

Петренко В.І.,
Радиш Г.В.

СУЧАСНІ МЕТОДИ ВИЯВЛЕННЯ ТА ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Національний медичний університет імені О.О.Богомольця

Резюме. Точна та швидка діагностика туберкульозу є надзвичайно важливою для контролю за туберкульозом. Хоча упродовж минулих десяти років з'явилася значна кількість методів діагностики туберкульозу, запровадження їх у практику відбувається лише у розвинених країнах світу. В той же час більшість країн продовжують використовувати ті самі старі методи, якими користувались більше ста років назад. Переваги та обмеження всіх існуючих на сьогоднішній день методів для діагностики активного туберкульозу, латентної туберкульозної інфекції, а також для визначення чутливості збудника до лікарських препаратів описані в даній статті. Проте дотепер не існує методу, який був би одночасно недорогим, простим та найбільш точним та специфічним. Таким чином, недосконалість діагностики туберкульозу призводить до того, що багато хворих залишаються невиявленими, що ще більше поглиблює проблему поширеності туберкульозу.

Ключові слова: туберкульоз, методи виявлення, діагностика.

Попри значні наукові досягнення, туберкульоз залишається однією з найсмертельніших загроз людству, проте ефективних методів діагностики все ще бракує. Своєчасне та ефективне виявлення туберкульозу — одна із найважливіших проблем контролю за недугою, адже пацієнти, які не пройшли лікування, залишаються джерелом інфекції, в той час як вже через 2 тижні протитуберкульозної терапії багато хворих стають незаразними [18]. За рекомендованими Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) цілями в рамках стратегії "Зупинимо туберкульоз" для зменшення передачі *Mycobacterium tuberculosis* (мікобактерія туберкульозу, МБТ) щонайменше до 40%, необхідно забезпечити експрес-діагностику 70% випадків з позитивним мазком мокротиння та ефективне лікування 85% з них [15].

Виявлення активного туберкульозу

Радіологічні методи. Одними із поширених методів виявлення туберкульозу, особливо в рамках скринінгу, є радіологічні методи — рентгенографія органів грудної порожнини. Проте важливо пам'ятати, що попри свою зручність цей метод не підтверджує туберкульозну етіологію будь-якої виявленої аномалії в легенях, а для діагностики туберкульозу у ВІЛ-інфікованих є надзвичайно ненадійним. Практичний досвід та численні дослідження виявили відсутність чітких радіологічних ознак туберкульозу, які б не спостерігались при інших захворюваннях [11]. Таким чином, самостійне використання радіологічних методів може призводити до гіпердіагностики туберкульозу, тому потребує поєднання з лабораторною діагностикою.

Бактеріоскопічні методи. Найширше для виявлення туберкульозу використовується мікроскопія

мазку мокротиння чи іншого виділеного матеріалу. З часу його впровадження у 1882 році він значно удосконалювався, що дозволяло підвищити чутливість методу за меншої кількості мікроорганізмів. Проте, на сьогоднішній день цей швидкий (2 години) та дешевий метод має відому низку недоліків.

Так, для отримання позитивного результату аналізу необхідно, аби в 1 мл матеріалу було щонайменше 5–10 тис. бактерій, що значно обмежує чутливість методу, особливо на початкових стадіях захворювання. Низька чутливість (35–70%) методу у ВІЛ-позитивних осіб, дітей та при позалегеновому ТБ призводить до помилкових негативних результатів. Також варіабельність результатів залежить від кваліфікації виконавця, якості обладнання та навантаження на лабораторію. Методика потребує повторного дослідження, що затримує постановку діагнозу і часто призводить до того, що багато хворих не завершують діагностику та губляться в системі охорони здоров'я попри позитивний результат. Бактеріоскопічне дослідження також не дозволяє визначити медикаментозну чутливість, що дуже важливо в умовах високої поширеності первинної резистентності.

Для покращення якості методу, а саме збільшення швидкості виконання та чутливості, існують покращені методики, наприклад використання флюоресцентних мікроскопів. Проте велика вартість обладнання робить їх доступними лише для розвинених країн. На щастя, мікроскопія виявляє найбільш інфекційно небезпечних хворих, які потребують негайного лікування, тому є достатньо специфічним методом для країн з високим тягарем ТБ.

Бактеріологічні методи. "Золотим стандартом"

діагностики активного туберкульозного процесу залишається культуральне дослідження. На теперішній час діагностична роль культурального дослідження зростає навіть у країнах, що розвиваються, що пов'язано з впровадженням спільної стратегії у боротьбі з ТБ [12], наявністю більшої кількості ресурсів та отримання негативного результату мікроскопічного дослідження мазка мокротиння при ВІЛ-асоційованому ТБ.

Серед культуральних методів важливе місце поряд із стандартними (на щільних яєчних і агарових – Левенштейна–Йенсена та Мідлбрук 7Н10/7Н11, та рідких синтетичних середовищах – Мідлбрук 7Н9) зайняли автоматизовані методи: на щільних – DioTK (Salubris), та рідких поживних середовищах – Bactec 460 (Becton Dickinson), MGIT 960 (Becton Dickinson), Murieux), SeptiChek-AFB (Becton Dickinson), ESP Culture II System (Trek Diagnostics) [2,7].

Проте, попри свою більшу чутливість (10–100 бактерій на 1 мл матеріалу), що дозволяє виявити МБТ у 80% випадків із специфічністю 98%, вирощування та виявлення МБТ триває 1–8 тижнів. Таким чином, навіть при використанні рідкої культури потрібно багато часу для того, щоб виявити ТБ і при позитивному результаті – визначити стійкість до препаратів першого ряду. При негативному результаті мікроскопічного дослідження мазка та в очікуванні результатів культурального дослідження, клініцист змушений приймати рішення стосовно лікування пацієнта виходячи з клінічних критеріїв, а саме ознак та симптомів, результатів рентгенологічного дослідження та анамнезу попереднього контакту із хворим на ТБ.

Мало того, клініцисти, які працюють в умовах високої поширеності мультирезистентного ТБ (МРТБ) мають додаткові труднощі у виборі лікування, пов'язані з тим, що стандартна схема терапії може бути неадекватною при вперше виявленому ТБ з огляду на ризик подальшого розвитку резистентності.

Головних недоліків традиційної прямої мікроскопії (чутливість та специфічність є доволі низькими) та культурального дослідження (надто повільно, щоб допомогти лікарю у прийнятті рішення) не має новий мікроскопічний метод виявлення медикаментозної чутливості (ММВМЧ, англ. MODS – Microscopic-Observation Drug Susceptibility assay).

ММВМЧ створено на основі того, що МБТ росте швидше у рідкому, ніж у традиційному твердому середовищі, що дозволяє здійснити пряме одночасне визначення медикаментозної

чутливості (ТМЧ) шляхом дослідження дії протитуберкульозних препаратів першого та другого ряду на культуру МБТ.

У порівнянні з ефективністю культурального дослідження у пацієнтів з та без ВІЛ-інфекції при підозрі на ТБ використання автоматизованого культурального методу ММВМЧ виявляє кращу чутливість (97,8% порівняно з 89% та 84% відповідно), дозволяє швидше отримати позитивний результат (на 6 та 19 днів відповідно) та результати ТМЧ, в тому числі тесту на штами МРТБ (на 15 та 61 день відповідно) [6].

ММВМЧ відносно простий у виконанні, його результат легко інтерпретувати, та є дешевим, що робить його потенційно цікавим для країн, що розвиваються. Метод використовували для тестування дітей, пацієнтів з ВІЛ-інфекцією та при туберкульозному менінгіті [6].

Молекулярні методи. Нещодавно з'явилися нові розробки – молекулярні методи виявлення туберкульозу на основі ампліфікації нуклеїнових кислот (ТАНК), які полягають у декодуванні геному МБТ [4,9,14]. Найпоширенішими методиками є полімерно-ланцюгова реакція (ПЛР), транскрипційно опосередкована ампліфікація (ТОА) та ампліфікація з заміщенням ланцюгів (АЗЛ).

Ці методики є високоспецифічними (98–100%), високочутливими (10 бактерій на 1 мл матеріалу), швидкими (2,5–3,5 години) та дозволяють досліджувати будь-який біологічний матеріал (кров, лімфа, кістковий мозок, ліквор, сеча, бронхіальний аспірат та лаважна рідина) з низьким ризиком контамінації.

Проте існують і недоліки використання комерційно доступних ТАНК для діагностики ТБ; вони є високочутливими (95%) та специфічними при позитивному результаті мікроскопії і гірше працюють при негативних (чутливість – 60–70%), потребують інтерпретації з урахуванням клінічних даних та часто потребують подальшої диференціації МБТ від нетуберкульозних мікобактерій (НТМБ). Висока вартість витратних матеріалів та необхідність у доволі високому рівні оснащення лабораторій, відсутньому у багатьох країнах, обмежує використання методу у країнах, що розвиваються.

На сьогодні існує два схвалені комерційні методи ТАНК: AmpliCor Mycobacterium Tuberculosis Test (Roche Diagnostic Systems Inc, Нью-Джерсі, США) і Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (MTD; Gen-Probe, Каліфорнія, США). Перший базується на ампліфікації гену 16S рРНК, використовуючі геноспецифічні праймери з виявленням в колориметричній реакції. Другий метод заснований на

збільшенні 16S рибосомних копій, які виявляються пробою ДНК. Також існує напівавтоматичний метод АЗЛ – BD ProbeTec Direct TB System (Becton Dickinson, Sparks, Меріленд, США), в якому використовується ферментна реплікація послідовності в IS6110 та в гені 16S рРНК з виявленням продуктів ампліфікації за допомогою люмінометра.

Останнім впровадженням молекулярної діагностики стала методика ПЦР в реальному часі на основі платформи Xpert MTB/RIF, яка базується на гібридації ампліфікованих нуклеїнових кислот з подальшим флуоресцентним маркуванням ДНК-ділянок та моніторингом всередині ДНК-ампліфікаторів. Специфічність методу становить 100%, в той час як чутливість коливається в межах 71–98% та може залежати від нерівномірності розподілу бактерій в матеріалі.

У вересні 2010 року Консультативна група ВООЗ зі стратегічних та технічних питань у сфері туберкульозу визнала цей метод тестом першого ряду для осіб з підозрою на МРТБ або ВІЛ-асоційований ТБ та тестом для подальшої оцінки у пацієнтів з негативним результатом мікроскопії [22]. Простий у використанні прилад здатний за 1 годину та 45 хвилин визначити, чи є у матеріалі МБТ, а також виявити стійкість до рифампіцину. Цей автономний картриджний тест не потребує ані тривалої підготовки виконавця, ані сучасних лабораторій, ані новітніх методів біологічного захисту у лабораторії.

Використання бактеріофагів. Швидко виявити МБТ дають також немоллекулярні індикаторні системи – тест-система FastPlaque (Biotec Laboratories Ltd., Іпсвіч, Великобританія) – комерційна методика, яка базується на здатності МБТ підтримувати ріст бактеріофагів (віруси, які інфікують МБТ) кількість яких залежить від кількості життєздатних МБТ та визначається за допомогою мікобактерій, що швидко ростуть (*M. smegmatis*). Тест дозволяє отримати результати протягом 48–72 годин і не потребує спеціального обладнання. Чутливість методу складає 75% підтверджених культурою випадків, 50–65% в негативному за мікроскопією мазка матеріалі і 70% випадків з клінічним діагнозом ТБ, специфічність – 98,7, 98,0 і 99,0% відповідно [7].

Удосконаленням методики стало використання мікобактеріофагів з генами-репортерами люциферази, яка базується на біологічній люмінесценції, що дає змогу за 2–4 дні виявити резистентність до протитуберкульозних препаратів з чутливістю та специфічністю методу вище 95%.

Серологічна діагностика (виявлення антитіл та антигенів в крові), яка ефективно використо-

вується для діагностики інфекційних хвороб, є надзвичайно швидкою (15 хвилин), простою, зручною та недорогою технологією, виявилась провальною в адекватній постановці діагнозу ТБ.

У якості такого потенційного біомаркера захворювання пропонується мікобактеріальний ліпоарабіноманнан (ЛАМ), термостійкий гліколіпід. Специфічний до мікобактерій ЛАМ виділяють метаболічно активні МБТ. Він фільтрується нирками після чого виявляється у сечі. Попередні дослідження показали, що ЛАМ, хоча він і є специфічним для діагностики ТБ, має низьку чутливість, особливо в умовах низької поширеності ВІЛ-інфекції.

Нещодавно ВООЗ, після 12 місяців ретельного аналізу, опублікувала нові рекомендації стосовно використання комерційно доступних тестів крові для діагностики активної форми ТБ. Виявлено, що результати комерційних серологічних тестів непослідовні та неточні, що призводить до вельми варіабельних показників чутливості та специфічності: вища чутливість спостерігається при позитивному мазку мокротиння, набагато нижча у дітей, при позалегеновій локалізації туберкульозу, ВІЛ-інфікуванні та негативному мазку мокротиння [20,21].

Немає жодних даних щодо того, що існуючі комерційні серологічні тести покращують результати діагностики пацієнтів, а висока частка хибно-позитивних (внаслідок перехресної реактивності до НТМБ) та хибно-негативних результатів може небажаним чином позначитися на здоров'ї пацієнтів, адже не дозволяють достовірно диференціювати хворобу від латентної туберкульозної інфекції (ЛТБІ) та МБТ від НТМБ.

ВООЗ настійливо рекомендує не використовувати ці комерційні тести, котрі часто призводять до неправильного діагнозу, неправильного лікування та потенційної шкоди громадському здоров'ю для діагностики легеневого та позалегенового ТБ. Ця рекомендація стосується тільки неточних та незатверджених тестів крові на предмет активного ТБ. ВООЗ наразі розглядає тести крові на ЛТБІ.

Виявлення латентної туберкульозної інфекції

Латентна туберкульозна інфекція (ЛТБІ) – інфікування МБТ за відсутніх клінічних, бактеріологічних або радіологічних ознак або симптомів активності процесу, стану, коли адаптивна імунна система хазяїна здатна контролювати мікроорганізм, але не здатна його усунути [3]. Діагностика ЛТБІ є важливою складовою ліквідації ТБ, особливо в розвинених країнах [1]. При ЛТБІ виникає безсимптомна інфекція, при

якій неможливо виявити МБТ або відсутній стерилізуючий ефект імунної системи. Проте, хоча при ЛТБІ МБТ за визначенням не піддається виявленню, постановка діагнозу спирається на виявлення імунної відповіді організму на інфекцію [5].

Понад сто років для діагностики ЛТБІ використовується туберкулінодіагностика (ТД), особливо як скринінговий метод, адже є дешевим і простим у виконанні. Проте ТД не рекомендується для діагностики активного захворювання, оскільки має чутливість лише 70–85%, та може супроводжуватися хибно негативними результатами у ВІЛ-інфікованих (50%) та хибно позитивними результатами при активному ТБ (25%). Крім того, вакцинація БЦЖ ускладнює інтерпретацію ТД [16].

Проблему виключення хибно позитивних результатів ТД вдалося вирішити з впровадженням препарату Діаскінтест (Російський НДІ Московської Медичної Академії ім. І.М. Сеченова), який являє собою рекомбінантний білок, який продукується генетично модифікованою культурою *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT, та містить два зв'язаних між собою антигени – CFP10 та ESAT6, присутні у вірулентних штаммах мікобактерій, в тому числі *M.tuberculosis* та *M.bovis*. Ці антигени відсутні в штаммах БЦЖ *M.bovis*, що дозволяє значно підвищити специфічність методу ТД.

Альтернативою ТД став новий клас методів *ex vivo*, які визначають γ -інтерферон, що вивільнився з сенсibilізованих Т-клітин після стимуляції антигенами МБТ – тести виявлення цитокінів, а саме тест вивільнення γ -інтерферону (ТВГІ) [17].

ТВГІ порівняно з ТД є швидким у виконанні (48 годин), виявляє більшу специфічність (>93%) та чутливість (83–100%), кращу кореляцію з маркерами контакту з МБТ в умовах низької захворюваності, вищу прогностичну цінність прогресування до активного ТБ при негативному та позитивному результаті тесту, меншу перехресну реактивність внаслідок вакцинації БЦЖ [8,13]. За рахунок використання специфічних білкових антигенів, які секретує МБТ, закодованих у ділянці RD-1, який відсутній у штамі БЦЖ або у більшості НТМБ, ТВГІ теоретично більш специфічний, ніж ТД [6,10].

Використання ТВГІ на інших біологічних матеріалах, де сконцентровані специфічні Т-клітини: дослідження промивних вод бронхоальвеолярного лаважу, плеврального випоту та ліквору показало високу специфічність в порівнянні з мікроскопією, культуральними та молекулярними методами [6].

Крім вищеописаних переваг ТВГІ має недоліки

у високій вартості методу та обмеженні у використанні при підозрі на активний туберкульоз.

Зараз доступні два комерційні набори тестів ТВГІ: QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Целестіс, Карнегі, Австралія) на основі імуноферментного аналізу (ІФА, англ. ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay) та T-SPOT-TB (Оксфорд, Імунотек, Абінгтон, Великобританія) на основі модифікованого ІФА – методу імуноферментних плям (МІП, ELISPOT – enzyme-linked immunosorbent spot);

У національні методичні рекомендації для країн з низьким тягарем використання ТВГІ включено в алгоритми діагностики ЛТБІ та використовується замість ТД (США), чи разом з ТД (Великобританія та інші Європейські країни) [6]. Проте важливо підкреслити, що ВООЗ не рекомендує ТПГІ для країн з високим тягарем ТБ (країни низького та середнього достатку) та дає наступні застереження: ТВГІ та ТД не можуть точно передбачити ризик розвитку активного ТБ у інфікованих осіб; ні ТВГІ, ні ТД не має використовуватись для діагностики активного ТБ; ТВГІ, за рахунок вищої вартості та технічної складності, ніж ТД, не рекомендується до заміни стандартно прийнятої ТД в умовах обмежених ресурсів [19].

В ідеалі, маркер, здатний відрізнити інфекцію від хвороби та різні стадії захворювання, буде корисним не тільки для діагностики, а й для моніторингу лікування, а також як засіб для визначення ефективності вакцинації.

Можливим підходом є визначення кількості так званих багатофункціональних CD4-T-лімфоцитів. Якщо ці клітини фенотиповані відповідно до їхніх поверхневих клітинних маркерів та вироблення цитокіну, вони асоціюються зі стадіями захворювання при інших хронічних інфекціях, наприклад, ВІЛ-інфекції. Було показано, що відносні зміни у кількості цих клітин пов'язані з мікобактеріальним навантаженням при активному ТБ, а їх застосування для диференціації ЛТБІ від активного процесу вивчається [6].

Також вивчається можливість використання генної експресії в якості діагностичного тесту та диференціації стадій захворювання: виявлено гени, які потенційно здатні відрізнити пацієнтів з активною формою ТБ, осіб з латентною інфекцією та тих, хто раніше отримував протитуберкульозне лікування (ген-393, ген-86) [6]. Альтернативним методом є вивчення генної експресії у клітинах, стимульованих специфічними антигенами МБТ, що дозволяє відрізнити осіб з латентною інфекцією від пацієнтів з активним ТБ. Аналогічно, визначення співвідношення між експресією рівнів IL-4 та

його варіант сплайсинга IL-4d2 виявило кореляцію із ступенем захворювання, отже зміни у цьому співвідношенні можуть вказувати на зміни у бактеріальному навантаженні [6].

Інші нові методи діагностики

Діагностика позалегенового ТБ все іще є проблематичною, навіть у багатих країнах. Трансбронхіальна голкова аспірація (ТБГА) за допомогою фіброоптичного бронхоскопу є мінімально інвазивним методом аспірації лімфатичних вузлів. На жаль вона обмежується великими лімфатичними вузлами у головних групах [6]. Сучаснішою розробкою є ендобронхіальне УЗД (ЕБУЗД), яке дозволяє у реальному часі візуалізувати структури середостіння у комбінації з ТБГА, та є безпечним методом аспірації лімфатичних вузлів середостіння та кореня легень під сонографічним контролем. Нові данні свідчать про те, що ЕБУЗД-ТБГА є безпечним та корисним методом діагностики туберкульозу внутрішньогрудних лімфатичних вузлів з перспективними результатами культуральних методів дослідження [6]. Аналогічно, прищільна ендоскопія патологічно збільшених вузлів через стравохід — ультразвукова ен-

доскопія (УЗЕ) — дозволяє отримати зразок вузла, чого не здатна зробити ані ЕБУЗД-ТБГА, ані медіастиноскопія. Поєднання діагностичних процедур, наприклад, ЕБУЗД-ТБГА з сучасними радіологічними методами, які допомагають визначити ділянки активного процесу, наприклад, за допомогою позитронної емісійної томографії (ПЕТ), може дати ще кращий результат [6].

Висновки

Щорічно в світі витрачається понад 1 мільйон дол. США на діагностику ТБ [7]. В країнах, що розвиваються, де зосереджена найбільша кількість хворих на ТБ, якісніші, але складніші й дорожчі тести не є широко впровадженими, а мікроскопія та рентгенографія залишаються опорою діагнозу. Будучи відносно недорогими, ці традиційні, випробувані століттями методи призводять до значної затримки постановки діагнозу, повторних досліджень та невірною діагнозу, що супроводжується зростанням витрат на діагностику. Тому, на теперішній час світ потребує нової ефективної діагностики туберкульозу — високочутливої, високоспецифічної, швидкої, дешевої та простої у виконанні.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Петренко В.И., Радыш А.В.

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца

Резюме. Точная и быстрая диагностика туберкулеза является чрезвычайно важной для контроля за туберкулезом. Хотя на протяжении прошлых десяти лет появилось много методов диагностики туберкулеза, введение их в практику происходит только в развитых странах. В это же время большинство стран продолжают использовать старые методы, которыми пользовались больше ста лет назад. Преимущества и ограничения всех существующих на сегодняшний день методов для диагностики активного туберкулеза, латентной туберкулезной инфекции, а также для определения чувствительности возбудителя к лекарственным препаратам описаны в данной статье. Однако до сих пор не существует метода, который был бы одновременно недорогим, простым и наиболее точным и специфичным. Таким образом, несовершенство диагностики туберкулеза приводит к тому, что много больных остается не выявленными, что ведет к еще большему углублению проблемы распространенности туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, методы выявления, диагностика.

CURRENT DIAGNOSIS AND EVALUATION OF TUBERCULOSIS

Petrenko V.I., Radysh H.V.

O.O. Bohomolets National Medical University

Summary. Exact and rapid diagnosis of tuberculosis is of primary importance for tuberculosis control. Although there have been significant advances in diagnostic technologies for tuberculosis during the past decade, this progress is implemented only in developed countries. Meanwhile most countries around the world are still using the same old tools that were used over hundred years ago. The advantages and limitations of each of the available techniques for diagnosing active tuberculosis, latent tuberculosis infection and evaluating drug resistance presented in the article. However no tool is yet available to be cheap, simple and the most specific and accurate at the same time. Thus, inadequacy of evaluation leaves many patients undiagnosed and leads to the further burden of the problem of tuberculosis prevalence.

Key words: tuberculosis, evaluations methods, diagnostics.

Список лератури (28 джерел) в редакції