

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Соколова Т.Н.

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С. И. Гельберга

Актуальность. Туберкулез был и остается основной глобальной проблемой общественного здравоохранения с незапамятных времен. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) это заболевание является одной из 10 ведущих причин смерти в мире. В 2015 г. туберкулезом заболели 10,4 миллиона человек, и 1,8 миллиона человек (в том числе 0,4 миллиона человек с ВИЧ) умерли от этой болезни. Причины для такого стойкого сохранения этого заболевания на планете много, но одной из них является достаточно трудная диагностика этого заболевания. Для предупреждения распространения туберкулеза и его успешного лечения необходимо раннее его выявление. Клинические методы диагностики могут приводить к несвоевременной постановке диагноза и как следствие появлению резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* и повышенной смертности. Технический прогресс в области инструментальных методов привел к улучшению диагностики, прежде всего, туберкулеза легких, расширился круг методов доступных для клинической лабораторной диагностики.

Цель. Определить круг доступных методов лабораторной диагностики туберкулеза существующих на современном этапе и оценить достоинства и недостатки их при использовании в диагностике.

Материалы и методы исследования. Для исследования применяемых в настоящее время методов диагностики туберкулеза был проведен обзор современной литературы по данной тематике и осуществлен его анализ.

Результаты. Все методы лабораторной диагностики туберкулеза можно поделить на прямые и косвенные.

К прямым относят способы, позволяющие обнаружить непосредственно микобактерии и продукты их жизнедеятельности. Это прежде всего микроскопия и окрашивание ткани и мокроты. Для окрашивания используют метод по Цилю-Нильсену, который позволяет обнаружить кислотоустойчивые микобактерии. Это простой, дешевый и быстрый способ, однако выявление микроорганизмов возможно, при наличии более 10^6 клеток бактерий в грамме ткани или мокроты, что снижает возможность, диагностировать заболевание в

0-40% случаях [1, 2]. Еще к прямому методу относятся ультрафиолетовая микроскопия мазков центрифугата образцов, окрашенных флуорохромом. Чувствительность такой микроскопии выше на 10% в сравнении с окрашиванием по Цилю-Нильсену, и она также не позволяет обнаруживать устойчивость микобактерий к лекарственным препаратам.

Культуральный метод диагностики микобактерий из клинических образцов является «золотым стандартом» для окончательного диагноза туберкулеза. Он гораздо более чувствительный, поскольку позволяет обнаружить меньшее количество микобактерий 10-100 клеток/мл концентрированного материала. Вместе с тем, культивирование на твердых питательных средах занимает много времени (2-6 недель). Различные модификации культивирования на жидких питательных средах и использование системы ВАСТЕС, сокращают время и результативность диагностики, позволяя на 10% больше обнаружение, чем на твердых средах. Дополнительные технологии с использованием радиометрической и флуоресцентной индикацией роста микобактерий (The Septicheck AFB method) также способствуют раннему их выявлению, и установлению чувствительности к лекарственным препаратам. Тем не менее, высокая стоимость и необходимость безопасной утилизации радиоактивных отходов, исключает использование этих методов в периферийных лабораториях.

Быстрые иммунохроматографические анализы (so-called strip speciation tests) – так называемые полосы видообразования тесты, молекулярные тесты, а также биохимические методы рекомендуются для определения видов в короткий промежуток времени. Однако эти системы не используются автономно, а лишь в сочетании с культивированием микроорганизмов на твердых средах, и поэтому не сильно ускоряют процесс диагностики.

Молекулярно-генетические методы диагностики ДНК бактерий, такие как ПЦР, привели к разработке тестов с высокой положительной прогностической возможностью обнаружения до 98-99% случаев раннего туберкулеза из различных клинических образцов. Преимущества метода амплификации над культуральным, это, прежде всего, высокая чувствительность всего лишь 1-10 микроорганизмов в исследуемом материале, возможность обнаружить в длительно хранимых клинических образцах и обеспечивает этиологическую диагностику в короткий промежуток времени 6-8 часа. Недостатком этого метода является высокая чувствительность к загрязнению образцов другими ДНК, генерируя высокий уровень ложноположительных результатов. Кроме того, не определяется различие между жизнеспособными и мертвыми микроорганизмами.

Еще один метод молекулярно-амплификации является использование бактериофагов. Генетически сконструированный *Mycobacteriophage* был использован для обнаружения жизнеспособных *M. tuberculosis* непосредственно в клинических образцах. PhageTek MB представляет собой недорогой тест, но имеет низкую чувствительность и специфичность.

К прямым методам диагностики туберкулеза можно отнести иммунологические методы обнаружения антигенов микобактерий – иммуногистохимический (ИНС), иммуноцитохимический (ИСС) и иммунофлуоресцентный (ИФ). Эти методы позволяют обнаружить небелковые антигены клеточной стенки микобактерий в различных исследуемых образцах организма, при минимальной их концентрации 3-20 нг/мл. В данном случае необходимо взятие биопсии и предварительная специальная обработка образца. Крупным недостатком этих методов является то, что для биологических жидкостей они мало чувствительны и требуют дальнейшего усовершенствования.

В косвенным методам диагностики туберкулеза относят: гистологический метод обнаружения в тканях специфических клеток Ланханза, цитологическое исследование аспирационной жидкости (*fine needle aspiration cytology (FNAC)*), обнаружение антител в сыворотке крови и клеточные методы диагностики *in vivo* и *in vitro*.

Надо сказать, что современные иммунологические методы для выявления антигенов с использованием моноклональных антител, при использовании на практике показали пока низкую специфичность и в настоящее время не рекомендованы для широкого использования.

Клеточные методы диагностики *in vivo* и *in vitro* используются давно и достаточно успешно. К кожно-аллергическим методам относят пробу Манту и диаскин-тест. Проба Манту проводится для обнаружения ГЗТ и через 48-72 ч после введения туберкулина позволяет предположить активный туберкулез, перенесенную инфекцию, вакцинацию БЦЖ, или повышение чувствительности к микобактериям окружающей среде. Первым препаратом, использованным для диагностики, был туберкулин Коха, представляющий собой фильтрат культуры микобактерий туберкулеза. В последние годы широкое применение нашла новая кожно-аллергическая проба – диаскин-тест. Для этого диагностического теста используется аллерген туберкулезный рекомбинантный, который содержит два рекомбинантных белка ESAT-6 и CFP-10, продуцируемых *Escherichia coli* BL21(DE3)/pCFP-ESAT. В то же время, отмечаются низкие показатели специфичности этих методов, возможность появления отрицательных результатов кожной реакции при тяжелом течении и терминальной стадии заболевания [3].

Клеточные методы *in vitro* для диагностики туберкулеза включают в себя прежде всего, получившие широкое распространение, пробы крови (IGRA). Наиболее используемыми из них являются квантифероновый тест и тест T-SPOT. Квантифероновый тест (QuantiFERON-TB Gold In-Tube, QFT-G) основан на применении твердофазного иммуносорбентного анализа для определения уровня интерферона INF- γ , высвобождаемого сенсibilизированными Т-клетками, стимулированными *in vitro* специфическими АГ (чаще ESAT-6 и CFP-10 и TB7.7). Тесты IGRA отличаются высокой специфичностью и относительно высокой. Вместе с тем, такие тесты не позволяют дифференцировать активные и латентные формы туберкулеза, а их высокая стоимость ограничивает применение IGRA в странах с низким и средним уровнем развития.

В настоящее время в качестве потенциальных биомаркеров рассматривают IL-17, хемокин IP-10 и соотношение IFN- γ /TNF- α . Перспективно обнаружение активности аденозин дезаминазы (ADA) – фермента участвующего в дифференцировке клеток иммунной системы в организме человека при взаимодействии с микобактериями. ADA, как представляется, является полезным тестом для ранней диагностики туберкулеза в эндемичных и бедных районах.

Выводы. Все методы специфической диагностики туберкулеза имеют как преимущества, так и недостатки, в связи с чем, данные тесты должны использоваться в зависимости от цели исследования, возраста пациента, наличия у него сопутствующих заболеваний и других факторов риска, а также с учетом их результатов и данных о степени диагностической значимости и чувствительности.

Литература

1. Angeby, K. A., Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay./ Angeby K. A., L. Klintz, S. E. Hoffner J. // Clin. Microbiol. – 2002. –V. 40. – P. 553-555.
2. Aranaz, A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain / A. Aranaz et al. // J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 49. – P.1263-1273.
3. Starke, J., Interferon- γ Release Assays for Diagnosis of Tuberculosis Infection and Disease in Children // J. Starke. Pediatrics. –2014. – № 6, V. 134 – P. 1763-1773.