

Использование полимеразно-цепной реакции для диагностики и дифференциальной диагностики БЦЖ-осложнений

*ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
ГУ «Ниш пульмонологии и фтизиатрии», ФГУН ЦНпп Эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва*

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

Ключевые слова: БЦЖ-осложнения, микобактерии туберкулеза, метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР)

Противотуберкулезная вакцинация проводится с целью создания специфического иммунитета к туберкулезной инфекции и считается одной из наиболее важных мер по предупреждению развития тяжелых форм заболевания туберкулезом [1,3]. При правильном подходе к ее проведению у 95% вакцинированных детей развивается местная реакция с формированием постпрививочного рубчика. Среди БЦЖ-осложнений чаще развиваются регионарные лимфадениты, холодные абсцессы, могут возникать БЦЖ-оститы. Диагностика БЦЖ-осложнений затруднительна, так как клинико-морфологически имеется много признаков, схожих с туберкулезным поражением [2,3]. Верификация диагноза микробиологическим методом позволяет дифференцировать человеческий вид микобактерии туберкулеза (*M.tuberculosis*) от бычьего вида (*M.bovis*). Данный метод диагностики длительный (6-8 недель) и не позволяет дифференцировать *M.bovis* от *M.bovis* VCG, т.е. патогенный штамм микобактерии туберкулеза бычьего вида от вакцинного штамма микобактерии туберкулеза бычьего вида. Идентификация же вида микобактерии необходима для правильного диагноза и определения правильного подхода к проведению адекватных эпидемиологических и лечебных мероприятий. Это делает актуальным изучение возможности верификации диагноза БЦЖ-осложнений с использованием молекулярно-генетических методов – метода полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Возможности практического применения этих методов активно обсуждается в настоящее время в литературе [2,4,5].

Материал и методы. Нами изучена возможность использования ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» для идентификации возбудителя у 21 ребенка с периферическими лимфаденитами, поступивших для обследования и лечения в ГУ Нпп пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ. Для верификации диагноза у детей использовались анамнестические, клинико-лабораторные данные, рентгено-томографические, микробиологические методы исследования и гистологическое исследование резецированных лимфатических узлов. ПЦР была проведена на образцах ткани подмышечных лимфатических узлов, полученных при оперативном вмешательстве. Исследования проводились совместно с разработчиками тест-систем «АмплиСенс МТС diff-FI (iQ5)» ФГУН ЦНпп Эпидемиологии Роспотребнадзора (г. Москва) на приборе iCycler Bio-Rad (США). Проводилось также сопоставление результатов идентификации вида микобактерии в резекционном материале лимфатических узлов детей, полученных методом полимеразно-цепной реакции, с методами золотого стандарта, т.е. общепризнанными микробиологическими методами (бактериоскопического и культурального методов).

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 ребенку в 7-летнем возрасте, у которого через 2 недели после введения противотуберкулезной вакцины был диагностирован левосторонний подмышечный лимфаденит БЦЖ-этиологии, учитывая связь с противотуберкулезной вакцинацией. У 11 детей (52,3%) в возрасте до 1 года осложнения выявлялись в период от 2-х до 6 месяцев с момента противотуберкулезной иммунизации, проявлялись развитием регионарных лимфаденитов с левосторонней подмышечной локализацией. Абсцедирование лимфатических узлов при этом было отмечено у 3-х детей (27%), что свидетельствовало о поздней диагностике и необходимости проведения оперативного лечения. Местный ответ на введенную вакцину у всех пациентов сопровождался развитием поствакцинального рубчика: размером до 4мм - у 11 детей (52,3%), размером 5-7мм - у 8 детей (38%), 1 ребенок имел поствакцинальный рубчик 10мм и на ревакцинацию БЦЖ у 1 ребенка рубчик не сформировался. Постановка туберкулиновой пробы Манту детям в возрасте до 1 года не проводилась, т.е. степень специфической сенсибилизации организма ребенка при проведении дифференциальной диагностики туберкулеза с БЦЖ-осложнением не учитывалась. У детей в возрасте от 2 до 10 лет (10 детей-47,7%) отмечалась чаще нормергическая туберкулиновая реакция, которая проявлялась папулой 10-14мм у 6 детей (60%), 15мм – у 1 пациента и 2 детей (20%) имели гиперергическую туберкулиновую реакцию. У данной возрастной категории детей развитие лимфаденита происходило на фоне первичного инфицирования (виража туберкулиновой реакции) у 4 детей (40%), спустя 2 года с момента виража туберкулиновой реакции – у 2-х детей (20%). При этом у 6 детей (60%) был установлен подмышечный лимфаденит в фазе обызвествления. Неактивный специфический процесс в периферических лимфатических узлах (обызвествление) был выявлен при рентгенологическом обследовании по поводу виража туберкулиновой реакции. Анализ причин развития БЦЖ-осложнений позволил установить, что все дети в возрасте до года при рождении имели перинатальную патологию, 3 детей (27%) были рождены путем кесарева сечения, 6 детей (60%) старшего возраста относились к категории часто длительно болеющих (ЧДБ) детей, 1 ребенок перенес пневмонию. Из семейного туберкулезного очага (мама и бабушка пациента перенесли туберкулез периферических лимфатических узлов) был один ребенок.

По данным бактериоскопического исследования мазков-отпечатков резецированных лимфатических узлов кислотоустойчивые микобактерии (КУБ) не были обнаружены ни в одном случае. Культуральным методом с помощью автоматического анализатора Bactec MGIT-960 в 9 (42,8%) из 21 исследованного образца лимфатических узлов были обнаружены микобактерии туберкулеза (2 - *M.tuberculosis*; 7- *M.bovis*). Все полученные культуры были чувствительны к противотуберкулезным препаратам. При гистологическом исследовании лимфатических узлов были обнаружены морфологические признаки туберкулезного воспаления в виде эпителиоидно-клеточных гранулем с гигантскими многоядерными клетками типа Пирогова-Лангханса или очагов казеозного некроза, у 6 детей - туберкулезные очажки с признаками обызвествления, у одного из детей гистологически выявлено преобладание признаков неспецифической воспалительной реакции над признаками специфического воспаления. Все случаи обызвествления очагов туберкулезного воспаления в лимфатических узлах имели отрицательные результаты исследования резекционного материала на наличие микобактерии туберкулеза микробиологическим методом. На основании комплексных анамнестических и клинико-лабораторных данных 20 детям был поставлен диагноз левостороннего подмышечного лимфаденита БЦЖ-этиологии, а у

одного ребенка был установлен диагноз туберкулеза периферических лимфатических узлов (подмышечная группа слева).

С помощью молекулярно-генетического метода в 15 (71,4%) из 21 образца была выявлена ДНК *M.bovis* BCG, в 1 образце выявлена ДНК *M.bovis*, которая затем путем секвенирования была идентифицирована, как *M.bovis* BCG, в 4 образцах МБТ обнаружены не были. В материале, полученном от ребенка с туберкулезом периферических лимфоузлов, была выявлена ДНК *M.tuberculosis*, что подтверждало диагноз туберкулеза. 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 diff» принадлежность обнаруженных микобактерий к тому или иному виду была подтверждена путем секвенирования ДНК 14 образцов по альтернативным мишеням - региону *SenX3-RegX3* и *OxyR*. Было получено 100% совпадение результатов (секвенирование одного образца не проводилось). У 4-х детей (19%) все использованные методы не позволили установить этиологический фактор. У одного из этих детей гистологически выявлено преобладание неспецифического воспаления (табл.1).

Таблица 1. Результаты идентификации *M.tuberculosis* методом ПЦРв режиме реального времени при периферических лимфаденитах

Кол-во образцов	Гистологическое подтверждение диагноза		Выделение МБТ+культуральным методом		Видовая идентификация методов	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
21	15	71,4	9	42,8	1	4,76
21	15	71,4±10,1	9	42,8±11,0	1	4,76±
1			2		3	
21	15	71,4±10,1	9	42,8±11,0	17	80,95±8,7
P1-2	>0,05					
P2-3						<0,05
P2-4						

Таким образом, применение молекулярно-генетических методов позволило однозначно определить этиологический фактор заболевания у детей (установить принадлежность возбудителя к штамму *M.bovis* BCG) у 15 детей (71,4%), повысить эффективность диагностики поствакцинальных БЦЖ-осложнений, сократить время получения результата исследования, увеличить выявляемость микобактерии туберкулеза на 38% по сравнению с традиционными микробиологическими методами, что дает возможность рекомендовать метод для верификации диагноза БЦЖ-осложнений.

Литература

1. Аксенова, В. А. Специфическая профилактика туберкулеза у детей и подростков и ее перспективы в будущем / В. А. Аксенова, Е. М. Гусева, Л. п. Горовенко // Туберкулез и экология. 1997. № 4. С. 7–9.

2. Коваленко, К. Н. БЦЖ-оститы у детей / К. Н. Коваленко [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2004. № 1. С. 21–24.

3. Леви, Д. Т. Вакцинация БЦЖ: характеристика препаратов и причины поствакцинальных осложнений / Д. Т. Леви [и др.] // Проблемы туберкулеза. 1999. № 4. С. 4–7.

4. Митинская, Л. А. Новые технологии при профилактике, выявлении, диагностики и лечении туберкулеза у детей / Л. А. Митинская // Проблемы туберкулеза. 2003. № 1. С. 19–25.

5. Фирсова, В. А. Роль метода биологических микрочипов в определении устойчивости микобактерии туберкулеза к рифампицину у подростков с активным туберкулезом легких / В. А. Фирсова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006. № 8. С. 28–30