

АНАЛИЗ ХPERTMTB/RIF НА ОСНОВЕ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

Адамбекова А.Д., Алишеров А.Ш., Калмамбетова Г.И.

Кыргызско-Российский Славянский Университет,
Национальный Центр Фтизиатрии,
Бишкек, Кыргызская Республика

Резюме: В Республиканской референс лаборатории (РРЛ) НЦФ при помощи анализа ХpertMTB/RIF протестировано 76 образцов патологического материала. У мазок положительных больных, у которых была изолирована M. Tuberculosis, чувствительность теста составила 100%. У мазок отрицательных больных чувствительность теста – 81%.

Ключевые слова: анализ ХpertMTB/RIF, M. tuberculosis, резистентность, рифампицин.

ХPERT MTB/RIF АВТОМАТТАШТЫРЫЛГАН ПОЛИМЕРАЗА БАЙЛАНЫШКАН РЕАКЦИЯСЫН НЕГИЗИНДЕГИ АНАЛИЗДИ, КУРГАК УЧУКТУ ЛАБОРАТОРИЯЛЫК АНЫКТООДО КОЛДОНУСУ

Адамбекова А.Д., Алишеров А.Ш., Калмамбетова Г.И.

Кыргыз-Россия Славян Университети, Улуттук фтизиатрия борбору,
Бишкек ш., Кыргыз Республикасы

Корутунду: Улуттук Фтизиатрия Борборунун Республикалык референс лабораториясында 76 ХpertMTB/RIF физилдөөлөр өткөрүлдү.

Негизги сөздөр: ХpertMTB/RIF физилдөө, M. tuberculosis, туруктуулук, рифампицин

XPERT MTB/RIF, A NOVEL AUTOMATED POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED ASSAY FOR THE LABORATORY DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

Adambekova A.D., Alisherov A.Sh., Kalmanbetova G.I.

Kyrgyz-Russian Slovenia University, National center of Phthisiology,
Bishkek, Kyrgyz Republic

Summary: 76 Xpert MTB/RIF assays have been conducted in the National reference laboratory of NCPH. In the smear positive samples that grew M. tuberculosis we found sensitivity 100%. The sensitivity 81% was revealed in smear negative samples.

Key words: Xpert MTB/RIF assay, M. tuberculosis, resistance, rifampicin.

Введение.

Несмотря на то, что туберкулез (ТБ) – заболевание, которое можно как предотвратить, так и излечить, он по-прежнему является одной из основных причин смертности во всем мире. Более 8 миллионов человек в мире ежегодно инфицируется ТБ и почти 1.5 миллиона умирает от этого заболевания [1].

В Кыргызстане эпидемиологическая ситуация по туберкулезу остается неблагоприятной, несмотря на тенденцию к снижению показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза. Особую озабоченность вызывает факт растущей

заболеваемости лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза, которые составляют 26,4% среди новых и 52,6% среди ранее леченых случаев [2].

В странах с высокой распространенностью ТБ наиболее эффективный способ обследования при подозрении на ТБ – бактериоскопическое исследование мокроты. Однако, в связи с широким распространением МЛУ-ТБ и продолжающимся ухудшением ситуации с лекарственной устойчивостью, возрастает необходимость, как можно раньше выявлять и начинать лечение случаев МЛУ-ТБ [3].

За последние 5 лет произошли значи-

тельные сдвиги в молекулярных методах выявления туберкулеза и устойчивости к определенным противотуберкулезным препаратам. Сейчас во всем мире внедряется и тестируется автоматизированная, работающая на картриджах система, известная под названием Xpert MTB/RIF, использующая метод полимеразной цепной реакции, что позволяет выявить возбудителей туберкулеза в мокроте и определить устойчивость к рифампицину в течение двух часов [4]. Однократный тест мокроты на Xpert MTB/RIF обладает чувствительностью 99% при выявлении туберкулеза у БК(+) пациентов и 80% при БК(-), общая чувствительность составляет 92.2% (с применением культуры в качестве золотого стандарта). Для сравнения, однократная микроскопия мазка мокроты обладает чувствительностью только 59.5%. Высокая чувствительность Xpert MTB/RIF делает его полезным исследованием для исключения заболевания у пациентов с подозрением на ТБ и отрицательным результатом микроскопии мокроты. Специфичность исследования Xpert MTB/RIF при выявлении ТБ составляет 99%, что делает вероятность ложно-положительного результата очень низкой [5, 6].

Чувствительность анализа на Xpert MTB/RIF при выявлении устойчивости к рифампицину составляет 99.1%, специфичность 100% [7, 8]. Определение устойчивости к рифампицину очень важно, так как она является надежным доказательством МЛУ-ТБ. Это означает, что подавляющее большинство устойчивых к рифампицину случаев, будут также устойчивы к изониазиду, что позволяет классифицировать их, как МЛУ-ТБ.

Целью исследования было проведение сравнительного анализа теста Xpert MTB/RIF и культурального исследования на M. Tuberculosis у мазок положительных и отрицательных больных ТБ.

Материал и методы.

Для исследования использовался патологический материал – мокрота, собранная от

больных с легочной формой ТБ. Мы проводили анализ Xpert MTB/RIF, прямую микроскопию мазка мокроты по Цилю-Нильсену и посев на жидкой среде (ВАСТЕС™ MGIT™ 960, BDDiagnosticSystems, Sparks, MD, USA). Все вышеперечисленные исследования были проведены из одного образца патологического материала. В исследование не были включены анализы, проведенные из разных проб мокроты,

Использовалась платформа GeneXpert DxSystem, в которой объединены и автоматически выполняются следующие процессы: подготовка проб, амплификация нуклеиновых кислот и выявление целевой нуклеотидной последовательности с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Подготовку и обработку проб выполняют в одноразовых картриджах GeneXpert, специальных для каждого метода. В случае выявления туберкулеза и определения резистентности к рифампицину используются картриджи Xpert MTB/RIF. Пробы и необходимые реактивы вводят в картридж, который затем загружают в один из имеющихся модулей прибора.

Проведение теста Xpert MTB/RIF было проведено в соответствии с инструкциями производителя - компании Cepheid, Sunnyvale, США. До проведения теста, из того же образца проводилась прямая микроскопия мазка мокроты по методу Циля-Нильсена с определением кислотоустойчивых бактерий (КУБ). Градация бактериовыделения проведена в соответствии с классификацией ВОЗ и Национальным Руководством по борьбе с туберкулезом [9].

Бактериологические исследования на системе BD ВАСТЕС MGIT 960 проводили в соответствии с Руководством по работе системы MGIT 960 для диагностики легочного туберкулеза и лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Для разжижения мокроты и улучшения деконтаминации биологических образцов применяли стерильный раствор N-ацетил-цистеина с гидроксидом натрия

Таблица 1.
Сравнительная характеристика теста XpertMTB/RIF и культурального исследования на туберкулез
*определена как положительная для комплекса *M. Tuberculosis*

Результаты исследования		Xpert MTB/RIF положительный	Xpert MTB/RIF Отрицательный
М а з о к отрицательный	К у л ь т у р а положительная*	21	5
	К у л ь т у р а отрицательная	2	16
М а з о к положительный	К у л ь т у р а положительная*	32	0
	К у л ь т у р а отрицательная	0	0

(BBL MycoPrep NALC-NaOH). Инокуляция образцов проводилась в соответствии с руководством в пробирки с жидкой питательной (модифицированной) средой Middlebrook 7H9 [10].

Результаты исследования и их обсуждение.

В Республиканской референс лаборатории (РРЛ) НЦФ, с использованием теста XpertMTB/RIF, проанализировано 76 образцов патологического материала с отрицательным и положительным результатом микроскопии мазка мокроты. Результаты теста XpertMTB/RIF сравнивали с результатами посева на жидкой среде. Данные представлены в табл.1.

Итак, в 32 образцах мокроты, в которых был выявлен рост *M. Tuberculosis*, мы выявили 100% чувствительность теста XpertMTB/RIF. В 44 случаях, из мазок отрицательного результата мокроты по микроскопии, чувствительность теста составила 81% (21/26) и специфичность – 89% (16/18). Полученные нами данные не противоречат результатам исследований ряда авторов [5, 6]. В двух образцах мокроты, которые были мазок отрицательные, но тест XpertMTB/RIF был положительный, роста *M. Tuberculosis* не обнаружено. Повторные исследования не были проведены так как собрать патологический материал не

представилось возможным. В 5-ти случаях, когда результаты тестов XpertMTB/RIF и прямой микроскопии мазка были отрицательными, на жидкой среде выросли не туберкулезные микобактерии, что было подтверждено результатами иммуно-хроматографического теста SDBIOLINETBAgMPT 64 Rapid. Общая чувствительность теста составила 91% (53/58). Чувствительность микроскопии мазка мокроты по Цилю-Нильсену у культурально-положительных больных составила 60,3%, что подтверждается рядом публикаций [4].

Заключение

Результаты наших исследований, подтверждают высокую чувствительность теста XpertMTB/RIF, что подтверждено результатами культурального исследования, который до сих пор остается «золотым стандартом» в диагностике туберкулеза. Учитывая тот факт, что анализ можно проводить в лабораториях, к которым не предъявляются строгие требования по биологической безопасности, данный тест можно шире использовать во фтизиатрической практике с целью улучшения доступа пациентов к современным методам диагностики заболевания и улучшения мер инфекционного контроля при туберкулезе.

Литература

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2011.
2. Review of the laboratory network of the Kyrgyz Republic. 9-29 April 2012. Dr. Harald Hoffmann & Dr. Uladzimir Antonenka, TB Laboratory Experts, IML red GmbH, Germany.
3. WHO (World Health Organisation). *Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing*. Geneva, WHO, 2009 (WHO/HTM/TB/2009.411)
4. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational „How-to“; practical considerations. WHO. 2011.
5. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England Journal of Medicine*, 2010; Sep;363(11):1005-15.
6. 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. Jan;48(1):229-237.
7. Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, et al. (2011) Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 49: 1621–1623.
8. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, et al. (2011) Feasibility and impact of decentralised use of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistance—results from a multi-center implementation study. *Lancet* 377: 1495–1505.
9. Руководство по борьбе с туберкулезом в Кыргызской Республике. Под редакцией профессора, д.м.н. А.Ш.Алишерова. 2008 год.
10. Salman H. Siddiqi, Sabine Rusch-Gerdes. **Руководство по работе с Системой BACTEC MGIT 960. FIND**, 2006.