

Ю.І. Феценко, академік НАМН України, д.м.н., професор, С.О. Черенько, д.м.н., професор, А.І. Барбова, к.м.н., О.А. Журило, д.м.н., ДУ «Національний інститут фізіотрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України», м. Київ

Сучасні методи діагностики туберкульозу

Методи боротьби з туберкульозом, як і з будь-яким інфекційним захворюванням, спрямовані на переривання шляхів передачі збудника і ліквідацію джерел інфекції завдяки виявленню епідеміологічно найнебезпечніших пацієнтів, що виділяють з мокротинням мікобактерії туберкульозу (МБТ), та їх безвідкладне лікування. Тому провідним методом діагностики туберкульозу є мікробіологічне дослідження для виділення збудника захворювання та виконання тесту медикаментозної чутливості до протитуберкульозних препаратів. Інші методи діагностики (клінічні, рентгенологічні, внутрішньошкірні тести та гамма-інтерферон тести, морфологічні методи) є допоміжними й неспецифічними і не дозволяють підтвердити діагноз туберкульозу. Хворий з підтвердженим випадком туберкульозу — це пацієнт, у якого виділені МБТ культуральним або молекулярно-генетичним методом.

В Україні і всьому світі протягом тривалого часу золотим стандартом діагностики туберкульозу був культуральний метод виділення МБТ на шільному середовищі Левенштейна-Йенсена (рис. 1, 2). Це високочутливий метод, який дозволяє виявляти МБТ за наявності в 1 мл досліджуваного матеріалу 100 мікроорганізмів. Недоліком методу є те, що ріст мікобактерій спостерігається лише через 4-10 тижнів (МБТ належить до мікроорганізмів, що повільно розмножуються й ростуть). У разі відсутності росту через 10 тижнів посів вважається негативним, і пробірки видаляють. За позитивного результату проводять тест медикаментозної чутливості, результат якого оцінюють ще через 6 тижнів. Отже, діагностувати резистентність МБТ до протитуберкульозних препаратів можна було в кращому випадку через 10 тижнів. Усе це перешкоджало призначенню правильного лікування, що, у свою чергу, призводило до поширення хіморезистентних форм туберкульозу.



Рис. 1. Ріст МБТ на шільному середовищі Левенштейна-Йенсена

На рідких живильних середовищах ріст МБТ спостерігають на 2-5-й день. До появи автоматизованих систем використання рідких середовищ було значно обмежено через складність їх приготування — до їх складу обов'язково входять свіжа цитратна гемолізована донорська кров або нативна бичача сироватка. Тому діагностичні дослідження і бактеріологічний моніторинг лікування проводили лише на шільному середовищі Левенштейна-Йенсена, що затримувало процес підтвердження діагнозу та отримання результатів тесту медикаментозної чутливості.

З огляду на значну тривалість терміну отримання результату культурального дослідження скринінговим методом виявлення туберкульозу в усьому світі стало дослідження мазка мокротиння методом мікроскопії за Цілем-Нільсеном. У 1884 р. бактеріологи Ф. Ціль і Ф. Нільсен винайшли спосіб фарбування МБТ, користавши їх природну властивість стійкості до дії кислот та спирту, зумовлену їх морфологічним складом. Цей метод і донині є основним для швидкого виявлення туберкульозу. Отже, за допомогою методу мікроскопії мазка виявляють

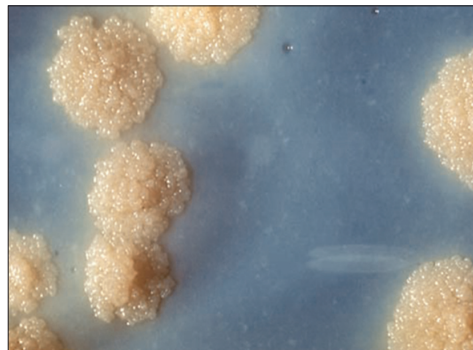


Рис. 2. Колонії МБТ на шільному середовищі Левенштейна-Йенсена

кислотостійкі бактерії (КСБ), переважна більшість із яких є МБТ (у виняткових випадках це можуть бути мікобактерії не туберкульозного комплексу). Мазок фарбують карбол-фуксином Ціля, під дією якого КСБ забарвлюються в яскраво-червоний колір (рис. 3), і досліджують під мікроскопом. Якщо в пофарбованому мазку міститься не менше 5 КСБ в одному полі зору, ймовірність висіву мікобактерій дуже висока. Щоб виявити КСБ методом мікроскопії, кількість МБТ в 1 мл досліджуваного матеріалу має становити від 5 до 10 тис. Перевагою цього методу є швидкість (2-3 год.) і невисока вартість. Жоден з існуючих сучасних методів діагностики не може поки що витіснити мікроскопію за показником «вартість-ефективність». Метод застосовують як для діагностики туберкульозу, так і для визначення ефективності лікування. Кількість КСБ в мазку (або колоній у пробірці при культуральному методі дослідження) у процесі антимікобактеріальної терапії є орієнтовним показником її ефективності або непрямим свідченням розвитку стійкості мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів.

Стрімке поширення мультирезистентного туберкульозу спонукало світову наукову спільноту до розробки прискорених методів мікробіологічної діагностики туберкульозу, заснованих на культуральних дослідженнях з використанням рідких середовищ, які докорінно змінили підходи до ведення пацієнтів з туберкульозом.

У 1998 році був повністю розшифрований геном *M. tuberculosis*. Розшифрування геному МБТ стало основою для розвитку й розробки молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу. Виділення специфічних для геному *M. tuberculosis* нуклеотидних послідовностей ДНК використовують при ПЛР-виявленні збудника в різних видах діагностичного матеріалу.

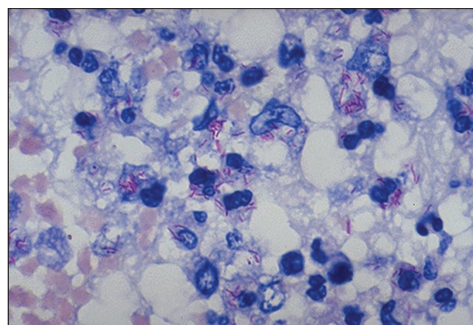


Рис. 3. Позитивний мазок мокротиння (фарбування за Цілем-Нільсеном). КСБ (3+)

У відповідь на поширення мультирезистентного туберкульозу в рамках Партнерства «Зупинити ТБ» (Stop TB Partnership) на початку 2000 років було створено Фондацію інноваційних методів діагностики — Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), неприбуткову організацію, яка підтримується Фондом Білла Гейтса, фундацією Рокфеллера та іншими приватними фондами. Ця організація очолила наукові розробки нових методів діагностики туберкульозу, залучаючи до цього процесу відомих світових виробників медичного діагностичного обладнання. Істотні грошові вливання в наукові розробки та у виробничий процес з боку FIND дозволили значно знизити вартість нових методів діагностики та зробити їх доступними для країн світу з високим рівнем захворюваності на туберкульоз.

Прискорені методи діагностики туберкульозу на рідких поживних середовищах в автоматизованих мікробіологічних системах

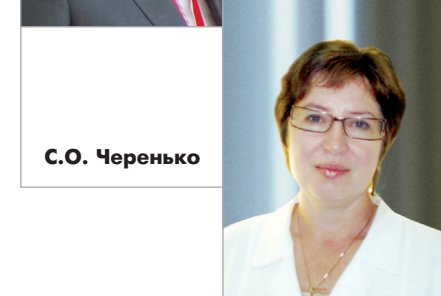
На початку 2000 років американська компанія Becton Dickinson, яка тісно співпрацює з FIND, розробила та випустила на ринок автоматизовану радіометричну мікробіологічну систему для культурального визначення МБТ на рідкому середовищі Мідлбрука — BACTEC-460, яка дозволяє діагностувати туберкульоз та мультирезистентний туберкульоз у більш короткі терміни. У цій системі ріст МБТ фіксувався автоматично за виділенням радіоактивного діоксиду вуглецю, міченого ізотопом ^{14}C , при рості мікобактерій у середовищі, що потребує 4-12 днів. Використання радіоактивних ізотопів в автоматизованій системі є одним з найбільш істотних недоліків і значно ускладнює широке застосування цього методу.

Тому на зміну радіометричній системі дуже швидко прийшла система BACTEC 960 MGIT, яка базувалася на новому діагностичному методі з використанням *Mycobacteria Growth Indicator Tube*. Основним компонентом системи є пробірка з модифікованим бульйоном Мідлбрука, який підтримує ріст мікобактерій. У силікон на дні пробірки введений флуоресцентний компонент, чутливий до присутності кисню, що розчинений у бульйоні. Концентрація розчиненого кисню гасить випромінювання цієї речовини, і виявляється лише незначна флуоресценція. Надалі активно дихаючі мікобактерії споживають кисень, що дозволяє спостерігати флуоресценцію речовини. Система BACTEC 960 MGIT розцінює пробірку як позитивну, якщо кількість живих мікроорганізмів у ній досягла 1000 клітин в 1 мл середовища. Прилад здійснює безперервний моніторинг пробірок. Автоматизована система BACTEC 960 MGIT являє собою якісний тест, що виконується протягом 4-42 днів. Прилад призначений тільки для виявлення мікобактерій і проведення тесту медикаментозної чутливості МБТ до протитуберкульозних препаратів I і II ряду (до 21-ї доби).

На сьогодні експерти з мікробіологічної діагностики туберкульозу визнали



Ю.І. Феценко



С.О. Черенько

цей метод «золотим стандартом» діагностики туберкульозу, зважаючи на його стандартизацію, яка мінімізує людський чинник при приготуванні живильного середовища. Дослідження за допомогою автоматизованої системи підвищує ймовірність підтвердження діагнозу туберкульозу у хворих з негативним мазком мокротиння на 20%.

Після визначення позитивного результату необхідно проводити ідентифікацію мікроорганізмів, оскільки фіксується лише їх ріст за споживанням кисню.

До недоліків методу належить необхідність ручної підготовки проб, що потребує суворого дотримання методики дослідження та вимог інфекційного контролю щодо біологічної безпеки під час проведення досліджень. Для безперервної роботи апарату необхідне безперебійне електропостачання.

В Україні дослідження мокротиння в рідкому середовищі за допомогою мікробіологічної системи BACTEC 960 MGIT є необхідними складовими діагностичного алгоритму на наявність туберкульозу згідно з Уніфікованим протоколом первинної, вторинної та третинної медичної допомоги «Туберкульоз». Дослідження доступне в усіх регіонах України. Зразки мокротиння з районів кожної області транспортують до лабораторії з мікробіологічної діагностики III рівня, яка зазвичай розташована в обласному протитуберкульозному диспансері.

Культуральні дослідження на наявність туберкульозу не можуть виконуватись у приватних лабораторіях через їх біологічну небезпеку, необхідність належності до мережі мікробіологічної діагностики туберкульозу з постійним зовнішнім контролем якості досліджень з боку Центральної референс-лабораторії МОЗ України, роботу якої, у свою чергу, контролює супранациональна лабораторія, функції якої визначає ВООЗ.

Молекулярно-генетичні методи діагностики туберкульозу

Скорочення термінів виявлення збудника, видової ідентифікації і визначення медикаментозної резистентності мікобактерій може бути досягнуто за рахунок застосування в лабораторній практиці молекулярно-генетичних методів. Їх використання в діагностиці туберкульозу дозволяє в найкоротші терміни встановити резистентність МБТ до протитуберкульозних препаратів при госпіталізації хворого у стаціонар, виявляти мікобактерій не туберкульозного комплексу, призначати правильне лікування із самого початку, що підвищує ефективність терапії, запобігає поширенню штамів мікобактерій, резистентних до лікарських засобів.

Основою молекулярно-генетичних методів діагностики туберкульозу є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), що набула значного поширення для виявлення різних інфекційних агентів, у тому числі мікобактерій. Тести ампліфікації нуклеїнових кислот дозволяють встановити дуже невелику кількість мікроорганізмів.

Метод дає змогу виявити збудника навіть за наявності лише десятків чи сотень мікроорганізмів у 1 мл досліджуваного матеріалу.

Принцип методу ПЛР полягає в ампліфікації — багаторазовому збільшенні ділянок специфічної послідовності ДНК мікобактерій у пробірковому мікрооб'ємі.

Багаторазове подвоєння специфічних фрагментів ДНК призводить до збільшення їх кількості в геометричній прогресії до рівня, який дозволяє здійснити детекцію існуючими методами. Результати ПЛР оцінюють за допомогою різних методів гібридизації продукту зі специфічними комплементарними міченими ДНК-зондами.

За умови оптимального вибору гена для ампліфікації чи гена нуклеотидної послідовності цей метод дозволяє з високою специфічністю ідентифікувати збудника. Тести ампліфікації швидкі й безпечні. Перевагами методу є його висока специфічність (98-100%), швидкість (результат за 2,5-3,5 год), висока чутливість у пацієнтів з позитивним мазком мокротиння (понад 95%), можливість проведення дослідження будь-яких біологічних матеріалів.

До недоліків методу належать складність інтерпретації результатів (потребує спеціальної підготовки), висока вартість, низька чутливість у хворих з негативним мазком мокротиння (60-70%). Проте саме складність інтерпретації результатів стала обмеженням до його широкого впровадження в клінічну практику.

Німецька компанія Hain Lifescience за підтримки FIND запропонувала новий, більш простий метод молекулярної діагностики туберкульозу і визначення мутацій у генах МБТ, що відповідальні за резистентність до протитуберкульозних препаратів, який ВООЗ нині рекомендує до впровадження у всьому світі, — GenoType MTBDRplus/GenoType MTBDRsl. Метод базується на ПЛР із використанням праймерів, що мічені біотином, для ампліфікації фрагмента генів, які пов'язані з медикаментозною резистентністю. Далі відбувається гібридизація біотин-мічених продуктів із ДНК-зондами, що іммобілізовані на мембранах, на яких розміщені ДНК-зонди дикої типу (без мутацій) і ДНК-зонди для детекції відомих мутацій. Наступний етап — візуалізація результатів гібридизації: ДНК *M. tuberculosis* і мутацій, що асоційовані з резистентністю (кольорові смужки на мембранах). Розшифрування мутацій і встановлення резистентності до протитуберкульозних препаратів здійснюються за допомогою комп'ютера.

Переваги цього методу полягають насамперед у простоті технічного виконання (може бути застосований у звичайних лабораторіях), швидкості (результат із зразка у разі позитивного мазка мокротиння або з культури отримують через 4-5 год), безпечності, високій специфічності (99%), високій чутливості при позитивному мазку мокротиння (до 98%), економічності (потрібна мінімальна кількість обладнання: центрифуга (13 000), вортекс, термостат, термоциклер, термошейкер, блот). До недоліків методу належать недостатня чутливість при негативних мазках мокротиння, висока вартість дослідження й необхідність трьох додаткових приміщень для проведення аналізу. Тому на сьогодні рекомендовано виконувати дослідження тільки у хворих із позитивним мазком мокротиння та з груп ризику щодо мультирезистентного туберкульозу незалежно від результатів бактеріоскопії.

Сьогодні згідно з рекомендаціями ВООЗ в Україні запропоновано два методи молекулярно-генетичної діагностики, які можуть бути використані для вирішення питання своєчасної діагностики туберкульозу, — тест-система гібридизації з типоспецифічними зондами GenoType

(технологія ДНК-стріпів), тест-система GeneXpertMTB/RIF.

Тест-система GeneXpertMTB/RIF (рис. 4) рекомендована ВООЗ за підтримки FIND до застосування в діагностиці туберкульозу лише з 2010 року. Тест-система GeneXpertMTB/RIF є напівкількісною гніздовою ПЛР у реальному часі в картриджі, і її проводять з метою виявлення ДНК МБТ у зразках мокротиння або концентрованих осадів мокротиння; мутацій резистентності до рифампіцину у зразках, отриманих від пацієнтів з ризиком розвитку резистентності до цього препарату (рис. 5).

GeneXpertMTB/RIF є тест-системою закритого типу; виділення та ампліфікацію виконують в одноразовому картриджі, попередня обробка діагностичного матеріалу зводиться до мінімальних маніпуляцій. Це дозволяє значно зменшити можливість контамінації матеріалу. За даними ВООЗ, резистентність до рифампіцину корелює з резистентністю до ізоніазиду. Резистентність до рифампіцину й ізоніазиду (мультирезистентність) зазвичай свідчить про необхідність одночасного проведення повного тестування на чутливість до препаратів I і II ряду, але це можливо тільки після виділення культури мікобактерій.

Результат обробляють на комп'ютері і роздруковують (позитивний/негативний, резистентність до рифампіцину є/немає). Перевагами методу є швидкість (увесь процес триває менше 2 год), висока специфічність (100%), висока чутливість для пацієнтів із позитивним мазком мокро-

тест-систему GenoType використовують тільки в лабораторіях з мікробіологічної діагностики туберкульозу III рівня, і вона призначена для діагностики туберкульозу з ідентифікацією мікобактерій і визначенням чутливості до рифампіцину, ізоніазиду, фторхінолонів, аміноглікозидів/циклічних пептидів та етамбутолу. Тест-система GenoType призначена для обстеження нижчезазначених груп пацієнтів із суворим дотриманням певної послідовності та пріоритетності.

• У якості первинного діагностичного тесту незалежно від результату бактеріоскопії на КСБ (позитивний і негативний мазок):

— ВІЛ-інфіковані пацієнти з підозрою на туберкульоз;

— пацієнти з підозрою на легеневий туберкульоз із ризиком наявності мультирезистентного туберкульозу (групи ризику відповідно до національного протоколу);

— особи, які контактують із хворими на мультирезистентний туберкульоз;

— пацієнти, які раніше отримували лікування з приводу туберкульозу і яким повторно встановлено діагноз легеневого туберкульозу (неефективна терапія, рецидив, відрив), хворі з рецидивом, після невдачі лікування чи відриву за відсутності в анамнезі даних про резистентність до рифампіцину й ізоніазиду;

— пацієнти, які народилися в країні з високим рівнем захворюваності; діти-підлітки (вікова група 0-17 років) з підозрою на туберкульоз.

• У якості додаткового діагностичного тесту після бактеріоскопії на КСБ (позитивний мазок):

— хворі на туберкульоз із негативною клініко-рентгенологічною динамікою та/або продовженням чи відновленням бактеріовиділення (з метою прискорення виявлення вторинної медикаментозної резистентності МБТ під час лікування);

— пацієнти із соціальних груп ризику, у яких виявлено легеневий туберкульоз за допомогою методу бактеріоскопії;

— хворі з уперше діагностованим туберкульозом методом бактеріоскопії.

Для дослідження використовують дослідний матеріал (позитивний зразок мокротиння, підтверджений бактеріоскопічно; культура мікобактерій, що виросла на рідкому та/або щільному живильному середовищі).

Тест-систему GeneXpertMTB/RIF застосовують в Україні в лабораторіях з мікробіологічної діагностики туберкульозу II-III рівнів для швидкого виявлення МБТ (без ідентифікації) та визначення стійкості до рифампіцину. Тест-система GeneXpertMTB/RIF призначена для обстеження нижчезазначених груп пацієнтів із суворим дотриманням такої послідовності та пріоритетності.

• У якості первинного діагностичного тесту незалежно від результату бактеріоскопії на КСБ (позитивний і негативний мазок):

— ВІЛ-інфіковані пацієнти з підозрою на туберкульоз;

— пацієнти з підозрою на легеневий туберкульоз з ризиком наявності мультирезистентного туберкульозу (групи ризику відповідно до національного протоколу), особи, які контактують з хворими на мультирезистентний туберкульоз;



Рис. 4. Тест-система GeneXpertMTB/RIF

— пацієнти, які раніше отримували лікування з приводу туберкульозу і яким повторно встановлено діагноз легеневого туберкульозу (неефективна терапія, рецидив, відрив), хворі з рецидивом, після невдачі лікування чи відриву за відсутності в анамнезі даних про стійкість до рифампіцину;

— пацієнти, які народилися в країні з високим рівнем захворюваності; діти-підлітки (вікова група 0-17 років) з підозрою на туберкульоз.

• У якості вторинного діагностичного тесту після бактеріоскопії на КСБ (позитивний мазок):

— хворі на туберкульоз з негативною клініко-рентгенологічною динамікою та/або продовженням чи відновленням бактеріовиділення (з метою прискорення виявлення вторинної медикаментозної резистентності МБТ під час лікування);

— пацієнти із соціальних груп ризику, у яких виявлено легеневий туберкульоз за допомогою методу бактеріоскопії;

— хворі з уперше діагностованим туберкульозом методом бактеріоскопії; пацієнти з підозрою на легеневий туберкульоз, у яких отримано негативний результат бактеріоскопії мазка мокротиння, але за наявності клінічних симптомів туберкульозу.

Для якісної діагностики й забезпечення достовірності результатів тест-системи GeneXpert MTB/RIF необхідно досліджувати правильно зібраний діагностичний матеріал. Пацієнт має збирати мокротиння обов'язково під наглядом медичного працівника. У разі відсутності мокротиння у дітей як досліджуваного матеріалу можна використовувати промивні води бронхів або змив з ротоглотки. Неприпустимими є домішки їжі чи крові у зразках, які будуть сприйматися системою як зіпсовані.

Упровадження в практику охорони здоров'я молекулярно-генетичних методів (GeneXpert MTB/RIF і тест-системи гібридизації з типоспецифічними зондами (технологія ДНК-стріпів) у поєднанні із сучасними фенотиповими методами дозволить покращити якість і своєчасність діагностики туберкульозу в Україні. Повне оснащення українських лабораторій цим обладнанням планується в рамках виконання Загальнодержавної цільової соціальної програми протидії захворюванню на туберкульоз на 2012-2016 роки. На сьогодні системами GeneXpert MTB/RIF оснащені лабораторії в половині областей України. Одночасне використання молекулярно-генетичного й культурального методів дослідження сприятиме швидкому встановленню діагнозу, правильній інтерпретації результатів для визначення клінічного значення виявлених мутацій, відповідальних за резистентність до протитуберкульозних препаратів, ізоляції пацієнта і своєчасному початку лікування, дозволить покращити клінічний результат і підвищити економічність терапії.

Дуже важливим є комбіноване застосування цих методів для правильної інтерпретації результатів з метою їх ефективного використання в клінічній практиці, що обмежує застосування молекулярно-генетичних методів у приватних лабораторіях.

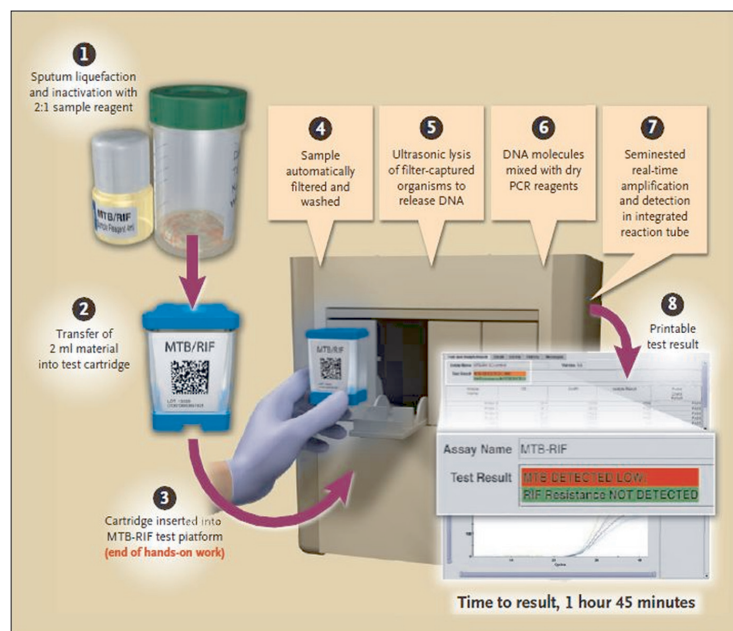


Рис. 5. Процес проведення дослідження в автоматизованій системі GeneXpertMTB/RIF

тиння (98%), простота (необхідний мінімальний рівень навичок), відсутність потреби в окремих приміщеннях для проведення ПЛР.

До недоліків методу належать можливість визначення стійкості збудника тільки до одного протитуберкульозного препарату — рифампіцину, що зумовлює необхідність подальших досліджень для діагностування мультирезистентності; можливість використання лише нативного мокротиння й концентрованих його зразків (тривають дослідження щодо застосування інших біологічних зразків); висока вартість досліджень.

З огляду на вищезазначені обмеження метод використовують як скринінговий для обстежень груп населення з високим ризиком мультирезистентного туберкульозу (раніше ліковані особи; ті, що контактували з хворими на мультирезистентний туберкульоз; ВІЛ-інфіковані) з метою ухвалення своєчасного рішення щодо ізоляції таких пацієнтів та призначення правильного лікування.

Завдяки ініціативам FIND та глобальному поширенню зазначеного методу у світі за останні два роки вартість одного дослідження знизилась у 2,5 рази і становить 5,5 долара.