

Е.Г.БОЧКАРЕВ
 НИИ физико-химической
 медицины Минздрава РФ,
 Институт аллергологии
 и клинической иммунологии,
 Москва, Российская Федерация

УДК 616-002.5-07

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ГЕНОДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Внедрение молекулярно-биологических методов диагностики (полимеразная цепная реакция) значительно повышает эффективность выявления микобактерий туберкулезного комплекса по сравнению с традиционными микробиологическими (бактериоскопия, люминесцентная микроскопия, посев) методами. При туберкулезе органов дыхания преимущество ПЦР наиболее ощутимо при неструктурных и ограниченных формах болезни.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: туберкулез, генодиагностика, ПЦР.

PRESSING QUESTIONS OF TUBERCULOSIS GENODIAGNOSTICS

E.G. BOCHKARYEV

Physics-chemistry Medicine Institute, Allergology and Clinical Immunology Institute,
 Moscow, Russia.

Analysis of the traditional microbiological tests (microscopy, sowing) and PCR-tests (polymerase change reaction) to patients with pulmonary tuberculosis, extrapulmonary tuberculosis and nonspecific pathology is presented. Genodiagnosics tests more effective than traditional microbiological tests. PCR blood and urine tests before and after tuberculin administration (50 TU) to be the most informative subsidiary procedure.

KEY WORDS: tuberculosis genodiagnosics, PCR.

Обнаружение микобактерий туберкулезного комплекса в биологических материалах является одним из основных диагностических критериев во фтизиатрии. В настоящее время традиционные микробиологические методы выявления возбудителя по своей эффективности уже не удовлетворяют клиницистов. Быстрый метод бактериоскопии обладает низкой чувствительностью – для обнаружения микобактерий туберкулеза (МБТ) необходимо, чтобы 1 мл материала содержал не менее 100 тыс. микробных клеток. Люминесцентная микроскопия увеличивает чувствительность бактериоскопии на 10-30%. Чувствительность бактериологического посева значительно выше – 20-100 МБТ, однако исследование занимает длительное время - один-два месяца. В связи с этим МБТ выявляют в среднем лишь у 50-60% больных активным туберкулезом.

Широко распространенная за рубежом радиометрическая система ВАСТЕС для быстрого обнаружения живых МБТ в жидкой питательной среде не нашла должного применения в России вследствие высокой стоимости исследования, невозможности подсчета количества живых МБТ, необходимости применения радиоизотопов, а также дополнительного посева на плотные питательные среды (при возникновении проблем с идентификацией или интерпретацией результатов) [2].

При использовании иммуноферментного анализа (ИФА) специфические антитела при туберкулезе выявляются у 80% больных активным туберкулезом. Чувствительность метода колеблется от 68% до 92%, а специфичность в пределах 86-97%. При этом удельный вес ложноположительных реакций среди интактных лиц может достигать 15%. Недостаточная специ-

фичность метода исследования связана с наличием общих антигенов между МБТ и другими непатогенными микобактериями [1,6]. В связи с этим метод ИФА также не нашел широкого применения в практике фтизиатрии.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) основан на ферментативной амплификации выбранных участков генома (ДНК) бактерий рода *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*), их дальнейшей детекции и идентификации [13,12,15,16]. Аналитическая чувствительность метода, определяемая при последовательных разведениях суспензии бактериальных клеток, очень высока и составляет от 1 пг до 5 фг микобактериальной ДНК, что эквивалентно выявлению 1-10 бактериальных клеток [7]. Метод (ПЦР) обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами выявления микобактерий туберкулеза (люминесцентная микроскопия, бактериальный посев, иммуноферментный анализ):

1. прямое определение инфекционного агента, сочетающееся с высокой специфичностью;
2. высокая чувствительность, позволяющая выявлять единичные микобактерии в пробе;
3. быстрота проведения анализа (4-5 часов).

Недостаточность информации о первичной структуре ДНК МБТ является одним из лимитирующих факторов широкого применения ПЦР в практическом

здравоохранении. Для инициации ПЦР при определении микобактерий туберкулеза используются различные праймеры. Одни направлены на амплификацию фрагментов ДНК генов, кодирующих микобактериальные антигены, такие как белок 65kD (белок теплового шока), 38 kD (антиген b), МРВ 64; другие - на амплификацию повторяемых последовательностей в хромосоме МБТ, третьи - на амплификацию рибосомальной ДНК. Чувствительность ПЦР-диагностического набора реагентов зависит от характера исследуемой биопробы и количества применяемых циклов амплификации. Для биопроб, где предполагается нахождение значительного количества МБТ (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж) достаточная чувствительность составляет 50 копий ДНК при 30 циклах амплификации. Для биопроб, где возможно наличие незначительного количества МБТ (моча, кровь, соскоб эндометрия, плевральный экссудат) – максимальная чувствительность набора составляет 4 фрагмента генома возбудителя при 40-50 циклах амплификации [8, 9].

Ниже приводятся данные клинической апробации в Центральном НИИ туберкулеза РАМН и Новосибирском НИИ туберкулеза МЗ РФ ПЦР-диагностического набора, использующего систему праймеров, комплементарных участку гена МРВ 64 МБТ. Набор создан в лаборатории геной инженерии и иммуногенетики НИИ физико-химической медицины МЗ РФ.

Таблица 1

Данные сравнительного исследования бронхоальвеолярного лаважа больных туберкулезом органов дыхания и неспецифическими заболеваниями легких (НЗЛ) методами ПЦР и бактериологического посева
(Кузнецов П.В., Киншт В.Н., Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Формы туберкулеза, НЗЛ	Кол-во биопроб	Выявление ДНК методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом посева (кол-во биопроб)
Туберкулез Бронхов	4	4 (100%)	1 (25%)
Деструктивные формы (диссем., инфильтр., фибр.-каверн.)	54	51 (94,4%)	48 (88,8%)
Недеструкт. формы (диссем., очаговый, инфильтр.)	34	21 (38,8%)	7 (13%)
Хр.бронхит, пневмония	29	Не выявлено	Не выявлено

Таблица 2

Данные сравнительного исследования плеврального экссудата методами ПЦР и бактериологического посева, проведенного с целью дифференциальной диагностики туберкулезного и нетуберкулезного плевритов (Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ).

Этиологическая характеристика плеврита	Кол-во биопроб	Выявление ДНК методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом посева (кол-во биопроб)
Туберкулезный	4	4 (100%)	не выявлено
Нетуберкулезный	25	не выявлено	не выявлено

Как видно из представленных в таблицах 1, 2 данных у больных с деструктивными формами туберкулеза метод ПЦР имел незначительное преимущество перед культуральным. При недеструктивных формах болезни, туберкулезе бронхов и плеврите, в свою очередь, проявляется более высокая эффективность молекулярно-биологических методов диагностики микобактерий.

Комбинированное применение молекулярно-биоло-

гических и культуральных методов значительно повышает эффективность выявления МБТ по сравнению с бактериоскопией и посевом на плотные питательные среды. Сочетание ПЦР с посевом на жидкую питательную среду позволяет выявлять микобактерии в достаточно короткий срок (3-18 дней) у всех бактериоскопически абациллярных больных после проведенного курса химиотерапии (таблица 3).

Таблица 3

Сравнительные исследования мокроты методами бактериоскопии, посева на плотную (Левенштейна-Йенсена) и жидкую (BVL MGIT) питательные среды, ПЦР у 19-ти абациллярных (по данным бактериоскопии) больных
(Голышевская В.И., Черноусова Л.Н., отдел микробиологии ЦНИИ туберкулеза РАМН)

Метод диагностики	Отсутствие роста МБТ (кол-во больных)	Наличие роста МБТ (кол-во больных)	Срок роста МБТ или выявления ДНК МБТ с момента посева
Посев на плотную питательную среду	2	17	30-60 дней
Посев на жидкую питательную среду	-	19	16-30 дней
ПЦР	-	9	1-й день
Посев на жидкую питательную среду с выявлением ДНК методом ПЦР	-	10	3-18 дни

Применение ПЦР в клинике внелегочного туберкулеза является наиболее эффективным ввиду низкой концентрации МБТ в целевых пробах при этих формах заболевания [11]. Более адекватной интерпретации данных ПЦР-исследования будет

способствовать применение различных способов выделения ДНК, исследование одновременно различных по характеру биологических образцов от одного больного, применение туберкулино-провокационных проб [3, 4, 5].

Таблица 4

Сравнительное исследование мочи методами ПЦР и бактериологического посева, проведенные с целью дифференциальной диагностики туберкулезных и нетуберкулезных заболеваний мочеполовой системы (данные Новосибирского НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Этиологическая характеристика	Кол-во биопроб	Выявление ДНК методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом посева (кол-во биопроб)
Верифицированных туберкулез	19	16 (84,2%)	1 (5,3%)
Нетуберкулезные изменения	413	Не выявлено	Не выявлено

В таблице 4 представлены данные сравнительных исследований, проведенных с целью дифференциальной диагностики туберкулезных и нетуберкулезных поражений органов мочеполовой системы. У лиц с верифицированным в дальнейшем туберкулезом в 84,2% случаев методом ПЦР были выявлены ДНК микобактерий, культуральным методом-только в 5,3%. У значительного количества лиц ПЦР-исследование позволило отвергнуть туберкулезную этиологию изменений.

Применение туберкулиново-провокационной про-

бы Коха позволяет повысить диагностическую ценность метода ПЦР. В таблице 5 приведены данные сравнительного исследования мочи больных туберкулезом мочеполовой системы с целью определения активности процесса. У лиц с активным туберкулезом методом ПЦР в 73,9% случаев были выявлены МБТ, культуральным – в 8,7%. У лиц с неясной активностью процесса после проведения пробы Коха с 50 ТЕ через 48 часов в 59,7% случаев были выявлены МБТ и лишь в 6,5 % -культуральным.

Таблица 5

Сравнительное исследование мочи методами ПЦР и бактериологического посева, проведенные у лиц больных туберкулезом органов мочеполовой системы с целью определения активности процесса (данные Новосибирского НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Форма туберкулеза, фаза активности	Кол-во биопроб	Выявление ДНК методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом посева (кол-во биопроб)
Туберкулез почек, активный	23	17 (73,9%)	3 (8,7%)
Туберкулез мочеполовых органов с неясной активностью (через 48 часов после пробы Коха с 50 ТЕ)	77	46 (59,7%)	5 (6,5%)

С применением ПЦР возможно исследование венозной крови, биоптатов из пораженных туберкулезом органов. Следует отметить, что выделение ДНК МБТ из крови и биоптатов представляет определенные трудности из-за большого содержания в них ингибиторов ПЦР - гепарина и гемоглобина. В связи с этим следует подбирать оптимальный способ выделения ДНК для каждого диагностического образца. В лаборатории молекулярной диагностики ЦНИИ туберкулеза РАМН использовались три способа – с разрушением клеточной стенки гуанидином, фенол-хлороформный и с использованием протеиназы К. Фенол-хлоро-

формный способ выделения ДНК из биоптатов различных органов экспериментально зараженных туберкулезом животных оказался самым эффективным. Удельный вес положительных реакций здесь варьировал от 81,48% (селезенка) до 93,3% (легкое). Эффективность выделения ДНК из печени, почек и крови составила 84,45%, 82,2% и 8,5% соответственно. Особенно принципиальным является тот факт, что в крови животных с экспериментальным туберкулезом обнаружены ДНК микобактерий. Самым эффективным способом выделения ДНК при этом оказался гуанидиновый [14].

Таблица 6

Сравнительное исследование нативной крови методами ПЦР и бактериологического посева у больных с внелегочными поражениями, проведенные после пробы Коха с 50 ТЕ с целью подтверждения их туберкулезной этиологии (данные Новосибирского НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Этиологическая характеристика изменений мочеполовой и лимфоидной систем	Кол-во биопроб	Выявление ДНК методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом посева (кол-во биопроб)
Туберкулез мочеполовых органов	34	24 (70,6%)	Не выявлено
Туберкулез периферических лимфоузлов	6	4 (66,6%)	Не выявлено
Туберкулез периферических лимфоузлов у детей (на фоне выража пробы Манту)		10 (83,3%)	Не выявлено
Нетуберкулезные изменения мочеполовой и лимфоидных систем	169	Не выявлено	Не выявлено

В таблице 6 приведены данные сравнительного исследования нативной крови лиц с внелегочными поражениями через 48 часов после проведения пробы Коха с 50 ТЕ в целях подтверждения или исключения их туберкулезной этиологии (Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ). Выделение ДНК из крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции. Методом ПЦР у подавляющего большинства обследованных были выявлены ДНК микобактерий туберкулеза. Специфичность реакции была подтверждена отсутствием

положительного результата у лиц с нетуберкулезными изменениями. Культуральным методом ни у кого из обследованных не были выявлены МБТ.

А.Н. Калюк [10] считает, что в качестве скринингового метода наряду с микроскопией мазка необходимо проведение ПЦР. Это является экономически целесообразным при расхождении результатов микроскопии и ПЦР более, чем на 5%. При положительном ПЦР-анализе и отрицательной микроскопии можно начинать противотуберкулезную химиотерапию не проводя куль-

турального посева. Лица с положительным микроскопическим результатом и отрицательным ПЦР-анализом не должны получать химиопрепараты до момента выделения чистой культуры. Поскольку разница в значениях, получаемых между этими двумя методами составляет не менее 20%, то предлагаемая схема не только повышает эффективность диагностики, но и приносит значительный экономический эффект.

Заключение

Внедрение молекулярно-биологических методов диагностики (полимеразная цепная реакция) значительно повышает эффективность выявления

микобактерий туберкулезного комплекса по сравнению с традиционными микробиологическими (бактериоскопия, люминесцентная микроскопия, посев) методами. При туберкулезе органов дыхания преимущество ПЦР наиболее ощутимо при неструктивных и ограниченных формах болезни.

При внелегочных формах туберкулеза, характеризующихся олигобациллярностью, более адекватной интерпретации данных ПЦР-исследования будут способствовать применение различных способов выделения ДНК, исследование одновременно различных по характеру биологических образцов от одного больного, применение туберкулино-провокационных проб.

Литература

1. Андросова М.В., Владимирский М.А., Алексеева Г.И. Иммунологический метод идентификации *Mycobacterium tuberculosis* и *M. Bovis* BCG на основе применения моноклональных антител. // Проблемы туберкулеза. – 1989. - № 6.-с.12-16.
2. Бардисвичене И., Сосновская А. Сравнительная эффективность ВАСТЕС 460 ТВ и ИФА в диагностике туберкулеза легких. // В сб.: Проблемы ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза. Материалы научно-практической конференции. Обнинск, 1996.-с.35.
3. Вишневская Е.Б. Особенности выделения ДНК для ПЦР при туберкулезе внелегочных локализаций. // Проблемы туберкулеза. – 1998. - № 5.-с.23-26.
4. Вишневский Б.И., Мирлина Е.Д. ПЦР-диагностика микобактерий туберкулеза методом полимеразной цепной реакции при туберкулезе различных локализаций. // В сб.: Проблемы ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза. Материалы научно-практической конференции. Обнинск, 1996.-с. 14.
5. Вишневский Б.М., Мирлина Е.Д. Чувствительность и специфичность теста, основанного на полимеразной цепной реакции, при диагностике туберкулеза периферических лимфатических узлов. // Проблемы туберкулеза. – 1998. - № 4.-с.25-28.
6. Владимирский М.А. Иммунологические и биотехнологические методы в повышении эффективности диагностики и лечения туберкулеза: Автореф. дисс. доктора мед. наук. – М. – 1993.
7. Гольшевская В.И., Черноусова Л.Н., Шашкина Е.Ф., Ларионова Е.Е., Коваленко О.О., Денисова Т.С., Говорун В.М., Бочкарев Е.Г. Применение ПЦР для диагностики туберкулеза легких. / В сб.: Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы II Всероссийской конференции. М., 1998.-с.93.
8. Денисова Т.С., Говорун В.М. Возможности применения метода ПЦР (ДНК-диагностики) для выявления микобактерий туберкулезного комплекса. / В сб.: Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы II Всероссийской конференции. М., 1998.-с.96-100.
9. Дзадзиева М.Ф., Жербатович Н.В. Диагностическая ценность ПЦР при туберкулезе. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. - № 5.-с.10-13.
10. Калюк А.Н. Комплексные бактериологические исследования в диагностике туберкулеза. // Туберкулез и экология. – 1995. - № 3.-с.28-31.
11. Мирлина Е.Д., Ланцов В.А. Диагностические возможности метода ПЦР при генитальном туберкулезе у женщин. // Проблемы туберкулеза. – 1998. - № 1.-с.22-26.
12. Нестеренко Л.Н. Использование молекулярно-биологических методов в диагностике и типировании штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. / В сб.: Молекулярные основы патогенеза и диагностики туберкулеза и другой легочной патологии. Материалы научно-практической конференции. М., 1995.-с.50.
13. Приймак А.А., Владимирский М.А., Шипина Л.К., Калюк А.Н., Денисова Т.С., Народницкий Б.С., Калинина М.В. ПЦР – быстрый и высокочувствительный метод определения возбудителя туберкулеза в биологических материалах. // Пульмонология – 1995. - № 3.-с.16-20.
14. Смирнова Т.Г., Савинкова С.Н., Мартынова Л.П. Выявление ДНК микобактерий у животных с экспериментальным туберкулезом. // Проблемы туберкулеза.-1999.-№ 4.-с.10-13.
15. R.Boom, C.J.A.Sol, M.M.M.Salimans, C.H.Jansen, P.M.E.Wertheim van Dillen, J.Van der Noordaa. Rapiс and Simple method for purification of nucleic acids. //J.Clinical Microb. – 1990. - v.3. - p. 495-503.
16. David H. Persing. In vitro nucleic acid amplification techniques. //Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications, 1993.