

Н. В. Яцкевич, Л. К. Суркова

**ОЦЕНКА КОМПЛЕКСНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И УСКОРЕННОГО
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЙ
В ДИАГНОСТИКЕ РИФАМПИЦИН-УСТОЙЧИВОГО ТУБЕРКУЛЕЗА**

ГУ «РНПЦ пульмонологии и фтизиатрии»

Рифампицин-устойчивый туберкулез/мультирезистентный туберкулез (РУ-ТБ/МЛУ-ТБ) является серьезной проблемой здравоохранения в Республике Беларусь. Использование новых молекулярно-генетических и бактериологических технологий необходимо для своевременной диагностики и начала лечения пациентов с РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, что будет способствовать повышению эффективности лечения этих пациентов.

Ключевые слова: *рифампицин-устойчивый туберкулез, молекулярно-генетические, ускоренное бактериологическое исследования.*

N. V. Yatskevich, L. K. Surcova

ASSESSMENT OF COMPLEX USE OF MOLECULAR-GENETIC AND ACCELERATED BACTERIOLOGICAL INVESTIGATIONS IN DIAGNOSTICS OF RIFAMPICIN-RESISTANT TUBERCULOSIS

Rifampicin-resistant tuberculosis/multidrug-resistant tuberculosis (RR-TB/MDR-TB) is a serious health care problem in the Republic of Belarus. The use of new molecular genetic and bacteriological technologies is necessary for timely diagnostics and treatment of patients with RR-TB/MDR-TB, and will improve the effectiveness of these patients treatment.

Key words: rifampicin-resistant tuberculosis, molecular-genetic, accelerated bacteriological investigations.

Необходимость совершенствования лабораторной диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза на основе использования новейших молекулярно-генетических и бактериологических технологий, а так же оценки их диагностической значимости обусловлена высоким уровнем распространенности рифампицин-устойчивого туберкулеза/мультирезистентного туберкулеза (РУ-ТБ/МЛУ-ТБ) в республике, возникновением штаммов *M.tuberculosis* (МБТ) с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) [2]. Уровень РУ-ТБ/МЛУ-ТБ в Республике Беларусь среди впервые выявленных пациентов в 2015 году составил 37,0%, а среди ранее проходивших лечение пациентов – 69,0%. Только 54% пациентов, которым в 2012 году был установлен диагноз МЛУ-ТБ, были успешно пролечены [1]. Своевременная диагностика и начало адекватного лечения необходимы для повышения эффективности лечения.

Цель работы: провести оценку диагностической значимости комплексного использования молекулярно-генетических и ускоренного бактериологического исследований в диагностике РУ-ТБ/МЛУ-ТБ.

Материал и методы. Проведено обследование 200 пациентов, 66 женщин, 134 мужчин (в возрасте 40,9±6,8 лет) с туберкулезом легких, подтвержденным наличием бактериовыделения, с повышенным риском развития РУ-ТБ/МЛУ-ТБ.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Туберкулез легких у пациента, у которого установлен контакт с пациентом с РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, в том числе при необходимости начала повторного лечения после неэффективного курса терапии.

2. Туберкулез в сочетании с ВИЧ.

3. Рецидив туберкулеза.

4. Положительный результат посева мокроты пациента при подозрении на развитие у него РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, но не ранее чем в конце второго месяца лечения лекарственно-чувствительного туберкулеза.

У всех пациентов проведена микроскопия мокроты с окраской по Цилю-Нильсену, культуральное исследование мокроты с использованием плотной питательной среды, ускоренное бактериологическое исследование мокроты с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT. Молекулярно-генетическое исследование мокроты методом гибридизации с ДНК зондами (LPA) с использованием тест-систем, позволяющих определить устойчивость МБТ к противотуберкулезным лекарственным средствам (ПТАС) первого и второго

ряда (GenoTypeMTBDRplus, GenoTypeMTBDRsl v.2) проведено у 170, молекулярно-генетическим тестом, позволяющим обнаружить ДНК МБТ и определить устойчивость МБТ к рифампицину (XpertMTB/Rif) – у 195 пациентов.

Для оценки эффективности комплекса методов были сформированы 6 групп.

Основную группу 1 (ОГ1) составили 90 пациентов, у которых при микроскопии мокроты с окраской по Цилю-Нильсену не были выявлены кислотоустойчивые бактерии (КУБ «-») и все исследования (микроскопия, бактериологические, молекулярно-генетические исследования) были проведены из одного образца мокроты.

Основную группу 2 (ОГ2) составили 15 пациентов с КУБ «-», у которых все исследования были проведены из разных образцов мокроты.

Основную группу 3 (ОГ3) составили 43, у которых при микроскопии мокроты КУБ были выявлены (КУБ «+») и все исследования были проведены из одного образца мокроты.

Основную группу 4 (ОГ4) составили 22 пациента с КУБ «+», у которых все исследования были проведены из разных образцов мокроты.

Контрольную группу 1 (КГ1) составили 20 пациентов с КУБ «-», КГ2 – 10 пациентов с КУБ «+». У пациентов контрольных групп не проведено молекулярно-генетическое исследование методом гибридизации с ДНК зондами с использованием тест-систем, позволяющих определить устойчивость МБТ к ПТАС первого и второго ряда.

Статистическая обработка материала исследования выполнялась на персональном компьютере с помощью пакета Statistica for Windows 10, USA.

Количественные показатели представлены в виде среднего значения, стандартной ошибки среднего значения ($M \pm m$). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$), где p – достигнутый уровень значимости. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывалось абсолютное число, относительная величина в процентах, 95% доверительный интервал (ДИ).

Достоверность различий исследуемых числовых показателей и качественных показателей проверяли при помощи критерия Манна-Уитни и Уэлд-Вольфовица. Для проверки достоверности различий частот между двумя независимыми группами использовали χ^2 Пирсона (при наличии частот от 0 до 5 применялась поправка Йетса).

Результаты и обсуждение

Проведена оценка эффективности сочетанного применения разных методов исследования и каждого метода в отдельности при проведении диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ.

Сроки выявления МБТ у обследованных пациентов при использовании комплекса методов и каждого метода в отдельности представлены в таблице 1.

При использовании комплекса методов у пациентов ОГЗ (с КУБ «+») срок выявления МБТ составил $1,12 \pm 0,07$ день, по сравнению с $11,74 \pm 1,39$ днями у пациентов ОГ1 (с КУБ «-») ($Z = 3,78, p < 0,01$).

У пациентов ОГ1, ОГ2, КГ1 (с КУБ «-») (суммарно) чувствительность выявления ДНК МБТ с использованием теста XpertMTB/Rif была низкой и составила 57,6%. У пациентов ОГЗ, ОГ4, КГ2 (с КУБ «+»), по сравнению с пациентами с КУБ «-» в мокроте чувстви-

Таблица 1. Сроки выявления МБТ у обследованных пациентов при сочетанном применении разных методов исследования и при использовании каждого метода в отдельности, среднее ± стандартная ошибка среднего

Результаты исследований Группы	Плотная среда	Bactec	LPA	XpertMTB/ Rif	Сочетание XpertMTB/Rif + LPA+ Bactec	$Z_{1-2}; P_{1-2}$	$Z_{1-3}; P_{1-3}$	$Z_{1-4}; P_{1-4}$	$Z_{1-5}; P_{1-5}$
	1	2	3	4	5				
Количество пациентов ОГ1 (n = 90)	79	79	87	51	90	3,34; <0,01	2,44; <0,01	5,55; <0,01	5,47; <0,01
1 Длительность исследований в ОГ1, (M±m), дни	$36,24 \pm 1,14$	$22,95 \pm 1,01$	$25,82 \pm 1,32$	$1,0 \pm 0,01$	$11,74 \pm 1,39$				
Количество пациентов ОГ2 (n = 15)	15	15	15	10	15	3,23; <0,01	2,28; <0,05	4,16; <0,01	4,06; <0,01
2 Длительность исследований в ОГ2, (M±m), дни	$32,47 \pm 1,98$	$22,27 \pm 1,83$	$24,80 \pm 2,22$	$1,0 \pm 0,01$	$8,47 \pm 3,03$				
Количество пациентов КГ1 (n = 20)	14	11	-	11	-	2,29; <0,05	-	4,10; <0,01	-
3 Длительность исследований в КГ1, (M±m), дни	$36,36 \pm 3,09$	$26,45 \pm 3,25$	-	$1,0 \pm 0,01$	-				
Количество пациентов ОГ3 (n = 43)	36	40	40	40	43	5,57; <0,01	7,34; <0,01	7,29; <0,01	7,41; <0,01
4 Длительность исследований в ОГ3, (M±m), дни	$23,14 \pm 0,82$	$12,58 \pm 0,98$	$5,25 \pm 0,49$	$1,0 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,07$				
Количество пациентов ОГ4 (n = 22)	22	20	22	20	22	3,77; <0,01	4,45; <0,01	5,38; <0,01	5,33; <0,01
5 Длительность исследований в ОГ4, (M±m), дни	$25,41 \pm 1,80$	$16,45 \pm 2,60$	$10,14 \pm 1,79$	$1,0 \pm 0,01$	$3,23 \pm 1,29$				
Количество пациентов КГ2 (n = 10)	10	9	-	10	-	3,23; <0,01	-	3,78; <0,01	-
6 Длительность исследований в КГ2, (M±m), дни	$25,80 \pm 2,04$	$11,89 \pm 1,95$	-	$1,0 \pm 0,01$	-				
$Z_{1-4}; P_{1-4}$	5,33; <0,01	6,01; <0,01	7,40; <0,01	0; >0,01	3,78; <0,01				

Проведение исследования мокроты с использованием комплекса методов у пациентов ОГ1 (с КУБ «-») позволило сократить срок установления диагноза туберкулеза на 24,5 дня (в 3,09 раза) до $11,74 \pm 1,39$ дней, в сравнении с $36,24 \pm 1,14$ днями при проведении исследования традиционным культуральным методом ($Z = 5,47, p < 0,01$), повысить эффективность диагностики туберкулеза на 12,3% ($\chi^2 = 9,7, p < 0,01$).

Использование комплекса методов в ОГЗ (с КУБ «+») позволило сократить сроки выявления МБТ на 22,02 дня (в 20,66 раза) до $1,12 \pm 0,07$ дня, в сравнении с $23,14 \pm 0,82$ днями при проведении исследования традиционным культуральным методом ($Z = 7,41, p < 0,01$), повысить эффективность диагностики на 16,3% (в 1,19 раза) ($\chi^2 = 5,6, p < 0,05$).

Чувствительность выявления ДНК МБТ с использованием молекулярно-генетического теста XpertMTB/Rif, была выше на 35,7% (в 1,62 раза) и составила 93,3% ($\chi^2 = 29,07, p < 0,01$).

Проведение исследования мокроты с использованием молекулярно-генетического исследования LPA и ускоренного бактериологического исследования у пациентов ОГ1 (с КУБ «-») позволило сократить срок проведения ТЛЧ МБТ к ПТАС первого и второго ряда на 36,69 дней (в 2,42 раза) до $25,85 \pm 1,31$ дней, в сравнении с $62,54 \pm 1,20$ днями при проведении исследования традиционным культуральным методом ($Z = 2,18, p < 0,01$), повысить эффективность диагностики на 13,4% (в 1,16 раза) ($\chi^2 = 8,3, p < 0,01$) (таблица 2, 3).

Таблица 2. Сроки получения результатов ТЛЧ к ПТАС первого и второго рядов у пациентов исследуемых групп при сочетанном применении разных методов исследования и при использовании каждого метода в отдельности, среднее ± стандартная ошибка среднего

Результаты исследований Группы	Плотная среда (ТЛЧ)	Vactec (ТЛЧ)	Сочетание ТЛЧ плотная + Vactec	LPA	Сочетание LPA + ТЛЧ Vactec	Сочетание ТЛЧ плотная + Vactec + LPA	P _{1-2,3}	P _{1,2,3-4,5,6}
	1	2	3	4	5	6		
Количество пациентов	76	69	84	87	88	88		
1 Длительность исследований в ОГ1, (M±m), дни (n = 90)	62,54 ±1,20	42,26± 1,25	45,89± 1,46	25,82± 1,32	25,85±1,31	25,85± 1,31	<0,01	<0,01
Количество пациентов	15	14	15	15	15	15		
2 Длительность исследований в ОГ2, (M±m), дни (n = 15)	59,13± 1,91	38,79± 2,27	40,07± 2,49	24,80± 2,22	24,67±2,20	24,67±2,20	<0,01	<0,01
Количество пациентов	14	11	15	-	-	-	<0,01	-
3 Длительность исследований в КГ1, (M±m), дни (n = 20)	64,57 ±2,91	44,45± 4,01	51,73± 4,76	-	-	-		
Количество пациентов	36	37	43	40	42	43		
4 Длительность исследований в ОГ3, (M±m), дни (n = 43)	49,89 ±0,77	26,54±1,37	29,77±1,72	5,25±0,49	6,67±1,09	7,74±1,52	<0,01	<0,01
Количество пациентов	22	19	22	22	22	22		
5 Длительность исследований в ОГ4, (M±m), дни (n = 22)	51,36± 1,93	35,16± 3,58	36,64± 3,22	10,14± 1,79	10,14± 1,79	10,14±1,79	<0,01	<0,01
Количество пациентов	10	9	10	-	-	-	<0,01	-
6 Длительность исследований в КГ2, (M±m), дни (n = 10)	53,70± 2,16	23,22± 2,70	26,50± 4,07	-	-	-		
Z ₁₋₄ ; P ₁₋₄	5,20; <0,01	3,69; <0,01	3,96; <0,01	7,40; <0,01	6,42; <0,01	6,13; <0,01		

Использование молекулярно-генетического исследования методом гибридизации с ДНК зондами и ускоренного бактериологического исследования в ОГ3 позволило сократить срок проведения ТЛЧ МБТ к ПТАС первого и второго ряда на 43,22 дня (в 7,48 раза) ($Z = 6,91$, $p < 0,01$), до $6,67 \pm 1,09$ дней, в сравнении с $49,89 \pm 0,77$ днями при проведении исследования традиционным культуральным методом, повысить эффективность диагностики на 14,0% (в 1,17 раза) ($\chi^2 = 4,96$, $p < 0,05$) (таблица 2, 3).

Таким образом, применение комплекса методов у пациентов с КУБ «-» и КУБ «+» позволило назначить адекватную схему лечения на 36,69 дней ($Z = 2,18$, $p < 0,01$) и 43,22 дня ($Z = 6,91$, $p < 0,01$) (соответственно) раньше, чем при использовании традиционного культурального исследования с использованием плотной питательной среды.

У пациентов ОГ3 (с КУБ «+») срок проведения ТЛЧ МБТ к ПТАС первого и второго ряда составил $6,67 \pm 1,09$ дней, по сравнению с $25,85 \pm 1,31$ днями у пациентов ОГ1 (с КУБ «-») ($Z = 6,42$, $p < 0,01$) (таблица 3).

При проведении ТЛЧ МБТ к ПТАС с сочетанным применением молекулярно-генетических и ускоренного бактериологического методов диагностическая значимость исследований была значительно выше по сравнению с каждым из методов в отдельности ($p < 0,05$) и была выше эффективности традиционного бактериологического метода (100,0% по сравнению с 87,6% соответственно (на 12,4%, в 1,14 раза) ($\chi^2 = 22,30$, $p < 0,01$).

Проведена сравнительная оценка сроков диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ, сроков прекращения бактериовыделения у обследованных пациентов при применении комплекса молекулярно-генетических и ускоренного бактериологического исследований в сравнении с традиционным бактериологическим исследованием (таблица 4, 5).

Как видно из таблицы 4, у пациентов ОГ1 (с КУБ «-»), у которых был применен комплекс методов, по сравнению с пациентами контрольной группы сроки получения ТЛЧ к ПТАС первого и второго ряда, прекращения бактериовыделения были короче на 36,71 и 29,09 дней, соответственно (в 1,92 и 1,68 раза) ($Z = 3,91$, $P < 0,01$ и $Z = 2,0$, $P < 0,05$).

Как видно из таблицы 5, у пациентов ОГ3 (с КУБ «+»), по сравнению с пациентами контрольной группы сроки получения ТЛЧ к ПТАС первого и второго ряда, прекращения бактериовыделения были короче на 18,56 и 243,79 дня соответственно (в 2,62 и 3,48 раза) ($Z = 2,40$, $p < 0,05$ и $Z = 2,38$, $p < 0,05$).

Следовательно, одновременное применение комплекса методов позволяет сократить срок лечения в стационаре пациентов с РУ-ТБ/МЛУ-ТБ с КУБ «-» и КУБ «+» (в связи с абацилированием) на 29,09 дней ($Z = 2,0$, $p < 0,05$) и 243,79 дня ($Z = 2,38$, $p < 0,05$) (соответственно).

Таким образом, одновременное использование комплекса молекулярно-генетических и ускоренного бактериологического методов позволяет повысить эффективность диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ по сравнению с традиционным культуральным методом исследова-

Таблица 3. Диагностическая значимость сочетанного применения разных методов исследования и каждого метода в отдельности в диагностике РУ-ТБ/МЛУ-ТБ у пациентов исследуемых групп

Группы	Результаты исследований	КУБ+	Плотная среда (ТЛЧ)	Bactesc (ТЛЧ)	ХерптМТВ/ Rif	LPA	Сочетание LPA + ТЛЧ Bactesc		ХерптМТВ/ Rif + LPA + ТЛЧ Bactesc	X ² , P ₁₋₂	X ² , P ₂₋₄	X ² , P ₂₋₅	X ² , P ₂₋₆	X ² , P ₂₋₇	X ² , P ₃₋₇	X ² , P ₄₋₇	X ² , P ₅₋₇
							6	7									
1	Количество пациентов ОГ1, абс. (n = 90) %, (95% ДИ)	0 (0-0)	76 (75,3-91,2)	69 (66,6-84,9)	50 (44,7-66,0)	87 (90,6-99,3)	88 (92,2-99,7)	90 (100,0-100,0)	128,1; <0,01	17,88; <0,01	6,5; <0,05	8,3; <0,01	13,1; <0,01	21,6; <0,01	48,9; <0,01	1,4; >0,05	
2	Количество пациентов ОГ2, абс. (n = 15) %, (95% ДИ)	0 (0-0)	15 (100,0-100,0)	14 (68,1-99,8)	10 (38,4-88,2)	15 (100,0-100,0)	15 (100,0-100,0)	15 (100,0-100,0)	26,1; <0,01	3,8; <0,05	0; >0,05	0; >0,05	0; >0,05	0; >0,05	3,8; <0,05	0; >0,05	
3	Количество пациентов КГ1, абс. (n = 20) %, (95% ДИ)	0 (0-0)	14 (45,7-88,1)	11 (31,5-76,9)	10 (27,2-72,8)	-	-	-	17,4; <0,01	1,2; >0,05	-	-	-	-	-	-	
4	Количество пациентов ОГ3, абс. (n = 43) %, (95% ДИ)	43 (100,0-100,0)	36 (69,3-93,2)	37 (72,7-96,4)	40 (80,9-98,5)	40 (80,9-98,5)	42 (87,7-99,9)	43 (100,0-100,0)	5,6; <0,05	1,0; >0,05	1,0; >0,05	5,0; <0,05	5,6; <0,05	4,5; <0,05	1,4; >0,05	1,4; >0,05	
5	Количество пациентов ОГ4, абс. (n = 22) %, (95% ДИ)	22 (100,0-100,0)	22 (100,0-100,0)	19 (65,1-97,1)	18 (59,7-94,8)	22 (100,0-100,0)	22 (100,0-100,0)	22 (100,0-100,0)	0; >0,05	2,5; >0,05	0; >0,05	0; >0,05	0; >0,05	0; >0,05	1,4; >0,05	2,5; >0,05	
6	Количество пациентов КГ2, абс. (n = 10) %, (95% ДИ)	10 (100,0-100,0)	10 (100,0-100,0)	9 (55,5-99,8)	10 (100,0-100,0)	-	-	-	0; >0,05	0; >0,05	-	-	-	-	-	-	
X ² · P ₁₋₄		128,5; <0,01	>0,05	>0,05	17,0; <0,01	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	

Таблица 4. Результаты диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ у пациентов с КУБ «-»

Показатели	Сроки установления диагноза РУ-ТБ с момента обращения за медицинской помощью		Сроки получения ТЛЧ к ППАС первого и второго ряда с момента обращения за медицинской помощью		Сроки прекращения бактериовыделения с момента начала лечения	
	M±m	Медиана	M±m	Медиана	M±m	Медиана
1 ОГ1	25,42±2,66	23,50	39,85±2,24	35,0	42,71±5,04	22,0
2 ОГ2	23,53±5,76	16,0	36,80±3,45	33,0	44,36±12,0	33,0
3 КГ1	41,90±7,90	51,0	76,56±10,79	70,0	71,80±21,22	34,5
Z ₁₋₃ · P ₁₋₃	Z ₁₋₃ = 2,44, P ₁₋₃ <0,05		Z ₁₋₃ = 3,91, P ₁₋₃ <0,01		Z ₁₋₃ = 2,0, P ₁₋₃ <0,05	
Z ₂₋₃ · P ₂₋₃	P ₁₋₂ > 0,05		Z ₂₋₃ = 3,35, P ₁₋₃ <0,01		P ₁₋₂ > 0,05	

Таблица 5. Результаты диагностики РУ-ТБ/МЛУ-ТБ у пациентов с КУБ «+»

Показатели / Группы	Сроки установления диагноза РУ-ТБ с момента обращения за медицинской помощью		Сроки получения ТЛЧ к ПТАС первого и второго ряда с момента обращения за медицинской помощью		Сроки прекращения бактериовыделения с момента начала лечения	
	М±m	Медиана	М ±m	Медиана	М ±m	Медиана
1 ОГЗ	1,91±0,53	0	11,44±1,72	7,0	98,11±18,19	61,0
2 ОГ4	8,95±3,18	2,0	18,82±3,19	14,0	165,93±49,64	88,0
3 КГ2	2,80±1,84	1,0	30,0±4,70	23,50	341,90±78,47	314,0
$P_{1-3} > 0,05$		$Z_{1-3} = 2,40, P_{1-3} < 0,05$		$Z_{1-3} = 2,38, P_{1-3} < 0,05$		
$P_{2-3} > 0,05$		$P_{2-3} > 0,05$		$P_{2-3} > 0,05$		

ния мокроты на 12,4% ($\chi^2 = 22,30, p < 0,01$), назначить адекватную схему лечения пациентам с КУБ «-» и КУБ «+» на 36,69 дней ($Z = 2,18, p < 0,01$) и 43,22 дня ($Z = 6,91, p < 0,01$) (соответственно) раньше, повысить эффективность лечения и сократить срок лечения в стационаре (в связи с абацилированием) пациентов с КУБ «-» и КУБ «+» на 29,09 дней ($Z = 2,0, p < 0,05$) и 243,79 дня ($Z = 2,38, p < 0,05$) (соответственно).

Литература

1. Гуревич, Г. Л., Скрягина Е. М. Клиническое руководство по диагностике и лечению туберкулеза и его лекарственно-устойчивых форм. – Минск, 2017. – 139 с.
2. Гуревич, Г. Л. Современные аспекты туберкулеза в Республике Беларусь / Е. М. Скрягина, [и др.] // Материалы международной научно-практической конференции «ВИЧ-ассоциированный туберкулез: эпидемиологические, клинические и социальные аспекты». – Гродно, 2015. – С. 18–20.

Поступила 16.10.2017 г.