

РЕЗУЛЬТАТЫ ГОСУДАРСТВЕННЫХ ИСПЫТАНИЙ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ «АМПЛИСЕНС® МБТ» ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Альварес Фигероа М.В., Леви Д.Т., Рухамина М.Л., Волкова Р.А.

Эльберт Е.В., Скотникова О.И., Шипулин Г.А.

4-й Центральный военный клинический туберкулезный госпиталь МО РФ

*Государственный НИИ стандартизации и контроля медицинских
и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича*

Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом

Центральный НИИ эпидемиологии МЗ РФ

Преимуществами применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике туберкулеза, по сравнению с традиционными микробиологическими методами, являются ее высокая чувствительность и специфичность, быстрота получения результатов исследования, а также возможность использования различных видов биологического материала. Проводимые до настоящего времени исследования по определению микобактерий туберкулеза (МБТ) методом ПЦР чаще выполняются с применением тест-систем in-house, или с коммерческими тест-системами, не прошедшими экспертизу и испытания в ГИСК им. Л.А. Тарасевича, в соответствии с утвержденными Минздравом РФ руководящими документами. Подобная ситуация не позволяет корректно сравнивать получаемые результаты между собой и уточнить возможности метода.

В ЦНИИЭ МЗ РФ была разработана ПЦР тест-система «АмплиСенс®

МБТ» с высокими аналитическими и диагностическими характеристиками. Данная тест-система предназначена для качественного выявления ДНК МБТ, вызывающих специфическое туберкулезное воспаление (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*). В качестве мишени для праймеров выбран участок гена инсерционного элемента IS 6110, присутствующий у МБТ с разной копийностью (от 1 до 20 повторов). Данный ген не встречается у атипичных микобактерий, а также у других кислото- и спиртоустойчивых бактерий. Тест-система выявляет МБТ в мокроте, бронхо-альвеолярном лаваже (промывных водах бронхов) и в моче. Аналитическая чувствительность, по данным разработчиков препарата, составляет $1-5 \times 10^3$ копий/мл, аналитическая специфичность 100%, воспроизводимость 100% (при концентрации ДНК в пробе $1-5 \times 10^3$ копий/мл и выше). «АмплиСенс® МБТ» имеет в своем составе конкурентный внутренний контрольный образец (ВКО), позволяющий фиксировать появление ложноотрицательных результатов. Он представляет собой фаг λ со встроенными в него, методами генной инженерии, последовательностями ДНК инсерционного элемента IS 6110, комплементарными диагностическим праймерам. ВКО вносится в клиническую пробу перед выделением ДНК и последовательно проходит все этапы реакции. ДНК ВКО амплифицируется одновременно с ДНК МБТ, что позволяет использовать одну пробирку на этапе амплификации и значительно экономит время получения результата и реактивы. Получающиеся при этом ампликоны отличаются по размеру на 360 п.о., что позволяет легко прочитывать результаты электрофореза. Данный препарат хорошо хранится, т.к. он устойчив к действию ДНКаз.

Целью данного исследования явилось определение диагностической ценности (чувствительность, специфичность, воспроизводимость) ПЦР тест-системы «АмплиСенс® МБТ», производства ЦНИИЭ МЗ РФ, в процессе Государственных испытаний для решения вопроса о возможности ее внедрения в практику здравоохранения. Испытания проводились на базе Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, 4-го Центрального военного клинического туберкулезного госпиталя МО РФ и Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом в соответствии с программой, утвержденной Комитетом МИБП и Минздравом РФ.

При проведении испытаний в качестве препарата сравнения использовали ПЦР тест-систему «ДиаГен-Мусобacteria®» (производство ЗАО ЛАГИС), предназначенную для качественного выявления ДНК МБТ. Тест-система не имеет ВКО. Чувствительность тест-системы — 10^4 копий/мл.

Первый этап Государственных испытаний проведен в специализированных лабораториях ГИСК им. Л.А.Тарасевича после получения подтверждения, по результатам контроля соответствия этих двух препа-

ратов, требованиям ФСП. Обе тест-системы давали положительные результаты при анализе закодированных музейных штаммов микобактерий человеческого (2 штамма) и бычьего (2 штамма) видов, разведенных до 10^3 КОЕ/мл и отрицательный результат с разведениями 10^9 КОЕ/мл с 6 видами атипичных микобактерий (*M. avium* - 2 штамма, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*), и 4 видами бактерий (*E. coli*, *St. aureus*, *Str. pneumoniae*, *K. pneumoniae*), присутствие которых в исследуемых клинических материалах возможно.

Материалами для этапа клинических испытаний явились 356 проб бронхо-альвеолярного лаважа (БАЛ), мокроты и мочи от 248 пациентов из 4 Центрального военного клинического туберкулезного госпиталя МО РФ, Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом и туберкулезной клинической больницы № 7 г. Москвы.

Испытание чувствительности тест-системы «АмплиСенс® МБТ» проводилось на материалах больных активным или активным заходящим туберкулезом легких и мочеполовой системы (222 пробы от 138 пациентов). Исследование мокроты проведено у 54 пациентов (70 образцов), БАЛ у 58 пациентов (60 образцов) больных легочными формами туберкулеза. Моча исследовалась у 26 пациентов (92 образца), больных мочеполовым туберкулезом.

Испытание специфичности тест-системы проводилось на аналогичном материале пациентов с заболеваниями нетуберкулезной этиологии соответствующих локализаций, не имевших туберкулеза в анамнезе. Исследование мокроты проведено у 37, БАЛ у 49, мочи у 24 пациентов.

Каждый образец клинического материала разделяли на 3 части: 1 - для анализа традиционными микробиологическими методами, 2 - для анализа с использованием тест-системы «АмплиСенс® МБТ», 3 - с использованием тест-системы сравнения «ДиаГен-Мycobacteria®». Образцы клинического материала были внесены в пробирки соответствующего объема для каждого вида исследования, в соответствии с инструкциями по применению диагностикумов. Традиционные микробиологические методы включали в себя посев на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финна II, а также люминесцентную бактериоскопию мазка. Анализ материалов этими методами проводился непосредственно после их забора. Все образцы мокроты, БАЛ и мочи для исследования методом ПЦР были заморожены при -20°C , их анализ проводился после накопления необходимого количества образцов в период срока годности тест-систем.

Государственные испытания были проведены в соответствии с требованиями контролируемого эксперимента с зашифрованными образцами. После завершения исследований методом ПЦР образцы мокроты, БАЛ и мочи были расшифрованы, проведен анализ полученных результатов. Были оценены диагностические чувствительность, специфичность и вос-

производительность работы испытуемой тест-системы «АмплиСенс® МБТ» на клинических образцах.

Результаты.

В результате первого этапа Государственных испытаний тест-система «АмплиСенс® МБТ», также как и «ДиаГен-Мycobacteria®», выявляла МБТ в разведении 10^3 КОЕ/мл и показала 100% специфичность на контрольных бактериальных штаммах.

Результаты исследования клинического материала от больных туберкулезом с помощью испытуемой тест-системы и тест-системы сравнения, относительно традиционных микробиологических методов, представлены в табл. 1.

Табл. 1
Результаты исследования клинических образцов от больных туберкулезом

Вид материала	Кол-во образцов	Кол-во положительных проб, полученных с помощью		
		традиционных микробиологических методов	«АмплиСенс® МБТ»	«ДиаГен-Мycobacteria®»
мокрота	70	28 (40,0%)	42 (60,0%)	39 (55,7%)
БАЛ	60	8 (13,3%)	51 (85,0%)	40 (66,7%)
моча	92	8 (8,7%)	33 (35,9%)	9 (9,8%)

Анализ этих результатов показал, что традиционными микробиологическими методами МБТ выявлены в 28 из 70 образцов мокроты, что составило 40,0%. В то же время, методом ПЦР с помощью тест-системы «АмплиСенс® МБТ» микобактерии были обнаружены чаще - в 42 образцах мокроты, что составило 60,0%, а с помощью тест-системы «ДиаГен-Мycobacteria®» в 39 образцах (55,7%). Различия между результатами исследования мокроты ПЦР тест-системами недостоверны ($p > 0,05$). При исследовании БАЛ традиционными микробиологическими методами МБТ были выявлены в 8 из 60 образцов, что составило 13,3%, с помощью испытуемой ПЦР тест-системы в 51 образце (85,0%), а тест-системы сравнения - в 40 образцах (66,7%) ($p < 0,05$). В моче МБТ были обнаружены традиционными микробиологическими методами в 8 из 92 образцов, что составило 8,7%, с помощью «ДиаГен-Мycobacteria®» - в 9 образцах (9,8%), а с помощью «АмплиСенс® МБТ» - в 33 образцах (35,9%). Различия между результатами исследования мочи двумя ПЦР тест-системами достоверны ($p < 0,01$).

Таким образом, выявляемость МБТ с помощью метода ПЦР выше, чем при использовании традиционных микробиологических методов

для всех видов исследуемых материалов. Полученные результаты объясняются более высокой чувствительностью метода ПЦР, а также тем, что исследуемые образцы были получены от больных на разных сроках противотуберкулезной терапии, когда культуральный метод не выявляет МБТ вследствие снижения их жизнеспособности.

Сопоставление выявляемости МБТ в одних и тех же образцах двумя ПЦР тест-системами показало, что все положительные результаты, полученные при использовании тест-системы «ДиаГен-Мycobacteria®», также были положительными при использовании тест-системы «АмплиСенс® МБТ». При этом «АмплиСенс® МБТ» выявляла больше положительных образцов, чем тест-система сравнения: в мокроте – на 4,3%, в БАЛ – на 18,3%, в моче – на 26,1%. Это связано с несколькими причинами. Во-первых, с более высокой чувствительностью тест-системы «АмплиСенс® МБТ», которая составляет 1-5x10³ коп/мл, в то время как чувствительность тест-системы «ДиаГен-Мycobacteria®» составляет 104 коп/мл. Во-вторых, в тест-системе «ДиаГен-Мycobacteria®» отсутствует ВКО, поэтому, возможно, некоторые полученные отрицательные результаты являлись ложноотрицательными. Третьей причиной является то, что в тест-системе «АмплиСенс® МБТ» выделение ДНК осуществляется из 5 мл мочи, в то время как в тест-системе «ДиаГен-Мycobacteria®» – из 1 мл (согласно инструкциям по применению тест-систем), что определяет количество детектируемого микроорганизма в исследуемой пробе.

В положительных, по результатам традиционных микробиологических методов, образцах исследуемых видов материалов (МБТ+ образцы), нами была проанализирована выявляемость МБТ с помощью ПЦР тест-систем. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Табл. 2

Результаты тестирования МБТ+ образцов с помощью ПЦР тест-систем

Вид материала	Кол-во МБТ+ образцов, выявленных традиционными микробиологическими методами	Кол-во положительных результатов, полученных с помощью тест-системы	
		«АмплиСенс® МБТ»	«ДиаГен-Мycobacteria®»
мокрота	28	28 (100%)	28 (100%)
БАЛ	8	8 (100%)	8 (100%)
моча	8	8 (100%)	8 (100%)

Анализ результатов показал, что во всех МБТ+ образцах как с помощью тест-системы «АмплиСенс® МБТ», так и с помощью «ДиаГен-

Mycobacteria®», были обнаружены микобактерии. Таким образом, относительно традиционных микробиологических методов, чувствительность испытуемой тест-системы, так же как и тест-системы сравнения, составила 100%.

Далее исследовали выявляемость МБТ в разных пробах одного вида материала от одного и того же больного туберкулезом легочной или мочеполовой локализаций.

При анализе материала БАЛ 58 пациентов, только у двух из них материал был забран повторно, т.к. бронхоскопия является сложной инвазивной процедурой, трудно переносимой больными. При анализе этих двух образцов с помощью тест-систем «АмплиСенс® МБТ» и «ДиаГен-Мycobacteria®» в обоих случаях были получены положительные результаты. При исследовании БАЛ пациента Н. традиционными микробиологическими методами МБТ не были обнаружены, пациента К. — были обнаружены только с помощью культурального метода.

В 81 образце мочи, взятых повторно от 23 пациентов: у 14 пациентов (44 образца) МБТ не были обнаружены ни одним методом, у 9 пациентов (37 образцов) — были обнаружены одним из методов или их сочетанием. В результате исследования образцов мочи от 9 больных с микобактериурией хотя бы в одной из анализируемых проб: культуральным методом было получено 6 положительных результатов, методом люминесцентной бактериоскопии — 4, методом ПЦР с использованием тест-системы «ДиаГен-Мycobacteria®» — 8, с использованием тест-системы «АмплиСенс® МБТ» — 29. При этом, во всех случаях обнаружения МБТ любым из методов сравнения, с помощью испытуемой тест-системы также был получен положительный результат. Следует добавить, что не было ни одного пациента, у которого результаты исследования всех проб мочи разными методами совпали. Например, у пациента В. только в 2 из 6 образцов мочи были получены положительные результаты всеми методами, в остальных 4 образцах трижды был получен положительный результат с помощью метода люминесцентной бактериоскопии и во всех 4 образцах — методом ПЦР с использованием тест-системы «АмплиСенс® МБТ».

Таким образом, испытуемая тест-система «АмплиСенс® МБТ» показала более высокую чувствительность, чем традиционные микробиологические методы. Испытуемая тест-система, в случае повторно забранных образцов мочи, в 3,6 раза чаще выявляла МБТ по сравнению с тест-системой сравнения. Следует заметить, что даже для такой чувствительной тест-системы как «АмплиСенс® МБТ» рационально использовать принцип трехкратного забора клинических проб. Применяя подобный подход в нашем исследовании, когда 3 образца мочи забирались ежедневно или через день, мы повысили результативность исследования с помощью этой тест-системы на 26,0%.

Диагностическую специфичность ПЦР тест-системы «АмплиСенс® МБТ» определяли при тестировании клинических проб, полученных от пациентов с заболеваниями нетуберкулезной этиологии соответствующей локализации (табл. 3). Результаты исследования клинических образцов методом

Табл. 3

ПЦР от больных с неспецифическими заболеваниями

Вид материала	Кол-во проб	Кол-во отрицательных результатов, полученных с помощью	
		«АмплиСенс® МБТ»	«ДиаГен-Мycobacteria®»
мокрота	37	36 (97,3%)	37 (100%)
БАЛ	49	49 (100%)	49 (100%)
моча	48	48 (100%)	48 (100%)

Анализ полученных результатов показал, что из 37 образцов мокроты в одном образце с помощью испытуемой тест-системы был получен ложноположительный результат, тест-система сравнения положительных образцов не выявила. Специфичность «АмплиСенс® МБТ» при исследовании мокроты составила 97,3%, «ДиаГен-Мycobacteria®» - 100%. Различия между полученными результатами недостоверны ($p > 0,05$). При исследовании образцов БАЛ и мочи обе тест-системы показали отрицательные результаты. Таким образом, специфичность испытуемой тест-системы при исследовании БАЛ и мочи составила 100%.

Использование ВКО в тест-системе «АмплиСенс® МБТ» позволяет контролировать появление ложноотрицательных результатов. В общей сложности наблюдалось 26,9% образцов всех видов материалов со слабоположительным или отрицательным сигналом ВКО. При перестановке этих проб с этапа амплификации количество слабоположительных сигналов удалось уменьшить до 18% и добиться прохождения ВКО в тех образцах, где при первоначальной постановке он не проходил. Количество положительных результатов среди первоначально ингибированных образцов составило 4,8 % от общей выборки.

Воспроизводимость работы тест-системы «АмплиСенс® МБТ» на клинических образцах оценивалась по совпадению результатов повторных исследований 10 проб каждого вида материала от пациентов больных туберкулезом или неспецифическими заболеваниями. Пробы от больных туберкулезом были подобраны таким образом, чтобы для каждого вида материала было 10 положительных образцов (полученных с помощью метода ПЦР), в 5 из которых культуральным методом были получены положительные и в 5 - отрицательные результаты. ДНК, выделенная из

клинических проб, была разделена на равные аликвоты и амплифицировалась в 3 параллельных пробирках с использованием тест-системы «АмплиСенс® МБТ». Полученные результаты представлены в табл. 4.

Табл. 4.

Воспроизводимость работы тест-системы «АмплиСенс® МБТ» на клинических образцах

Число проб	Пробы больных туберкулезом		Пробы больных неспецифическими заболеваниями	Суммарный результат
	Положительные результаты «АмплиСенс® МБТ»		Отрицательные результаты «АмплиСенс® МБТ»	
	Положительный результат культурального метода	Отрицательный результат культурального метода	Отрицательный результат культурального метода	
	5	5	10	20 (100%)
Кол-во измерений	15	15	30	60 (100%)
мокрота	15	14	30	59 (98,3%)
БАЛ	15	13	30	58 (96,7%)
моча	15	12	30	57 (95,0%)

Во всех аликвотах клинических образцов с положительными результатами культурального метода, методом ПЦР были получены аналогичные результаты. Таким образом, воспроизводимость работы тест-системы с такими пробами составила 100%. В образцах клинического материала, в которых был получен положительный результат методом ПЦР и отрицательный результат культуральным методом: в одной пробе мокроты и в двух пробах БАЛ одна из трех аликвот показала отрицательный результат. В пробах мочи в одном случае две аликвоты были положительными и одна - отрицательной, в другом - одна аликвота была положительной и две - отрицательными. Несовпадающие результаты тестирования аликвот объясняются тем, что средняя концентрация ДНК МБТ в них, возможно, была ниже аналитической чувствительности тест-системы и вероятность получения положительных результатов имелась не во всех аликвотах образца. Все аликвоты образцов клинических материалов от больных неспе-

цифическими заболеваниями были отрицательными. Полученные результаты свидетельствуют о высокой воспроизводимости работы испытуемой тест-системы на клинических образцах, которая составила 98,0%.

Вывод.

В результате проведенных Государственных испытаний ПЦР тест-система «АмплиСенс® МБТ» показала высокие значения диагностической ценности и может быть рекомендована для регистрации в МЗ РФ для выявления ДНК МБТ в клинических образцах.