



С.О. Черенко, А.О. Варицька, А.І. Барбова,
П.С. Трофимова

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології
імені Ф.Г. Яновського НАМН України», Київ

Контингенти хворих з групи високого ризику щодо мультирезистентного туберкульозу Rif⁺ за результатами обстеження хворих за допомогою GeneXpert MTB/RIF

Мета роботи — визначення контингентів хворих із групи високого ризику щодо мультирезистентного туберкульозу Rif⁺ за результатами обстеження хворих за допомогою GeneXpert MTB/RIF для розширення показань до застосування цього методу.

Матеріали та методи. За допомогою GeneXpert MTB/RIF обстежено 121 хворого на туберкульоз. Серед них чоловіків було 74 (61,2 %), жінок 47 (37,9 %). Середній вік хворих становив (34, 5 ± 2,2) року. Вперше діагностовано туберкульоз (ВДТБ) у 86 (71,1 %) хворих, рецидив туберкульозу (РТБ) — у 19 (15,7 %) хворих, раніше лікованих хворих (лікування після перерви, невідале перше лікування та інші) було 16 (13,2 %). У 71 (58,7 %) хворого був позитивний мазок мокротиння, у решти — негативний.

Дослідження мокротиння проводили з одного зразка за допомогою GeneXpert MTB/RIF і культуральним методом на рідкому живильному середовищі в автоматизованій мікробіологічній системі ВАСТЕК-960. Тест медикаментозної резистентності до протитуберкульозних препаратів I і II ряду проводили також у автоматизованій мікробіологічній системі ВАСТЕК-960. Результати, отримані за допомогою аналізу MTB/Rif, порівнювали з даними культурального дослідження і фенотиповими методами визначення чутливості до протитуберкульозних препаратів.

Результати та обговорення. У хворих з позитивним мазком мокротиння позитивним результатом визначення мікобактерій туберкульозу методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР+) був у 81,7 % випадків, з негативним — майже вдвічі рідше — у 38,0 %. Однак у цих хворих з однаковою частотою виявили резистентність до рифампіцину в разі ПЛР+ — відповідно у 55,2 та 52,5 % ($p > 0,05$). У переважній кількості випадків резистентність до Rif у тесті GeneXpert була асоційована з мультирезистентністю в тесті медикаментозної чутливості (ТМЧ) — у 83,3 % випадків, у 4,8 % — з полірезистентністю, зокрема з резистентністю до Rif. Таким чином, резистентність до RIF у тесті GeneXpert була підтверджена в ТМЧ у 37 (88,1 %) хворих. Серед пацієнтів з ПЛР+/Rif⁺ було 27 з ВДТБ (31,4 % загальної кількості хворих з ВДТБ), 9 з РТБ (47,4 % загальної кількості хворих з РТБ) та 6 (54,5 %) із хворих з невдалим лікуванням.

Висновки. З огляду на високий рівень резистентності до Rif незалежно від невдачу захворювання доцільно проводити обстеження за допомогою GeneXpert MTB/RIF усім хворим на туберкульоз незалежно від результатів дослідження мазка мокротиння з метою призначення правильного лікування з самого початку.

Ключові слова

GeneXpert MTB/RIF, мультирезистентний туберкульоз.

Туберкульоз (ТБ) продовжує залишатися однією з основних причин смерті від інфекційних хвороб у світі, спричиняючи понад 1,4 млн випадків смерті щорічно. В останні роки профі-

лактика, діагностика та лікування ТБ стали складнішими через поширення ко-інфекції ТБ/ВІЛ та мультирезистентного туберкульозу. Висока смертність від ТБ пов'язана із затримкою діагностування хвороби через застосування рутинних методів, що своєю чергою підтримує епідемію, оскільки продовжується передача інфекції

в популяції [7]. Поява молекулярно-генетичних методів діагностики ТБ на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі здійснила значний прорив діагностичних обмежень. Впровадження цих методів діагностики в лабораторну мережу з мікробіологічної діагностики ТБ в рамках реалізації національних туберкульозних програм реально може змінити епідемічну ситуацію з ТБ в країні [6].

В останні роки розроблено кілька молекулярних методів для діагностики ТБ та швидкого виявлення медикаментозної резистентності мікобактерій туберкульозу (МБТ) у клінічних зразках, у тому числі лінійний зонд-аналіз (генотип MTBDRplus (Хайн Lifescience GmbH, Nehren, Німеччина), INNO Lipa Rif.TB (Innogenetics, Гент, Бельгія) і ПЛР у реальному часі (GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Саннівейл, Каліфорнія). Молекулярні методи дають змогу визначати медикаментозну резистентність МБТ у клінічних зразках шляхом виявлення мутацій у генах, які призводять до лікарської стійкості, протягом робочого дня [2–6]. GeneXpert MTB/RIF є новим інтегрованим діагностичним пристроєм, який передбачає автоматизовану обробку зразків, ампліфікацію нуклеїнових кислот і визначення послідовності в зразках з використанням методів ПЛР у реальному часі. Система вимагає використання одноразових картриджів GeneXpert, які містять реагенти для ПЛР, де й відбувається реакція. Значною перевагою методу є те, що картриджі автономні, тому перехресна контамінація зразків неможлива. Аналіз MTB/Rif виявляє МБТ та резистентність до Rif шляхом ампліфікації 81-bb фрагменту *M. Tuberculosis* гену groB з наступним його зондуванням для виявлення мутацій, які пов'язані з резистентністю до рифампіцину. Дослідження триває до 2 год [5]. За рекомендацією ВООЗ, тест широко застосовують у світі від 2012 р. [7]. Аналіз досліджень засвідчив, що резистентність до рифампіцину з високою вірогідністю асоціюється з мультирезистентністю (до 94 %) [5]. В Україні, згідно з УКПМД «Туберкульоз», за допомогою GeneXpert MTB/RIF обстежують хворих на вперше діагностований туберкульоз (ВДТБ) і раніше лікованих із позитивним мазком мокротиння, ВІЛ-інфікованих, дітей та осіб, що мали контакт із хворими на мультирезистентний туберкульоз (МРТБ), незалежно від результатів мікроскопії мазка мокротиння [1].

Мета роботи — визначення контингентів хворих із групи високого ризику щодо мультирезистентного туберкульозу Rif⁺ за результатами обстеження хворих за допомогою GeneXpert MTB/RIF для розширення показань до застосування цього методу.

Роботу виконано за кошти державного бюджету.

Матеріали та методи

Обстежено 121 хворого на ТБ, серед них чоловіків було 74 (61,2 %), жінок 47 (37,9 %). Середній вік хворих становив $(34,5 \pm 2,2)$ року. ВДТБ був у 86 хворих (71,1 %), рецидив туберкульозу (РТБ) — у 19 (15,7 %), раніше лікованих хворих (лікування після перерви, невдача першого лікування, інші) було 16 (13,2 %). Усіх їх попередньо (до молекулярно-генетичного та культурального дослідження) обстежено за методом прямої мікроскопії мазка за методом Ціля—Нільсена. У 71 (58,7 %) хворого мазок мокротиння був позитивним, у решти — негативним.

Дослідження мокротиння проводили з одного зразка за допомогою GeneXpert MTB/RIF і культуральним методом на рідкому живильному середовищі в автоматизованій мікробіологічній системі ВАСТЕК-960. Тест медикаментозної резистентності до протитуберкульозних препаратів I і II ряду проводили також в автоматизованій мікробіологічній системі ВАСТЕК-960. Результати, отримані за допомогою аналізу MTB/Rif, порівнювали з результатами культурального дослідження і фенотипових методів визначення чутливості до протитуберкульозних препаратів.

Дослідження проводили в лабораторії мікробіології ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України». Свідоцтво про атестацію № ПТ-475/13, видане ДП «Укрметртестстандарт» 30.12.2013 р., засвідчує, що лабораторію атестовано на підставі Закону України «Про метрологію та метрологічну діяльність», вона відповідає критеріям атестації вимірювальних лабораторій відповідно до вимог Правил уповноваження та атестації в державній метрологічній системі. Лабораторію атестовано на проведення вимірювань показників об'єктів згідно із галуззю, що наведена в додатку до свідоцтва і є невід'ємною його складовою частиною.

Статистичну обробку проводили за параметричними й непараметричними методами статистики. Обраховували й визначали середню арифметичну показника, середньоквадратичне відхилення. Порівняння середніх групових значень та оцінку вірогідності різниць вивчали за параметричними та непараметричними методами варіаційної й рангової статистики із застосуванням t-критерію Стьюдента—Фішера, U-критерію Уїлкоксона—Манна—Уїтні. За рівень вірогідності приймали значення показника вірогідності різниці між групами (p), рівні/менші 0,05.

Таблиця 1. Результати обстеження за допомогою GeneXpert MTB/RIF у хворих з позитивним і негативним мазками мокротиння

Показник	Позитивний мазок (n = 71)		Негативний мазок (n = 50)		Позитивна культура (n = 82)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
ПЛР–	13	18,3	31	62,0	10	13,4
ПЛР+	58	81,7	19	38,0*	71	86,6
У т. ч.						
ПЛР+/Rif–	26	44,8	9	47,4	29	40,8
ПЛР+/Rif+	32	55,2	10	52,6	42	49,2

Результати та обговорення

Результати обстеження за допомогою GeneXpert MTB/RIF у хворих з позитивним і негативним мазками мокротиння наведено в табл. 1.

У хворих з позитивним мазком мокротиння позитивний результат визначення МБТ (ПЛР+) був у 81,7 % випадку, з негативним – майже вдвічі рідше – у 38,0 %. Чутливість GeneXpert MTB/RIF у хворих з позитивним мазком мокротиння дещо нижча, ніж за даними літератури, що пов'язано з тим, що в дослідженні мікроскопію мазка мокротиння проводили після попереднього дослідження з іншого зразка, ніж ПРЛ, і посів робили на рідке середовище. Для підвищення чутливості методу до 95 % належить проводити усі три дослідження з одного зразка мокротиння [5]. У хворих з позитивною культурою кількість позитивних результатів визначення МБТ за методом GeneXpert MTB/RIF більша – 86,6 %. У хворих з негативним мазком чутливість методу низька порівняно з тими, в кого він позитивний. Проте з однаковою частотою виявляли резистентність до рифампіцину в разі ПЛР+ – відповідно у 55,2 та 52,5 % хворих ($p > 0,05$), що свідчить про високий рівень резистентності до рифампіцину і потребу в обстеженні всіх хворих на туберкульоз за допомогою GeneXpert MTB/RIF незалежно від результатів мікроскопії мазка мокротиння.

Проаналізовано результати тесту медикаментозної чутливості у 42 пацієнтів з позитивним результатом ПЛР+/Rif+ (табл. 2).

У переважній кількості випадків резистентність до Rif у тесті GeneXpert було асоційовано з мультирезистентністю в ТМЧ – в 83,3 %, у 4,8 % – з полірезистентністю, в тому числі з резистентністю до Rif. Таким чином, резистентність до Rif у тесті GeneXpert була підтверджена в ТМЧ у 37 хворих (88,1 %). Серед пацієнтів з ПЛР+/Rif+ було 27 з ВДТБ (31,4 % загальної кількості хворих з ВДТБ), 9 з РТБ (47,4 % загаль-

Таблиця 2. Результати тесту медикаментозної чутливості у 42 пацієнтів з позитивним результатом ПЛР+/Rif+

Показник	Кількість хворих	
	Абс.	%
Мультирезистентність	35	83,3
Монорезистентність (ізоніазид)	1	2,4
Полірезистентність, за винятком резистентності до Rif	3	7,3
Полірезистентність з резистентністю до Rif	2	4,8
Збережена чутливість	0	0,0
Немає росту культури	1	2,4

ної кількості хворих з РТБ), 6 хворих з невдалим лікуванням (54,5 %). Якщо GeneXpert не виконують, цей контингент хворих зазвичай лікують протитуберкульозними препаратами I ряду за 1-ю і 2-ю категоріями. Отже, майже половину хворих лікуватимуть неправильно протягом як мінімум 1,5 міс до отримання результату ТМЧ, що призведе до поширення медикаментозної резистентності. З огляду на високий рівень резистентності до Rif незалежно від випадку захворювання, доцільно проводити обстеження за допомогою GeneXpert усім хворим на туберкульоз.

Висновки

Позитивний результат Rif+ у тесті GeneXpert отримано у 31,4 % хворих з ВДТБ, 47,4 % з РТБ і 54,5 % з повторним лікуванням. У 88,1 % хворих з Rif+ підтверджено резистентність до рифампіцину в ТМЧ на рідкому середовищі, з яких у 83,3 % встановлено мультирезистентність, у решти – полірезистентність. З огляду на високий рівень резистентності до Rif незалежно від випадку захворювання доцільно проводити обстеження за допомогою GeneXpert усім хворим на ТБ незалежно від результатів мазка мокротиння з метою призначення правильного лікування з самого початку.

Список літератури

1. Наказ МОЗ України № 1091 від 21.12.2012 р. «Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Туберкульоз». — http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20121221_1091.html.
2. Boehme C.C. et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance // N. Engl. J. Med.— 2010.— Vol. 363, N 11.— P. 1005–1015.
3. Boehme C.C. et al. Use of the Genotype MTBD assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis complex isolates // J. Clin. Microbiol.— Vol. 43.— P. 3699–3703.
4. Foundation for Innovative New Diagnostics Negotiate prices for Xpert® MTB/RIF and FIND country list [Electronic resource]/Geneva: FIND, 2012. http://www.finddiagnostics.org/about/what_we_do/successes/find-negotiated-prices/xpert_mtb_rif.html.
5. Huang W.L. et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralize use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multi-centre implementation study // Lancet.— 2011.— Vol. 377, N 9776.— P. 1495–1505.
6. UNITAID. Tuberculosis: diagnostic technology landscape [Electronic resource]/Geneva: UNITAID, 2012. <http://www.unitaid.eu/images/marketdynamics/publications/UNITAID.pdf>.
7. World Health Organization (WHO). Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test [Electronic resource]/Geneva: WHO, 2011. http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501569_eng.pdf.

С.А. Черенько, А.А. Варицкая, А.И. Барбова, П.С. Трофимова

ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф.Г. Яновского НАМН Украины», Киев

Контингент больных из группы высокого риска мультирезистентного туберкулеза Rif⁺ по результатам обследования больных с помощью GeneXpert MTB/RIF

Цель работы — определение контингентов больных из группы высокого риска мультирезистентного туберкулеза Rif⁺ по результатам обследования больных с помощью GeneXpert MTB/RIF для расширения показаний к применению этого метода.

Материалы и методы. С помощью GeneXpert MTB/RIF был обследован 121 больной туберкулезом. Среди них мужчин было 74 (61,2 %), женщин — 47 (37,9 %). Средний возраст больных составил (34,5 ± 2,2) года. Впервые диагностированный туберкулез (ВДТБ) был у 86 (71,1 %) больных, рецидив туберкулеза (РТБ) — у 19 (15,7 %) больных, ранее леченных больных (лечение после перерыва, неудача первого лечения и другие) было у 16 (13,2 %). У 71 (58,7 %) больного определяли положительный мазок мокроты, у остальных — отрицательный.

Исследование мокроты проводили с одного образца на GeneXpert MTB/RIF и культуральным методом на жидкой питательной среде в автоматизированной микробиологической системе ВАСТЕК-960. Тест медикаментозной резистентности к противотуберкулезным препаратам I и II ряда проводили также в автоматизированной микробиологической системе ВАСТЕК-960. Результаты, полученные с помощью анализа MTB/Rif, сравнивали с результатами культурального исследования и фенотипическими методами определения чувствительности к противотуберкулезным препаратам.

Результаты и обсуждение. У больных с положительным мазком мокроты положительный результат определения микобактерий туберкулеза (МБТ) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР+) был в 81,7 % случаев, с отрицательным — почти вдвое реже — у 38,0 %. Однако у этих больных с одинаковой частотой обнаружили резистентность к рифампицину при ПЦР+ — соответственно у 55,2 и 52,5 % больных ($p > 0,05$). В подавляющем большинстве случаев резистентность к Rif в тесте GeneXpert была ассоциирована с мультирезистентностью в тесте медикаментозной чувствительности (ТМЧ) — в 83,3 % случаев, в 4,8 % — с полирезистентностью, в том числе с резистентностью к Rif. Таким образом, резистентность к Rif в тесте GeneXpert была подтверждена в ТМЧ у 37 (88,1 %) больных. Среди пациентов с ПЦР+/Rif⁺ было 27 с ВДТБ (31,4 % от общего количества больных с ВДТБ), 9 из РТБ (47,4 % от общего количества больных с РТБ) и 6 (54,5 %) из числа больных с неудачей лечения.

Выводы. Учитывая высокий уровень резистентности к Rif независимо от случая заболевания, целесообразно проводить обследование с помощью GeneXpert MTB/RIF всем больным туберкулезом независимо от результатов исследования мазка мокроты с целью назначения правильного лечения с самого начала.

Ключевые слова: GeneXpert MTB/RIF, мультирезистентный туберкулез.

S.O. Cherenko, H.A. Varytska, A.I. Barbova, P.S. Trofimova

SI «National Institute of Phthysiology and Pulmonology named after F.G. Yanovsky of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Contingent of patients at high risk of multidrug-resistant tuberculosis Rif⁺ from the results of the survey of patients using GeneXpert MBT/RIF

Objective – to define groups of patients at high risk of MDR TB Rif⁺ on the basis of the survey of patients using GeneXpert MBT/RIF to order to expand the indications for using this method.

Materials and methods. 121 patients with tuberculosis were examined using GeneXpert MBT/RIF, 74 (61.2 %) men, women – 47 (37.9 %) among them. The average age of the patients was (34.5 ± 2.2) years. Newly diagnosed tuberculosis was in 86 (71.1 %) patients, relapse of tuberculosis – 19 (15.7 %) patients, previously treated patients (treatment after interruption, failure of treatment I) were 16 (13.2 %) patients. 71 (58.7 %) patients were sputum smear positive, the rest – negative.

Sputum examination was performed on one sample using GeneXpert MBT/RIF and culture method with liquid medium in the automated microbiology system BACTEK-960. Testing drug susceptibility to anti-TB drugs of the I and II lines was also performed in the automated microbiology system BACTEK-960. The results of the MTB/Rif analysis were compared with culture results and phenotypic methods for determining susceptibility to anti-TB drugs.

Results and discussion. Smear positive patients had positive result of PCR⁺ in 81.7 % cases, smear negative – in 38.0 %. However, these patients showed rifampicin resistance Rif⁺ with the same frequency – in 55.2 % and 52.5 % of cases respectively ($p > 0.05$). In most cases, resistance to Rif in GeneXpert test was associated with multidrug resistance – in 83.3 % of cases, 4.8 % – with polyresistance, including resistance to Rif. Thus, Rif resistance using GeneXpert was confirmed in 37 (88.1 %) patients. Among patients with PCR⁺/Rif⁺ 27 were new cases of TB (31.4 % of the total number of new cases), 9 cases were relapses of TB (47.4 % of the total number of relapse cases), 6 (54.5 %) patients had treatment failure.

Conclusions. In order to determine the most appropriate treatment regimen it is necessary to carry out GeneXpert MBT/RIF for all TB patients regardless of smear results and the case of disease due to high level of resistance to Rif.

Key words: GeneXpert MBT/RIF, multidrug-resistant tuberculosis.

Контактна інформація:

Черенько Світлана Олександрівна, д. мед. н., проф., зав. відділення фізіотерії
03680, м. Київ, вул. М. Амосова, 10
Тел. (044) 275-41-33
E-mail: scherenko@ifp.kiev.ua

Стаття надійшла до редакції 17 червня 2014 р.