

УДК 616.71/.72-002.5-078:577.214

## Діагностична цінність полімеразної ланцюгової реакції у ранній діагностиці кістково-суглобового туберкульозу (експериментальне дослідження)

Т. Г. Голка

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», Харків

*The purpose of the present work was to study the diagnostic value of a polymerase chain reaction (PCR) in a new experimental model of tuberculous gonitis, created by the authors, and examine peculiarities in the clinical-pathomorphological course of tuberculosis of bones and joints (TBJ). Features of the clinical-pathomorphological course of tuberculous disease of joints were studied as result of an experiment, conducted on guinea pigs with use of an original procedure. The analysis of results of the above research made it possible to reveal that the diagnostic sensitivity of PCR was 80 % at the prearthritic stage of the disease development and 100 % at its arthritic one. At the same time, the specificity of the chosen technique was 100 %, thereby enabling us to draw a conclusion that the use of PCR of synovial fluid in the arsenal of diagnostic methods for patients with TBJ is reasonable.*

*Целью работы было изучение диагностической ценности полимеразной цепной реакции (ПЦР) в созданной новой экспериментальной модели туберкулезного гонита и особенностей клинико-патоморфологического течения костно-суставного туберкулеза (КСТ). В результате проведенного эксперимента на морских свинках с использованием оригинальной методики изучены особенности клинико-патоморфологического течения туберкулезного заболевания суставов. Проведенный анализ результатов исследования позволил установить, что диагностическая чувствительность ПЦР в преартритической стадии развития заболевания составляет 80 %, в артритической — 100 %. Наряду с этим специфичность выбранного метода составляет 100 %, что позволяет нам сделать вывод о целесообразности использования ПЦР синовиальной жидкости в диагностике КСТ.*

**Ключові слова:** експериментальне моделювання, кістково-суглобовий туберкульоз, полімеразна ланцюгова реакція, діагностика

### Вступ

За інформацією ВООЗ, що контролює боротьбу з туберкульозом у світі, сьогодні на Землі 20–30 млн людей хворіє на активний туберкульоз усіх локалізацій. Повторно стають хворими до 10 млн осіб, а вмирають більше 3 млн. Тенденція до стабілізації або покращення цих показників у світі не спостерігається. Нині туберкульоз як причина смерті поступається серед інфекційних захворювань тільки ВІЛ-інфекції. На кістково-суглобовий туберкульоз (КСТ) припадає від 3 до 5 % всіх хворих на туберкульоз, що становить близько 500 тис. осіб на рік [5–7].

В Україні туберкульоз кісток та суглобів займає друге місце (2,6 %) серед всіх клінічних форм цієї хвороби і перше місце (40,5 %) серед туберкульозу

позалеженевих локалізацій. Подібну тенденцію відмічено і в інших країнах СНД. Серед усіх хворих на КСТ ураження хребта відбувається у 45 % випадків, кульшовому та колінному суглобам відводять по 20 %, решті суглобів — 15 % [5, 6].

Рівень діагностики КСТ сучасними методами надзвичайно низький, що пов'язано не тільки зі складністю виявлення патології, а з труднощами її бактеріологічної і гістологічної верифікації. Особливістю КСТ є високий ступінь інвалідизації пацієнтів (до 80 %), навіть незважаючи на можливість його повного одужання завдяки сучасним хірургічним і консервативним методам лікування [3, 6, 8].

Попри суттєве підвищення рівня діагностики запальних захворювань опорно-рухової системи,

зумовлене поширенням сучасних високотехнологічних та інформативних методів променевої діагностики — комп'ютерної (КТ) та магнітно-резонансної томографії (МРТ), ультразвукової діагностики (УЗД) тощо, залишається у цій галузі багато невирішених питань. До класичних методів діагностики туберкульозу, так званого «золотого стандарту», належать мікроскопія та бактеріологічне культивування, які є вельми ефективними, але відрізняються або недостатньою чутливістю, або тривалим виявленням *M. tuberculosis* (МБТ). Способи швидкого виявлення МБТ надзвичайно важливі для своєчасного діагнозу, вибору адекватного лікування та попередження розповсюдження захворювання [1, 2, 6].

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) є найбільш простим і ефективним молекулярно-генетичним методом виявлення МБТ, уперше розробленим і застосованим К. Мюллісом і співавт. у 1986 р. Цей метод останнім часом отримав широке застосування в діагностиці туберкульозу завдяки ефективності і зручності прямого виявлення нуклеїнових кислот збудника захворювання. В основі методу лежить багаторазове копіювання за допомогою ферменту ДНК-полімерази визначеного фрагменту ДНК, який є маркерним для певного виду [1, 2].

Нині існує чимало розробок щодо використання ПЛР у діагностиці туберкульозу легенів [6, 7].

Крім присвячених детекції *M. tuberculosis* у респіраторних зразках робіт, зарубіжні дослідники отримали розрізнені і суперечливі результати застосування молекулярно-генетичних методів під час аналізу позалегенового матеріалу [1, 7]. Слід зазначити, що саме у випадках позалегенової локалізації захворювання ПЛР набуває особливої значимості, оскільки традиційні мікробіологічні методи — бактеріоскопія і посів — часто є малоефективними.

У зарубіжній літературі ми знайшли поодинокі роботи, в яких йшлося про застосування ПЛР у хворих на КСТ. Публікації, присвячені цій проблемі, у вітчизняній спеціалізованій літературі взагалі відсутні.

Таким чином, до цього часу не були визначені показання до застосування ПЛР у фізіоортопедії і не проведено клінічної інтерпретації отриманих результатів. З метою вивчення діагностичної цінності ПЛР за КСТ ми розробили експериментальну модель туберкульозу колінного суглоба, що також дало можливість вивчити особливості клініко-патоморфологічного перебігу цього захворювання.

## Матеріал та методи

Експериментальне дослідження проведено на базі ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної

ветеринарної медицини» НААН. Дослідження виконані на 50 статевозрілих (понад 6 міс.) морських свинках середньою вагою 350–500 г. Протокол експериментів на тваринах було затверджено комісією з біоетики Харківської медичної академії післядипломної освіти (протокол № 4 від 14 квітня 2011 р.) відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовують у експериментальних та інших наукових цілях».

Моделювання туберкульозного артрити колінного суглоба виконували за розробленим нами способом [4].

Перед початком експерименту всіх тварин обстежено для виявлення у них паразитарних та інфекційних хвороб з подальшим проведенням реакції Манту (25 туберкулінових одиниць *M. bovis* і *M. avium*). У всіх піддослідних тварин результати туберкулізації свідчили про відсутність імунітету до туберкульозу, а це підтверджує, що вони ним не хворіють і не хворіли.

Тварин розділили на 3 групи, які для уникнення можливої контамінації між собою були розміщені в різних клітках, кожна в окремій кімнаті.

1-а група (30 тварин) — основна, де проведено моделювання КСТ шляхом введення внутрішньокістково зависі *m. bovis* штаму *valle* (0,1 мг сухої маси в 1 мл).

2-а група (10 тварин) — контрольна № 1. Тваринам вводили 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину внутрішньокістково (за методикою, яка аналогічна основній групі)

3-я група (10 тварин) — контрольна № 2 для моделювання неспецифічного запального процесу. Тварин заражували *St. aureus* (1 млрд мікробних клітин у 1 мл). Методика введення аналогічна попереднім групам.

Виведення з експерименту тварин здійснювали шляхом передозування ефіру через 1 та 2,5 міс. На першому етапі, після виявлення ознак преартритичної стадії туберкульозного артрити в основній групі (через 1 міс.), було виведено з експерименту 18 тварин: десять з 1-ї групи та по чотири з 2-ї та 3-ї. На другому етапі, після виявлення клініко-рентгенологічно артритичної стадії в основній групі (через 2,5 міс.), виведено 18 тварин: десять з 1-ї групи та по чотири з 2-ї і 3-ї.

Далі ми чекали післяартритичної стадії туберкульозного артрити або ремісії захворювання, але тварини загинули. Дві тварини з 3-ї групи загинули через 3 міс. після початку експерименту, решта тварин (10) з основної групи — в період від 3,5 до 4 міс. Причиною смерті цих тварин, за результатами макроскопічного обстеження після аутопсії, стала

генералізація септичного процесу та інфекційне ураження життєво важливих органів та систем. Дві тварини, що залишились з контрольної групи № 1, ми вивели з експерименту після смерті останньої тварини основної групи.

*Методика зараження.* Знерухомлення тварин забезпечували внутрішньом'язовим введенням розчину ксилазину (5 мг на 1 кг маси). Морську свинку фіксували на верстаті на спині з максимально витягнутими лапами.

Шкіру в ділянці правого колінного суглоба звільняли від шерсті і обробляли розчином йоду. Операційне поле відокремлювали стерильними серветками. Виконували розтин шкіри довжиною близько 2,0 см на передньовнутрішній поверхні колінного суглоба на рівні проксимального метаепіфіза великогомілкової кістки. Після цього оголювали кортикальний шар великогомілкової кістки. За допомогою порожнистої мікрофрези діаметром 2 мм формували канал у губчастій речовині проксимального метаепіфіза великогомілкової кістки орієнтовно на 0,5 см нижче суглобової щілини в напрямку спереду назад, зсередини назовні, знизу догори. Таким способом утворювали канал діаметром 2–2,5 мм і глибиною близько 5 мм позасуглобово.

Після зупинки кровотечі із спонгіозної тканини за допомогою турунди, змоченої в 3 % розчині перекису водню, в канал вводили культуру МБТ — 0,5 мл зависі *m. bovis* штаму *valle* (0,1 мг сухої маси в 1 мл). Канал пломбували медичним воском з використанням кортикальної пластинки, отриманої під час трепанації, м'які тканини ушивали без місцевого застосування туберкулостатиків.

Вибір місця зараження був обумовлений високою частотою (90 %) локалізації первинного оститу в ділянці метафізів великогомілкової та стегнової кісток за умов туберкульозного артриту колінного суглоба.

*Клінічне дослідження.* За всіма тваринами проводили динамічне спостереження з детальним клінічним оглядом, зважуванням, дослідженням функції суглоба, термометрією. Під час клінічного обстеження тварини враховували її поведінку, поставу і характер пересування, оперований суглоб порівнювали з контралатеральним. Визначали амплітуду рухів в ураженому суглобі.

*Рентгенологічне дослідження* проводили за показаннями від 3 до 5 разів упродовж спостереження. Рентгенографію оперованого (зараженого) і здорового суглоба виконували одночасно в одній проекції з фіксацією морської свинки на спеціальному верстаті і знерухомленням ксилазином. Вивчали структуру кісток, їх взаємовідношення в суглобі, стан суглобової щілини, розміри дефектів.

*Анатомічне дослідження.* Анатомічне препарування та макроскопічне вивчення препаратів колінного суглоба проводили безпосередньо після виведення тварин з експерименту. Колінні суглоби розкривали передньозовнішнім доступом, таким чином вся суглобова поверхня була легкодоступною для огляду. Макроскопічно вивчали стан покривного хряща, синовіальної оболонки, м'язово-зв'язкового апарату, виготовляли макропрепарати кісток.

*Гістологічне дослідження* проводили за методикою, затвердженою в лабораторії морфології сполучної тканини ДУ «ПІХС ім. проф. М. І. Ситенко НАМН України».

Макропрепарати містили обидва епіфізи колінного суглоба з капсулою і прилеглими м'язовими тканинами. Виготовлені гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за Ван-Гізеном і толуїдиновим синім. Вивчали мікроскопічну будову перихондрію, кісткової тканини, хряща і синовіальної оболонки, їх зміни за умов розвитку запального процесу.

## Результати та їх обговорення

*Результати гістологічного дослідження.* Десять морських свинок основної групи були виведені з експерименту на 30-у добу після зараження з наступним виготовленням гістологічних препаратів колінного суглоба у сагітальній проекції. Під час морфологічного дослідження в метафізі великогомілкової кістки визначали грануляційно-некротичні вогнища. На його периферії кісткові трабекули піддавалися резорбції остеокластами, з боку ложа відмічали утворення нових шарів кістки. У покривному шарі синовіальної оболонки виявляли проліферати, переважно лімфоцити. В окремих клітинах середнього і глибокого шарів суглобового хряща відмічені пікноз ядер і їх лізис.

Через 2,5 міс. у тварин основної групи під час гістологічного дослідження встановлено подальше поширення туберкульозних казеозно-некротичних вогнищ з руйнуванням кістки та хряща. Вогнища оточувала гранульоматозна тканина з лімфоцитів і гістіоцитів, здебільшого в стані некробіозу, з наявними епітеліоїдними, гігантськими клітинами. З боку вогнища відбувалася резорбція прилеглих кісткових трабекул, вони були потовщені, зберігалася проліферація покривного шару синовіальної оболонки і осередкова інфільтрація лімфоїдними елементами. У субсиновіальному шарі пухка сполучна тканина заміщувалася фіброзною. Дистрофічні зміни в покривному хрящі призводили до загибелі поверхневих шарів, які змінювались сполучною тканиною. У глибоких шарах хряща утворювалися кісткові

Таблиця. Результати проведеного ПЛР дослідження

Група, фаза захворювання та кількість тварин		Етапи експерименту					
		I		II		III	
		Результат полімеразної ланцюгової реакції					
		позитивний	негативний	позитивний	негативний	позитивний	негативний
Основна	Преартритична (n = 10)	8	2	—	—	—	—
	Артритична (n = 10)	—	—	10	0	—	—
	Тварини, в яких очікували післяартритичну фазу (n = 10)	—	—	—	—	10	0
Контрольна № 1 — неспецифічний артрит (n = 10)		0	4	0	4	0	2
Контрольна № 2 — здорові тварини (n = 10)		0	4	0	4	0	2

трабекули. У результаті цих процесів покривний хрящ починав руйнуватися.

Остання морська свинка з основної групи загинула на 117-й день після зараження. Під час гістологічного дослідження в епіметафізі великогомілкової кістки виявлено гранульоматозно-некротичне вогнище. Кісткові секвестри були оточені гранульоматозною тканиною, у збереженій частині епіфіза розташовувалася значна кількість некротизованих трабекул. Остеогенез невиражений, синовіальна оболонка потовщена, в ділянці її кріплення до плато великогомілкової кістки покривний хрящ був резорбований. Відмічено розростання специфічних грануляцій. Суглобовий хрящ виявився майже повністю зруйнованим.

Детально клініко-патоморфологічні особливості перебігу експериментального КСТ будуть опубліковані окремо. У цій роботі ми зосередили увагу на результатах дослідження діагностичної цінності ПЛР за КСТ.

*Результати дослідження ПЛР синовіальної рідини за умов моделювання КСТ.* Для проведення ПЛР виконували пункцію колінного суглоба та отримували синовіальну рідину у тварин перед виведенням з експерименту. У свинок, яким моделювали запальний процес (основна і контрольна № 2 групи), був отриманий ексудат непрозорого характеру, а в контрольній групі № 1 ми не одержали його, тому проводили змив з суглоба (вводили в нього стерильний фізіологічний розчин 0,5 мл, потім аспірували приблизно 0,2 мл рідини).

Отриманий матеріал досліджували методом ПЛР в акредитованому лабораторно-діагностичному центрі «Вірола» з використанням сертифікованої ПЛР тест-системи «АмплиСенс-100» МТБ-КОМ

виробництва ЦНДІ епідеміології МОЗ РФ. Дослідження та інтерпретацію результатів проводили згідно з інструкцією (протоколом). У тварин основної групи отримано такі результати: через 1 міс. (преартритична стадія) — 8 позитивних і 2 негативних, через 2,5 міс. (артритична фаза) — 10 позитивних, жодного негативного, через 3,5–4 міс. — 10 позитивних з 10 можливих. Виконання ПЛР у тварин обох контрольних груп призвело до негативних результатів (таблиця).

Важливо підкреслити, що застосована експериментальна модель дає змогу не лише встановити діагностичну цінність методу ПЛР та виявити особливості клініко-морфологічного перебігу захворювання, а розробляти експериментальні моделі різних хірургічних втручань залежно від стадії його розвитку.

## Висновки

Таким чином, проведений аналіз результатів дослідження дозволив встановити, що діагностична чутливість у ПЛР в преартритичній фазі розвитку захворювання становить 80 % (8 тварин), в артритичній — 100 % (10 тварин). Водночас специфічність методу складає 100 % (жодного позитивного результату в контрольних групах) (таблиця). Важливо також зазначити, що тривалість проведення дослідження з використанням ПЛР становить кілька годин на відміну від бактеріологічного, за умов якого для ідентифікації збудника туберкульозу потрібно від кількох тижнів до кількох місяців. Все це дозволяє зробити висновок про високу діагностичну цінність обраного методу дослідження синовіальної рідини суглоба і доцільне використання ПЛР в арсеналі діагностичних засобів у хворих на КСТ.

## Список літератури

1. Вишневский Б. И. Чувствительность и специфичность теста, основанного на полимеразной цепной реакции при диагностике туберкулеза периферических лимфатических узлов / Б. И. Вишневский, Е. Д. Мирлина, Э. Н. Белендир // Проблемы туберкулеза. — 1998. — № 4. — С. 41–44.
2. Вишневский Б. И. Особенности бактериовыделения и лекарственной устойчивости микобактерий при внелегочном туберкулезе / Б. И. Вишневский, О. А. Маничева, Е. Б. Вишневский // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2006. — № 11. — С. 18–21.
3. Олейник В. В. Этиотропное и патогенетическое лечение костно-суставного туберкулеза / В. В. Олейник, Л. А. Скворцова, Т. И. Виноградова // Хирургическое лечение костно-суставного туберкулеза / Ред. Ю. Н. Левашев, А. Ю. Мушкин. — СПб., 2008. — С. 41–46.
4. Пат. 70401 Україна, МПК G09B 23/28. Спосіб моделювання кістково-суглобового туберкульозу у тварин / Корж М. О., Дедух Н. В., Голка Т. Г.; заявник і патентовласник ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України». — №u20111317; заявл. 21.11.11; опубл. 11.06.12, Бюл. № 11.
5. Туберкульоз в Україні: [аналітично-статистичний довідник за 2000–2011] / Гол. ред. Толстанов О.К. — Київ, 2012. — 98 с.
6. Фещенко Ю. І. Організація лікування хворих на туберкульоз / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник. — Київ: Здоров'я, 2009. — 488 с.
7. Sharma S. K. Extrapulmonary tuberculosis / S. K. Sharma, A. Mohan // Indian J. Med. Res. — 2004. — P. 316–353.
8. Zhou Y. Differentiation of sarcoidosis from tuberculosis using real-time PCR assay for the detection and quantification of Mycobacterium tuberculosis / Y. Zhou, H. P. Li, Q. H. Li // Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. — 2008. — Vol. 25, № 62. — P. 93–99.

Стаття надійшла до редакції 09.01.2013

**Образовательный курс**  
общества исследователей сколиоза SRS Worldwide Course 2013  
23–24 мая 2013 года

**XI Международный симпозиум**  
**«Малоинвазивная и инструментальная хирургия позвоночника»**  
25 мая 2013 года

*Организаторы:* ГУ «Інститут патології позвоночника і суглобів ім. проф. М. І. Ситенко НАМН України»,  
Объединение граждан малоинвазивной и инструментальной хирургии позвоночника,  
под эгидой International Society for Minimal Intervention in Spine Surgery (ISMISS) / SICOT  
и при содействии American Academy of Minimally Invasive Spinal Medicine and Surgery  
(AAMISMS), Scoliosis Research Society (SRS)

**Программа:**

1. Внедрение новых методик в области малоинвазивной и инструментальной хирургии позвоночника.
2. Современная диагностика заболеваний позвоночника.

*В работе примут участие ведущие специалисты в области различных направлений патологии позвоночника из Швейцарии, Англии, Франции, Германии, США, Японии, Индонезии, Бразилии, Турции, России, Украины*

Рабочие языки: **украинский, русский, английский**

Оргкомитет: 61024, Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, 80  
Тел./факс: +38 (057) 715-63-05, 717-41-71, <http://srs.ismiss.smiss.kh.ua>