

ПРИМЕНЕНИЕ ХPERT МТВ/RIF ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

*М.А. Краснова, Е.Ю. Носова, К.Ю. Галкина, А.А. Хахалина, А.И. Исакова, Г.Е. Фрейман,
И.Р. Дорожкова, М.В. Синицын, С.Г. Сафонова*

ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

XPERT MTB/RIF ASSAY APPLICATION FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS OF TB IN HIV-PATIENTS

*M.A. Krasnova, E.Yu. Nosova, K.Yu. Galkina, A.A. Khakhalina, A.V. Isakova, G.E. Freyman,
I.R. Dorozhkova, M.V. Sinitzin, S.G. Safonova*

Для ускоренного выявления микобактерий туберкулеза (МБТ), а также определения лекарственной чувствительности к рифампицину у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ применяли тест-систему в формате картриджа Xpert MTB/Rif. Было исследовано 294 пробы диагностического материала (189 респираторных проб – мокрота, бронхиальный секрет, БАЛ и 105 проб внелегочной локализации – ликвор, кал, биоптат, лимфоузел и др.), полученные от 106 больных ВИЧ/ТБ, поступивших в Клинику № 2 МНПЦ борьбы с туберкулезом. Применение тест-системы Xpert MTB/Rif в лабораторной диагностике туберкулеза у больных ВИЧ/ТБ повышает частоту выявления возбудителя в респираторном на 21,7% и во внелегочном диагностическом материале на 14%. МБТ с множественной лекарственной устойчивостью в различном диагностическом материале больных ВИЧ/ТБ значительно чаще регистрировались по сравнению с монорезистентными и чувствительными штаммами к основным противотуберкулезным препаратам.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, туберкулез, лекарственная устойчивость, МЛУ, Xpert MTB/Rif

We used Xpert MTB/Rif assay for express detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and performed the drug susceptibility testing for rifampicin in patients with HIV/TB coinfection. We investigated 294 samples (189 respiratory samples such as sputum, bronchial secret, bronchial lavage and 105 extrapulmonary samples such as cerebrospinal liquid, faeces, tissue, lymph node etc.), obtained from 106 HIV/TB patients, admitted at the Clinic № 2 of The Moscow research and clinical center for TB control. Xpert MTB/Rif assay application for molecular diagnostics in HIV/TB-patients increased of detection frequency of MTB to 21,7% in respiratory samples and to 14% in extrapulmonary samples. Multidrug resistant MTB were detected most frequently then mono-resistant and susceptible to the main antituberculosis drugs. MTB strains in all types of samples obtained from HIV/TB patients.

Keywords: HIV-infection, tuberculosis, drug resistance, MDR, Xpert MTB/Rif.

Введение

Туберкулез в сочетании с ВИЧ-инфекцией остается важной проблемой здравоохранения в Российской Федерации и во всем мире. В отличие от большинства вторичных заболеваний, возникающих при выраженном иммунодефиците, туберкулез может развиваться на любой стадии ВИЧ-инфекции при любом количестве CD4⁺ лимфоцитов. Известно, что этиологическое подтверждение диагноза туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией довольно сложно и зависит от уровня

иммуносупрессии. Так, у больных 4Б, 4В и 5-й стадий ВИЧ-инфекции, когда наблюдается нарастание иммунодефицита, очень редко диагностируют формы туберкулеза с преобладанием продуктивных тканевых реакций, а бактериологическое подтверждение туберкулезной этиологии заболевания (при наличии мокроты) при этом можно получить только примерно в одной трети случаев. Таким пациентам, находящимся в тяжелом состоянии, необходима быстрая верификация диагноза вследствие высокого риска развития генерализованных

Таблица 1. Диагностический материал от больных ВИЧ-инфекцией с подозрением на туберкулез различной локализации, исследованный с помощью Xpert MTB/Rif

	Вид диагностического материала:						Всего	
	респираторный		внелегочный		респираторный и внелегочный			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Количество больных	42	39,6	23	21,7	41	38,7	106	100,0

форм туберкулеза. В настоящее время в лабораторной диагностике туберкулеза для ускоренного выявления микобактерий туберкулеза (МБТ), а также определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) широко применяют различные молекулярно-генетические методы (МГМ) [1, 5].

Использование тест-системы в формате картриджа Xpert MTB/Rif на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, проходящей в анализаторе GeneXpert (Cepheid, США), является принципиально новым полностью автоматизированным методом, который за 2,5 часа позволяет не только выявлять *M. tuberculosis* из диагностического материала, но и определять ее ЛЧ к рифампицину – «суррогатному» маркеру множественной лекарственной устойчивости. Данная технология позволяет исключить работу оператора с пробами на этапе выделения ДНК, что чрезвычайно важно при работе с инфицированным материалом от больных ВИЧ-инфекцией [3, 4].

Цель исследования

Оценить диагностическую ценность молекулярного теста Xpert MTB/Rif и сравнить данные выявления ДНК МБТ и определения ЛЧ к рифампицину из различного диагностического материала, полученного от больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез с результатами культурального определения ЛЧ на жидкой питательной среде в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960.

Материал и методы исследования

Исследовано 294 пробы диагностического материала: 189 респираторных проб (мокрота, бронхиальный секрет, жидкость БАЛ) и 105 проб внелегочного материала (ликвор, кал,

биоптаты лимфатических узлов и других тканей), полученных от 106 больных коинфекцией ВИЧ/туберкулез, поступивших в Клинику № 2 МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Бактериологическое и молекулярное исследование выполняли из одной порции осадка диагностического материала, поступавшего в Централизованную бактериологическую лабораторию МНПЦ борьбы с туберкулезом.

Выделение МБТ и определение ЛЧ к рифампицину в жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9* в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, США) проводили согласно протоколу изготовителя [2].

Выявление ДНК МБТ и определение мутаций, ответственных за устойчивость к рифампицину проводили с помощью тест-системы Xpert MTB/Rif согласно инструкции производителя.

Результаты исследования и обсуждение

Из 106 обследованных больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез у 42 (39,6%) был исследован только респираторный материал, у 41 (38,7%) – респираторный и различный материал внелегочной локализации и у 23 (21,7%) – только пробы внелегочного материала (табл. 1).

В мокроте и/или бронхиальных смывах, полученных от 83 пациентов (только респираторный материал – от 42 чел., и как респираторный, так и внелегочный – от 41), в 55,4% случаев (46 чел.) с помощью Xpert MTB/Rif была выявлена ДНК МБТ. При посеве в BACTEC™ MGIT™ 960 рост МБТ получен в 33,7% случаев (28 чел.), у четырех пациентов (4,8%) выделены нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) и у трех (3,7%) результат был недостоверным в связи с микробной контаминацией (табл. 2).

С помощью люминесцентной микроскопии кислотоустойчивые микобактерии были обнаружены в респираторном

Таблица 2. Результаты исследования респираторного диагностического материала больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез (n = 83)

Результат люминесцентной микроскопии	Результат исследования при помощи:						
	BACTEC™ MGIT™ 960				Xpert MTB/Rif		
	МБТ+	МБТ-	НТМБ	микробная контаминация	ДНК МБТ+	ДНК МБТ-	
Положительный (n = 20)	18	1	–	1	19	1	
Отрицательный (n = 63)	10	47	4	2	27	36	
Всего	абс.	28	48	4	3	46	37
	%	33,7	57,8	4,8	3,7	55,4	44,6

Таблица 3. Результаты определения лекарственной чувствительности к рифампицину МБТ, выделенных у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез (n = 28)

Заключение о наличии лекарственной устойчивости к рифампицину		Результат исследования при помощи:		Совпадение результатов (%)
		ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (абс.)	Хpert MTB/Rif (абс.)	
Устойчивость к рифампицину	нет	11	10	90,9
	есть	17	18	94,4

материале у 24,1% (20 из 83 чел.) больных, из которых у 19 (95,0%) была выявлена ДНК МБТ и у 18 (90,0%) был обнаружен рост МБТ на жидкой питательной среде в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (у одного пациента результат был недостоверным в связи с микробной контаминацией).

Из 63 больных с отрицательной микроскопией осадка респираторного материала у 27 (42,8%) была выявлена ДНК МБТ. На жидкой питательной среде в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 у 10 чел. (15,9%) получен рост МБТ, у четырех (6,3%) – НТМБ, а в двух случаях (3,2%) имела место контаминация посева.

При определении ЛЧ МБТ к рифампицину на основании молекулярно-генетического исследования респираторного материала у 58,7% больных (27 из 46 чел.) были выявлены соответствующие мутации ДНК МБТ, у 34,8% (16 из 46 чел.) таковые обнаружены не были, а у трех больных (6,5%) ЛЧ не удалось определить в связи с низкой концентрацией ДНК в пробе.

При посеве на жидкой питательной среде у 28 (33,7%) больных был выявлен рост МБТ и определена их ЛЧ – у 17 пациентов МБТ были устойчивыми и у 11 – чувствительными к этому препарату. Совпадение результатов молекулярного и культурального определения ЛЧ к рифампицину МБТ, выделенных из диагностического материала 28 больных, составило 92,9% (табл. 3).

При обследовании 41 больного с коинфекцией ВИЧ/туберкулез с подозрением на полиорганный локализацию последнего ДНК МБТ была выявлена и в респираторном, и во внелегочном диагностическом материале у 13 пациентов (31,7%), у 12 из которых (29,3%) был получен рост МБТ в системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960. Только в респираторном диагностическом материале ДНК МБТ была выявлена у 11 (26,8%) и у четырех (9,8%) – только во внелегочном. Рост МБТ в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 получен только в респираторном материале у пяти пациентов и у одного – только во внелегочном (табл. 4).

Вторым направлением работы явилось изучение возможности выделения МБТ из разных видов диагностического материала. В таблице 4 представлены результаты выявления МБТ в 105 пробах внелегочного материала, полученного от 64 больных ВИЧ/ТБ. ДНК МБТ была выявлена с помощью Хpert MTB/Rif в различном диагностическом внелегочном материале в 38,1% проб (40 из 105), а рост МБТ в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 получен в 23,8% проб (25 из 105), тогда как в восьми пробах выделены НТМБ, а в трех – результат был недостоверным в связи с микробной контаминацией (табл. 5).

Совпадение результатов молекулярного и бактериологического определения ЛЧ к рифампицину МБТ, выделенных в 25 пробах диагностического материала внелегочной локализации, составило 93,3%.

Полученные результаты показали преимущество тест-системы Хpert MTB/Rif перед исследованиями на жидкой среде *Middlebrook 7H9* в автоматизированной системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960 при выявлении МБТ в респираторном и внелегочном диагностическом материале у больных с сочетанием ВИЧ-инфекции и туберкулеза. Это может быть связано как с присутствием в диагностическом материале (гной из абсцесса, содержимое брюшной полости, мокрота, кал) неспецифической флоры, что приводит к микробной контаминации посева, так и с выделением в материале только НТМБ. Кроме того, имеют место технические трудности пробоподготовки внелегочного материала (особенно биоптатов) для посева на жидкую среду *Middlebrook 7H9* в автоматизированной системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960.

Выводы

1. Применение тест-системы Хpert MTB/Rif в лабораторной диагностике туберкулеза у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез повышает частоту выявления возбудителя на 21,7%

Таблица 4. Результаты исследования респираторного и внелегочного диагностического материала больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез (n = 41)

Диагностический материал		Результат исследования при помощи:			
		ВАСТЕС™ MGIT™ 960		Хpert MTB/Rif	
		МБТ+	МБТ-	ДНК МБТ+	ДНК МБТ-
Респираторный и внелегочный		12	14	13	13
Только респираторный		5	6	11	–
Только внелегочный		1	3	4	–
Всего	абс.	18	23	28	13
	%	43,9	56,1	68,3	31,7

Таблица 5. Выявление МБТ в диагностическом внелегочном материале, полученном у больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез (105 проб от 64 пациентов)

Вид материала	Число проб (абс.)	Результат исследования при помощи:						
		Xpert MTB/Rif		BACTEC™ MGIT™ 960				
		ДНК МБТ+	ДНК МБТ-	МБТ+	МБТ-	Микробная контаминация	НТМБ	
Ликвор	30	5	25	3	26	1	–	
Ткань лимфоузла	18	10	8	8	8	–	2	
Кал	16	4	12	3	9	2	2	
Биоптаты различных органов (кроме лимфоузлов)	8	4	4	2	5	–	1	
Содержимое брюшной полости	8	3	5	3	3	–	2	
Абсцесс	7	7	–	2	5	–	–	
Плевральная жидкость	6	2	4	1	5	–	–	
Прочий материал	12	5	7	3	8	–	1	
Всего	абс.	105	40	65	25	69	3	8
	%	100,0	38,1	61,9	23,8	65,7	2,9	7,6

в респираторном диагностическом материале и на 14% – во внелегочном, по сравнению с использованием только системы BACTEC™ MGIT™ 960.

2. У больных с коинфекцией ВИЧ/туберкулез и в респираторном, и во внелегочном диагностическом материале МБТ с МЛУ выявляли значительно чаще, чем монорезистентные и

чувствительные к основным противотуберкулезным препаратам штаммы.

3. Быстрое определение ЛЧ МБТ к рифампицину с помощью Xpert MTB/Rif позволяет провести своевременную коррекцию режимов химиотерапии туберкулеза и схем антиретровирусной терапии.

Литература

1. Фролова О.П., Кравченко А.В., Мартынов А.А. и др. Организация противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией: пособие для врачей. – М. – Тверь: ООО «Изд-во Триада», 2007. – 120 с.
2. Siddiqi S., Rusch-Gerdes S., Alexander H. et al. MGIT Procedure Manual for BACTEC™ MGIT™ 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) / Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects. – Foundation for Innovative New Diagnostics, 2007. [Электронный ресурс] URL: <http://www.ipaqt.org/wp-content/uploads/2013/02/MGIT-Procedure-Manual.pdf>. (Дата обращения 25.04.2015).
3. Steingart K.R., Schiller I., Horne D.J. et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults // Cochrane Database Syst. Rev. – 2014. – 1:CD009593. doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub3.
4. Van Rie A., Shipp L., Scott L. et al. Xpert® MTB/RIF for point-of care diagnosis of TB in high HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? // Expert Rev. Mol. Diagn. – 2010. – Vol. 10. – P. 937-946.
5. Walker N., Meintjes G., Wilkinson R. HIV-1 and the immune response to TB // Future Virol. – 2013. – Vol. 8. – P. 57-80.

Сведения об авторах

Краснова Мария Александровна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: dna77@mail.ru

Носова Елена Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: ma68@rambler.ru

Галкина Ксения Юрьевна – ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: crazytare@mail.ru

Хахалина Анастасия Александровна – научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: nastec@bk.ru

Исакова Александра Ивановна – врач клинической лабораторной диагностики Централизованной бактериологической лаборатории ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (499) 268-70-33

Фрейман Георгий Ефимович – заведующий Централизованной бактериологической лабораторией ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (499) 268-70-33

e-mail: g.freiman@mail.ru

Дорожкова Инна Рафаиловна – главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (499) 268-70-33, факс + 7 (499) 785-20-82

Синицын Михаил Валерьевич – заместитель главного врача по медицинской части (по работе с пациентами сочетанной туберкулез/ВИЧ инфекцией) ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Барболина, д. 3

Тел. + 7 (499) 268-27-46

e-mail: msinitsyn@mail.ru

Сафонова Светлана Григорьевна – заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (499) 268-08-76, факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: safonova.s.g@inbox.ru