием устойчивости для препаратов второго ряда является 10% содержание устойчивых бактерий в исследуемой популяции [2].

Суть метода абсолютных концентраций заключается в определении концентрации ППП, ингибирующей рост культуры МБТ при выращивании их на плотных питательных средах. Устойчивость определяется с помощью минимальной ингибирующей концентрации препарата, которая подавляет рост всех

или почти всех микобактерий, что обычно определяется как наличие 20 или менее колоний возбудителя. В большинстве случаев этот метод применяется для непрямого определения ЛЧ и позволяет выявить устойчивость возбудителя туберкулеза как к основным, так и к резервным противотуберкулезным препаратам. Результат получают не ранее, чем через 2 - 3 месяца после посева материала [3,6].

В основе нитратредуктазной реакции (НРР) лежит способность *M. tuberculosis* редуцировать нитраты в нитриты, что проявляется в визуальном окрашивании раствора в красный цвет после добавления в него реактива Грисса, который ранее использовался для обычной биохимической идентификации *M. tuberculosis*. Предлагаемый метод является модификацией метода абсолютных концентраций, он позволяет сократить сроки получения результатов на среде Левенштейна-Йенсена до 8-12 суток.

Согласно данным мета-анализа, НРР продемонстрировала высокую чувствительность и специфичность при выявлении устойчивости к рифампицину и изониазиду путем использования клинических изолятов, и проведенные оценки детекции резистентности к препаратам первого ряда и офлоксацину показали хорошую согласованность результатов при сравнении со стандартным методом пропорций. Достоинство НРР в том, что она проста в выполнении, не требует дополнительного оборудования и дорогостоящих реактивов, доступна для любой микробиологической лаборатории; результаты легко интерпретировать по изменению цвета [10,6,15].

Сущность метода коэффициента резистентности заключается в определении минимальной ингибирующей концентрации противотуберкулезных препаратов для клинических штаммов микобактерий и соотношения минимальной ингибирующей концентрации тех же препаратов для заведомо чувствительного лабораторного штамма микобактерий. Это самый трудозатратный и дорогостоящий метод, так как требует использования большого количества пробирок с питательной средой, поэтому он применяется в основном для научных исследований [6].

Тесты, позволяющие получить количественную оценку метаболизма непосредственно из образца материала, действительно являются быстрыми, и выдача результатов происходит через 1-2 дня. Ускоренным может считаться метод ТЛЧ, если только он основан на размножении культуры возбудителя прямо в мокроте, без необходимости получения первичной культуры и при использовании более чувствительного способа обнаружения микобактериального роста, чем это возможно при визуализации невооруженным глазом [15].

В настоящее время для сокращения сроков выращивания МБТ и ускоренного определения лекарственной устойчивости (ЛУ) широко применяются методы с использованием жидких питательных сред и автоматизированных систем: ВАСТЕС 460 МТВ system (BectonDickinson), ВАСТЕС MGIT 960 (BectonDickinson), ВАСТЕС 9000 МВ (Becton

Dickinson), VersaTREK и другие. Указанные системы осуществляют постоянный компьютерный мониторинг роста бактериальной популяции в обогащенной жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 и сигнализируют о накоплении минимального количества микроорганизмов. Кроме сокращения времени диагностики, системы обладают высокой воспроизводимостью и, следовательно, внедрение их в лабораторную практику позволяет повысить качество диагностики. В настоящее время это единственный быстрый фенотипический метод эпиднадзора за лекарственной устойчивостью, рекомендуемый ВОЗ [2,5,6,17].

Ручной вариант системы MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) по-прежнему представляет интерес с точки зрения высокой результативности при анализе таких препаратов второго ряда, как канамицин (КМ) и офлоксацин [8,12].

ВАСТЕС 460 МТВ system – первая полуавтоматическая радиометрическая тест-система для выращивания и идентификации микобактерий на жидких средах. Она позволяет сократить сроки выявления возбудителя туберкулеза и получить результат ЛЧ МБТ через 18-30 дней (2-3 недели – выделение МБТ и следующие 4-7 дней - определение ЛЧ). К недостаткам системы ВАСТЕС 460 можно отнести – полуавтоматический мониторинг роста культуры, значительная трудоемкость операции, работа с радиоизотопами и необходимость утилизации радиоактивных отходов. [6]. В середине 90-х годов прошлого столетия была предложена более совершенная технология флюоресцентной регистрации роста микроорганизмов, которая легла в основу разработки автоматической системы ВАСТЕС MGIT 960, которая определяет ЛЧ МБТ ко всем препаратам первого ряда, в том числе и к пиразинамиду. Она содержит модифицированную среду Миддлбрук 7H9 с входящим в нее флюоресцентным индикатором роста, заключенным под силиконом на дне пробирки и погашенным высокой концентрацией кислорода, растворенного в среде. В процессе развития микробная популяция активно поглощает кислород, что приводит к высвобождению флюоресцентного компонента, который начинает светиться при ультрафиолетовом облучении. Ускоренный рост кислотоустойчивых бактерий обеспечивается дополнительным внесением жидкой обогатительной добавки (олеиновая кислота, альбумин, декстроза и каталаза). Для предотвращения контаминации добавляется смесь пяти антибиотиков, которые вносятся в индикаторную пробирку перед посевом. Штамм считается резистентным, если определяется рост и в контрольной пробирке, и в пробирке, содержащей ПТП. Детекция занимает от 3 до 14 дней, вместе с тестом на ЛЧ от 24 до 30 дней. К недостаткам автоматизированной системы MGIT можно отнести ее высокую чувствительность, повышенную вероятность как контаминации, так и выделения нетуберкулезных микобактерий. Положительные пробы, обнаруженные системой ВАСТЕС MGIT 960, должны подтверждаться микроскопией мазка мокроты на кислотоустойчивые микобактерии,

и необходим экспресс-анализ видовой принадлежности комплекса МБТ [5,6,14].

Колориметрические методы определения чувствительности микобактерий туберкулеза основываются на использовании окислительно-восстановительного индикатора (редокс-индикатор), который вносятся в питательную среду после прорастания культуры *M. tuberculosis* в присутствии или в отсутствии ПТП. Потребление кислорода растущей культурой приводит к изменению окраски индикатора, которую можно легко интерпретировать визуально. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна числу живых бактериальных клеток и может быть оценена путем измерения оптической плотности на спектрофотометре. Эти реакции можно ставить на титрационных микропланшетах или в пробирках для культивирования в целях достижения минимальных ингибирующих концентраций противотуберкулезных препаратов через 8 дней после выделения микобактерий.

По данным многоцентрового исследования, проведенного на базе семи лабораторий в странах со средним и низким уровнем дохода на душу населения, основанные на редокс-индикаторе методы работали хорошо при суммарной точности теста в пределах 97% на выявление МЛУ-ТБ, а проведенный мета-анализ с охватом 22 исследований в разных странах мира подтвердил его высокую точность. Колориметрический метод с использованием редокс-индикатора не требует особого оснащения и может быть рекомендован для стран с низким уровнем дохода, так как на получение готовых результатов уходит столько же времени, как и при работе системы MGIT [11,15].

Методы, основанные на использовании микобактериофагов в настоящее время не нашли широкого применения в клинко-диагностических лабораториях, из-за потребности в генно-инженерных бактериофагах и формата детекции (наличие фотографической пленки или люминометра). Данная методика больше подходит для использования в научно-исследовательских лабораториях, которые обладают нужным потенциалом и техническими знаниями для проведения таких анализов. Не так давно появились методики, где флюоромикобактериофаги используются для доставки флюоресцирующего ген-маркера внутрь МБТ, который затем выявляют с помощью люминесцентной микроскопии или проточной цитометрии. Результаты доклинической оценки показали, что одновременное добавление рифампицина, стрептомицина и бактериофагов позволяет провести ТЛЧ менее чем за 24 часа. Подавление свечения происходит только в чувствительных штаммах, тогда как этого не происходит в присутствии резистентных штаммов [13,15].

Таким образом, применение бактериологических методов для определения ЛЧ МБТ имеет основной недостаток – длительность проведения анализа. Применение автоматизированных аппаратов с жидкими средами позволяет сократить время определения ЛУ МБТ, однако себестоимость анализа

достаточно высока, также необходимо подтверждение специфичности роста МБТ, полученного на жидкой среде.

Развитие ЛУ главным образом связано с возникновением мутаций в генах-мишенях действия антибиотиков и в настоящее время возросла роль генотипических методов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза. Задачи определения ЛЧ или ЛУ МБТ сводятся к выявлению специфических полиморфизмов (мутаций в определенных нуклеотидных последовательностях известных генов), найденных у резистентных микобактерий и отсутствующих у чувствительных штаммов МБТ.

Основные методы основаны либо на прямом прочтывании (секвенировании) этих последовательностей после амплификации, либо на гибридизации биотин-меченых фрагментов ДНК, амплифицированных в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с ДНК-зондами.

Методы, основанные на секвенировании – расшифровке последовательности нуклеотидов, составляющих ДНК, позволяют не только точно локализовать мутацию в исследуемой последовательности нуклеотидов, но и определить ее тип. Некоторые приборы для полногеномного секвенирования, могут за 1 рабочий день расшифровать весь геном организма. Однако расходные реагенты для такого анализа слишком дороги [4].

Применению ПЦР для *M. tuberculosis* посвящены многочисленные публикации, где показана строгая специфичность этого метода исследования. В основе метода лежит многократное копирование с помощью фермента ДНК-полимеразы, определенного фрагмента ДНК, который является маркерным для исследования. Расшифровка специфических участков ДНК позволяет установить определенные точки мутаций, которые приводят к изменениям структуры рецептора лекарственного агента и потере ЛЧ МБТ. Основное достоинство ПЦР в реальном времени – это однопроворочная тест-система, благодаря которой исключена вероятность перекрестной контаминации от амплифицированной ДНК. К другим преимуществам данной технологии относятся: значительное снижение времени проведения анализа, удешевление анализа, высокая чувствительность. На сегодняшний день метод ПЦР с детекцией в режиме реального времени является самым быстрым методом. Время определения – 3 часа (включая выделение ДНК) [4].

Были разработаны несколько методов ДНК-микрочипов (ДНК-биочипов) для определения устойчивости к ПТП. В основе этой технологии лежит принцип связывания амплифицированной флюоресцентно-меченой ДНК-мишени с большим набором олигонуклеотидных зондов. Флюоресценция зависит от степени гомологии между зондом и ДНК-пробы [4,1].

Результаты определения ЛЧ МБТ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, полученные при помощи метода биочипов, обладают высокой степенью корреляции с результатами определения ЛЧ к

ПТП традиционным методом и показывают высокий процент совпадения результатов ЛЧ МБТ, полученных при тестировании мутаций методом биочипов и секвенирования [7].

Line probe assay (Lipa) - метод, основанный на принципе твердофазной множественной обратной гибридизации. Данная технология представлена германской фирмой Hain Lifescience (Hain-тесты), выпускающая тесты на определение мутаций, ответственных за возникновение устойчивости к рифампицину и изониазиду (GenoType®MTBDRplus), а также этамбутолу, фторхинолонам и аминогликозидам (GenoType®MTBDRsl).

Система GeneXpert позволяет проводить анализ на наличие МБТ и ее резистентности к рифампицину при помощи теста Xpert MTB/RIF (Cepheid, США). GeneXpert включает автоматизированную обработку образцов, амплификацию нуклеиновых кислот и определение интересующей последовательности в простых или сложных образцах с использованием методов ПЦР в реальном времени и ПЦР с обратной транскриптазой. Результаты обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза с одновременным определением лекарственной чувствительности к рифампицину могут быть получены в течение 2,5 часов.

Всемирная организация здравоохранения рекомендовала пользоваться молекулярными методами исследований в качестве стандарта оказания помощи во всем мире при диагностировании ТБ и МЛУ-ТБ. В поддержку этих усилий выделяются финансовые средства, и соответствующие программы обеспечивают быстрое внедрение молекулярных методов тестирования для постановки диагноза ТБ и МЛУ-ТБ [9,16].

Молекулярно-генетические методы определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза позволяют сократить временные сроки выполнения анализа до 2-3 суток, однако полностью отказаться от микробиологических методов определения ЛЧ пока невозможно, так как не для всех ПТП найдены генетические механизмы формирования ЛУ.

Литература:

1. Антонова О.В. и др., Биочипы на основе гидрогеля для анализа генома *Mycobacterium tuberculosis*: методы и применение в клинической практике. В кн.: Сб. трудов «Молекулярная диагностика-2007». – М., 2007. – Том. III. – С. 5-10.
2. Белоусова К.В. Характеристика клинически значимых биологических свойств возбудителя туберкулеза, выделенного из резецированных участков легких больных туберкулезом: дис. ...канд. биол. наук: 03.02.03. - Екатеринбург, 2013. - 148 с.
3. Вишневский Б.И. Фтизиатрия: национальное руководство. – М., 2007. -С. 149-166.
4. Владимирский, М.А. Аляпкина Ю.С. и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и

- контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008. - № 4. - С. 38-44.
5. Гольшевская, В.И. и др. Сравнение нитратредуктазного и автоматизированного ВАСТЕС MGIT 960 AST методов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза. - 2003. -№ 8. -С. 34-37.
 6. Ерохин В.В. и др. Микробиологические методы диагностики туберкулеза: Эпидемиология туберкулеза. Характеристика возбудителя туберкулеза. Лабораторные методы диагностики туберкулеза (теорет. уч. пос. для проведения курсов обучения). Тверь., 2008. -С 37-38.
 7. Низова, А.В. и др. Анализ результатов определения чувствительности к рифампицину клинических штаммов МБТ микробиологическими и молекулярно-биологическими методами. В кн.: Сб. трудов «Молекулярная диагностика-2007» М., 2007. – Том. III. - С. 39-40.
 8. Bastian I., Rigouts L., Palomino J. C., et al. Kanamycin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using *Mycobacterium Growth Indicator Tube* and colorimetric method // *J. Antimicrob Agents Chemother.* -2001. -45. -P. 1934–1936.
 9. Jonsson G., Furin J. Почему молекулярная диагностика лекарственно - устойчивого туберкулеза улучшает исходы ведения больных // *Туберкулез и легочные заболевания.* - 2013. - № 1. – т.3. -С. 79-81.
 10. Martin A., Panaiotov S., Portaels F. et al. The nitrate reductase assay for the rapid detection of multidrug resistant *M. tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis // *J Antimicrob Chemother.* -2008. -62. -P. 56–65.
 11. Martin A., Portaels F., Palomino J. C. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis // *J Antimicrob Chemother.* - 2007. -59. P. 175–183.
 12. Martin A., Von Groll A., Fissette K., et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to second-line drugs by use of the manual *Mycobacterium Growth Indicator Tube System* // *J Clin Microbiol.* -2008. -46. -P. 3952-3956.
 13. Piuri M., Jacobs W.R., Hatfull G.F. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS One.* -2009. -4. – P. 4870.
 14. Rusch-Gerdes S., Domehl C., Nardi G. et al. Multicenter evaluation of the *Mycobacteria Growth Indicator Tube* for testing susceptibility of *M.tuberculosis* to first-line drugs // *J. Clin. Microb.* – 1999. – Vol. 37. – P. 45-48.
 15. Van Deun A., Martin A., Palomino J. C. Диагностика лекарственно-устойчивого туберкулеза: достоверность и скорость выявления // *Международный журнал Туберкулез и легочные заболевания.* -2011. -том 2, № 1. -С. 20-32.
 16. WHO. Roadmap for rolling out Xpert MTB/RIF for rapid diagnosis of TB and MDR-TB. / Geneva, 2010. -12p.
 17. Yew W.W., Chan C.K., Chau C.H. et al. Outcomes of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treated with ofloxacin/levofloxacin-containing regimens // *Chest.* -2000. -N. 117. -P. 744-751.

Рецензент: к.м.н. Душимбекова К.А.