

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ БЦЖ

А. С. ПОЗДНЯКОВА¹, М. В. АЛЬВАРЕС ФИГЕРОА², Л. К. СУРКОВА², Е. А. ДОЛГОВА³

THE CURRENT ASPECTS OF DIAGNOSIS AND DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF COMPLICATIONS AFTER BCG VACCINATION

A. S. POZDNYAKOVA¹, M. V. ALVARES FIGEROA², L. K. SURKOVA², E. A. DOLGOVA³

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования,

²НИИ пульмонологии и фтизиатрии, г. Минск,

³Центральный НИИ эпидемиологии, г. Москва

Изучена возможность верификации диагноза БЦЖ-осложнений с использованием молекулярно-генетических методов – метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования. Использование ПЦР позволило установить принадлежность микобактерий туберкулёза к штамму *M. bovis* BCG и увеличить выявляемость микобактерий туберкулёза на 38% по сравнению с традиционными микробиологическими методами, что даёт возможность рекомендовать метод для верификации диагноза БЦЖ-осложнений.

Ключевые слова: БЦЖ-осложнения, *M. bovis* BCG, микобактерии туберкулёза, Real-Time PCR.

Whether the diagnosis of BCG complications might be verified by molecular genetic methods, such as polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, was studied. PCR could identify *Mycobacterium tuberculosis* as *M. bovis* strain BCG and increase the detection rate of *M. tuberculosis* by 38% as compared with traditional microbiological assays, which provides a means of recommending the method to verify the diagnosis of BCG complications.

Key words: BCG complications, *M. bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis*, real-time polymerase chain reaction.

Противотуберкулёзную вакцинацию, считающуюся одной из наиболее важных мер по предупреждению развития тяжёлых форм заболевания туберкулёзом, проводят с целью создания специфического иммунитета к туберкулёзной инфекции [1, 3]. При правильном подходе к её проведению у 95% вакцинированных детей развивается местная реакция с формированием постпрививочного рубчика. Осложнениями на вакцинацию БЦЖ являются регионарные лимфадениты, холодные абсцессы, БЦЖ-оститы и более тяжёлые поражения вплоть до летальных исходов. Диагностику осложнений после вакцинации БЦЖ затруднительно, так как клинико-рентгенологически имеется много признаков, схожих с туберкулёзным поражением [2, 3, 8]. При использовании культурального метода выросшую культуру с помощью биохимических тестов и роста на селективных питательных средах дифференцируют на предмет её принадлежности к микобактериям туберкулёза (МБТ), а также к человеческому (*M. tuberculosis*) или к бычьему (*M. bovis*) видам. Вместе с тем культуральный метод не позволяет дифференцировать *M. bovis* от *M. bovis* BCG, т. е. патогенные штаммы МБТ от аттенуированного. Другими недостатками данного метода диагностики являются длительный срок получения результатов исследования (6-15 нед.) и невысокая диагностическая чувствительность, позволяющая получить рост культуры не более чем в 50% случаев. Гистологическое исследова-

ние поражённых тканей не даёт возможности определить вид микобактерий, вызвавших специфическое туберкулёзное воспаление. Вместе с тем, идентификация вида микобактерий необходима для доказательной постановки диагноза и определения правильного подхода к проведению адекватных эпидемиологических и лечебных мероприятий. Все вышеизложенное делает актуальным изучение возможности верификации диагноза БЦЖ-осложнений с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Необходимость более широкого использования этого метода в практике активно обсуждается в литературе [2, 4-8].

Материалы и методы

Нами изучена возможность использования ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени (Real-Time PCR) для идентификации возбудителя у 21 ребёнка с периферическими лимфаденитами, поступившего для обследования и лечения в НИИ пульмонологии и фтизиатрии Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Для верификации диагноза использовали анамнестические, клинико-лабораторные и рентгеномографические данные, а также микробиологические и патоморфологические методы исследования резецированных лимфатических узлов. Real-Time PCR была проведена на образцах ткани подмышечных лимфатических

узлов, полученных при оперативных вмешательствах. Исследования проводили совместно с разработчиками набора реагентов «АмплиСенс® МТС-дифф-Fl» ФГУН ЦНИИ эпидемиологии (г. Москва) на приборе «iCycler Bio-Rad» (США). Диагностический набор позволяет дифференцировать МБТ до вида *M. tuberculosis*, *M. bovis* или *M. bovis* BCG. При этом сопоставляли результаты идентификации вида микобактерий в резекционном материале лимфатических узлов детей, полученных методом Real-Time PCR, с культуральным методом, выполненным на автоматическом анализаторе Vastec™ MGIT 960. В качестве референс-метода применяли прямое секвенирование ДНК исследуемых образцов.

Результаты и обсуждение

Возраст обследуемых детей составлял от 2 месяцев до 10 лет. Все дети были вакцинированы в роддоме вакциной БЦЖ. Ревакцинация БЦЖ проводилась 1 ребёнку в 7-летнем возрасте, у которого через 2 нед. после введения противотуберкулёзной вакцины был диагностирован левосторонний подмышечный лимфаденит БЦЖ-этиологии, учитывая связь с противотуберкулёзной вакцинацией. У 11 (52,3%) детей в возрасте до 1 года осложнения выявлялись в период от 2 до 6 мес. с момента противотуберкулёзной иммунизации, проявлялись развитием регионарных лимфаденитов с левосторонней подмышечной локализацией. Абсцедирование лимфатических узлов при этом было отмечено у 3 (27%) детей, что свидетельствовало о поздней диагностике и необходимости проведения оперативного лечения. Местный ответ на введённую вакцину у всех пациентов сопровождался развитием поствакцинального рубчика: размером до 4 мм – у 11 (52,3%) детей, размером 5-7 мм – у 8 (38%) детей, 1 ребёнок имел поствакцинальный рубчик 10 мм и на ревакцинацию БЦЖ у 1 ребёнка рубчик не сформировался. Постановку туберкулиновой пробы Манту детям в возрасте до 1 года не проводили, т. е. степень специфической сенсibilизации организма ребёнка при проведении дифференциальной диагностики туберкулёза с БЦЖ-осложнением не учитывали. У 10 (47,7%) детей в возрасте от 2 до 10 лет чаще отмечали нормергическую туберкулиновую реакцию, которая проявлялась папулой 10-14 мм у 6 (60%) детей, папулой 15 мм у одного пациента и 2 (20%) ребёнка имели гиперергическую туберкулиновую реакцию.

У 4 (40%) детей данной возрастной категории развитие лимфаденита происходило на фоне первичного инфицирования (виража туберкулиновой пробы), позднее развитие (спу-

стя 2 года с момента виража туберкулиновой пробы) – у 2 (20%) детей. При этом у 6 (60%) детей был установлен подмышечный лимфаденит в фазе обызвествления. Неактивный специфический процесс в периферических лимфатических узлах (обызвествление) был выявлен при рентгенологическом обследовании по поводу виража туберкулиновой пробы. Анализ причин развития осложнений после вакцинации БЦЖ позволил установить, что все дети в возрасте до года при рождении имели перинатальную патологию, 3 (27%) – были рождены путём кесарева сечения, 6 (60%) детей старшего возраста относились к категории часто длительно болеющих (ЧДБ) детей, 1 ребёнок перенёс пневмонию. Из семейного туберкулёзного очага (мама и бабушка пациента перенесли туберкулёз периферических лимфатических узлов) был один ребёнок.

По данным бактериоскопического исследования мазков-отпечатков резецированных лимфатических узлов, кислотоустойчивые микобактерии (КУМ) не обнаружены ни в одном случае. Культуральным методом с помощью автоматического анализатора в 6 (28,57%) из 21 исследованного образца лимфатических узлов были обнаружены МБТ, которые при пересеве на плотные питательные среды и последующем дифференцировании были идентифицированы как *M. bovis*. Все полученные культуры были чувствительны к противотуберкулёзным препаратам (тестирование на пипразинамид не проводили).

При гистологическом исследовании лимфатических узлов были обнаружены морфологические признаки туберкулёзного воспаления в виде эпителиоидно-клеточных гранулём с гигантскими многоядерными клетками типа Пирогова – Лангханса (рис. 1) или очагов казеозного некроза (рис. 2), у 6 детей – туберкулёзные очажки с признаками обызвествления (рис. 3). Во всех случаях обнаружения обызвествления очагов туберкулёзного воспаления в лимфатических узлах получены отрицательные результаты при исследовании резекционного материала на наличие МБТ культуральным методом. На основе комплексных анамнестических и клиничко-лабораторных данных 20 детям был поставлен диагноз левостороннего подмышечного лимфаденита БЦЖ-этиологии, а одному ребёнку – туберкулёз периферических лимфатических узлов (подмышечная группа слева).

Образцы тканей лимфоузлов были исследованы с помощью метода Real-Time PCR. Первоначальное тестирование с целью обнаружения ДНК МБТ проводили с помощью набора реагентов «АмплиСенс® МТС-Fl», аналитическая чувствительность которого при работе с

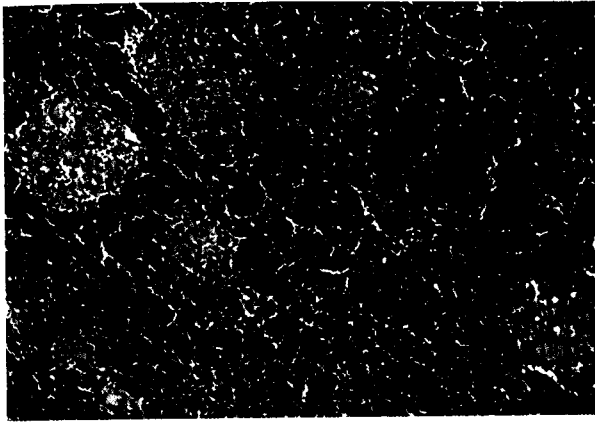


Рис. 1. Мелкие эпителиоидно-клеточные гранулёмы и скопления эпителиоидных клеток на фоне лимфоидно-ретикулярной гиперплазии

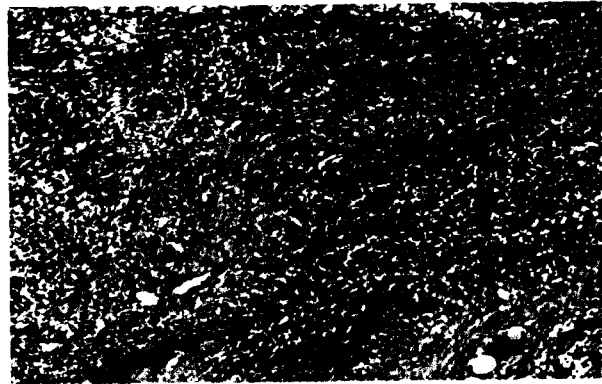


Рис. 2. Крупный очаг казеозного некроза. Казеоз инфильтрирован нейтрофильными лейкоцитами. Распространение туберкулёзного воспаления на окружающую ткань лимфатического узла

тканями составляет 10^2 м.т./мл. Было обнаружено 18 (85,71%) положительных образцов, которые в дальнейшем тестировали с помощью набора «АмплиСенс® МТС-дифф-Fl». Несмотря на меньшую чувствительность набора (5×10^2 м.т./мл), во всех образцах удалось провести дифференцирование, при этом в 17 образцах была выявлена ДНК *M. bovis* BCG. В материале, полученном от ребёнка с туберкулёзом периферических лимфоузлов, была выявлена ДНК *M. tuberculosis*, что подтвердило диагноз туберкулёза. При этом во всех образцах, в которых МБТ были обнаружены культуральным методом, методом Real-Time PCR также были получены положительные результаты. Для абсолютного доказательства правильности работы тест-системы «АмплиСенс® МТС-дифф-Fl» принадлежность обнаруженных микобактерий к тому или иному виду была подтверждена путём секвенирования образцов, в которых нагрузка ДНК была не менее чем 15 нг/мкл. Секвенирование проводили по альтернативным мишеням – регионам SepX3-RegX3 и OxyR. В результате при тестировании 14 образцов было получено 100%-ное совпадение результатов – в 13 случаях определёнными видами были *M. bovis* или *M. bovis* BCG (в зависимости от анализируе-

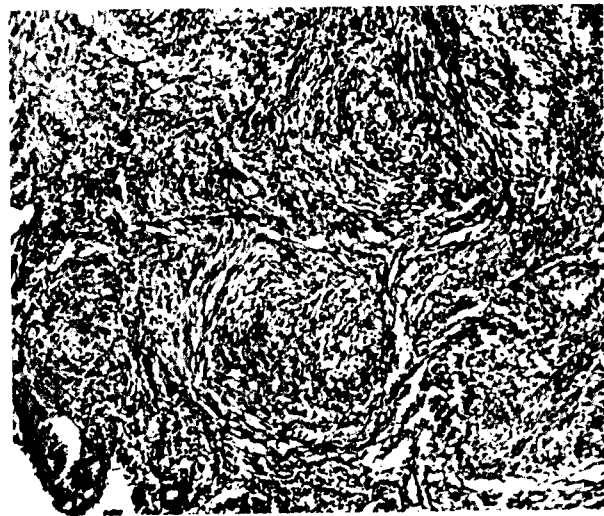


Рис. 3. Подмышечный лимфатический узел. Заживление туберкулёзных гранулём с фиброзированием

мой мишени), в 1 – *M. tuberculosis*. У 4 (19%) детей все использованные методы не позволили определить этиологический фактор лимфаденитов, при этом у одного из детей гистологически выявлено преобладание неспецифического воспаления (см. табл.).

Таблица

Результаты этиологической верификации диагноза лимфаденита

Число больных	Гистологическое подтверждение диагноза		Выделение МБТ культуральным методом		Видовая идентификация методом ПЦР			
					<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. bovis</i> BCG	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
21	15	71,43	6	28,57	1	4,76	17	80,95
				2			3	
21	15	71,43 ± 20,00	6	28,57 ± 20,00	18		85,71 ± 15,00	

Заключение

Таким образом, применение метода Real-Time PCR позволило однозначно определить этиологический фактор заболевания (установить при-

надлежность возбудителя к видам *M. bovis* BCG или *M. tuberculosis*) у 18 (85,71%) детей, повысить эффективность подтверждения этиологии заболевания как осложнения на вакцинацию БЦЖ на 57,14% по сравнению с культуральным мето-

дом, а также сократить время получения результата исследования, что даёт возможность рекомендовать метод для верификации диагноза осложнения после вакцинации БЦЖ.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Позднякова Анастасия Семёновна
Белорусская медицинская академия
последипломного образования,
кандидат медицинских наук,
доцент кафедры фтизиопульмонологии.
220714, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.
Факс: 231-20-45.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксёнова В. А., Гусева Е. М., Горовенко Л. И. Специфическая профилактика туберкулёза у детей и подростков и её перспективы в будущем // Туб. и экология. – 1997. – № 4. – С. 7-9.
2. Коваленко К. Н., Мушкин А. Ю., Ватутина В. В. и др. БЦЖ-оститы у детей // Пробл. туб. – 2004. – № 1. – С. 21-24.
3. Леви Д. Т., Аксёнова В. А., Закирова Н. Р. и др.

Вакцинация БЦЖ: характеристика препаратов и причины поствакцинальных осложнений // Пробл. туб. – 1999. – № 4. – С. 4-7.

4. Митинская Л. А. Новые технологии при профилактике, выявлении, диагностике и лечении туберкулёза у детей // Пробл. туб. – 2003. – № 1. – С. 19-25

5. Фирсова В. А., Полуэктова Ф. В., Кузьмин А. В., Черноусова Л. Н. Роль метода биологических микрочипов в определении устойчивости микобактерии туберкулёза к рифампицину у подростков с активным туберкулёзом лёгких // Пробл. туб. – 2006. – № 8. – С. 28-30.

6. Enkai S., Miyakawa T., Kondou S. et al. A case of disseminated BCG infection found during treatment of an infant with Crohn's disease // Kekkaku. – 2009. – Vol. 84, № 8. – P. 597-603.

7. Nikaido T., Ishibashi K., Otani K. et al. *Mycobacterium bovis* BCG Vertebral Osteomyelitis after Intravesical BCG Therapy, Diagnosed by PCR-Based Genomic Deletion Analysis // JCM. – 2007. – Vol. 45, № 12. – P. 4085-4087.

8. Okazaki T., Ebihara S., Takahashi H. et al. Multiplex PCR-Identified Cutaneous Tuberculosis Evoked by *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination in a Healthy Baby // JCM. – 2005. – Vol. 43, № 1. – P. 523-525.

Поступила 01.02.2010