

*Бобровская К.В., Кравченко М.А., Бердников Р.Б.*

## **Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза, полученных из мокроты и операционного материала больных с туберкулемами легких**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург

*Bobrovskaya K.V., Kravchenko M.A., Berdnikov R.B.*

### **Drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* received from sputum and surgical material of patients with tuberculoma of lungs**

#### **Резюме**

Целью данного исследования было изучить лекарственную чувствительность *Mycobacterium tuberculosis*, полученных из мокроты и операционного материала больных с туберкулемами легких, молекулярно-генетическими и культуральными методами исследования. Проведено бактериологическое исследование операционного материала у 247 пациентов. На этапах терапевтического лечения 60,0% больных с туберкулемами легких не имеют данных о лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*. При исследовании резецированных участков легких *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью были обнаружены у 45,5% этих пациентов. Сравнение данных лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из мокроты и операционного материала, показало различие в 43,8% случаев. У 36,5% этих пациентов были найдены *Mycobacterium tuberculosis* со «скрытой» лекарственной устойчивостью, однако у 9,4% пациентов при исследовании мокроты были найдены ЛУ МБТ, а при исследовании операционного материала – МБТ с ЛЧ. **Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, операционный материал легкого, бактериологическая диагностика, биочип-диагностика, туберкулема легких

#### **Summary**

The aim of this study was to research drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* received from sputum and surgical material of patients with tuberculoma of lungs by molecular genetics and cultural methods. Bacteriological examination of surgical material from 247 patients was conducted. 60.0% of patients with tuberculoma of lungs did not have data about drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* at the stages of therapeutic treatment. *Mycobacterium tuberculosis* with multidrug resistance were found in 45.5% of the patients at research of surgical material. Comparison of data about drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from sputum and surgical material showed a difference in 43.8% of cases. *Mycobacterium tuberculosis* with the "hidden" drug resistance were found at 36.5% of the patients, however drug resistance strains were replaced by drug sensitive strains in 9.4% of patients.

**Keywords:** mycobacterium tuberculosis, drug resistance, surgical material from lung, bacteriological diagnostics, biochip-diagnostics, tuberculoma of lungs

#### **Введение**

Лекарственная устойчивость (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) является одной из причин неэффективного лечения туберкулеза. В Российской Федерации впервые выявленные больные с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) МБТ составляют от 6 до 15,7% [1].

Одним из эффективных способов лечения туберкулеза является резекция частей легких, пораженных туберкулезным процессом. ЛУ МБТ, наряду с другими факторами, отрицательно влияет на исходы оперативных

вмешательств [2]. Наличие устойчивости к 2 туберкулостатикам повышает вероятность реактивации туберкулеза в 1,5 раза, а сформировавшаяся устойчивость к 3 ПТП приводит к троекратному увеличению частоты неблагоприятного исхода. Кумулятивный показатель частоты послеоперационных рецидивов составляет 18,4% [3].

При этом, у значительного числа пациентов на этапах терапевтического лечения получить сведения о лекарственной чувствительности (ЛЧ) возбудителя к ПТП невозможно в силу ограниченности и олигобактериальности туберкулезного процесса и, как результат этого,

Таблица 1. Спектр устойчивости МБТ к основным ПТП,  
полученный методом абсолютных концентраций

Чувствительность/ устойчивость к ПТП	Количество культур Абс./%	Количество культур Абс./%
<b>Чувствительность</b>	-	-
Уст. к S	1 (2,2)	1 (2,2)
Уст. к R,S	2 (4,3)	8 (17,4)
Уст. к R,E,K	1 (2,2)	
Уст. к H,E,S	2 (4,3)	
Уст. к H,E,S,K	3 (6,5)	
Уст. к H,R,E	1 (2,2)	
Уст. к H,R,S	6 (13,0)	37 (80,5)
Уст. к H,R,S,K	4 (8,7)	
Уст. к H,R,E,S	18 (39,1)	
Уст. к H,R,E,S,K	8 (17,4)	
<b>Всего:</b>	<b>46 (100,0%)</b>	

пациентам назначается эмпирическое лечение без достоверной информации о наличии ЛЧ МБТ. Это увеличивает значимость бактериологического исследования резецированных участков легких у таких пациентов.

В связи с тем, что классические бактериологические методы обнаружения, идентификации и определения ЛЧ МБТ требуют длительного периода времени (до 3-х месяцев), а также весьма ресурсоемки, в последние годы активно применяются молекулярно-генетические методы, лишенные перечисленных недостатков [4-8].

**Цель работы:** изучить ЛЧ МБТ, полученных из мокроты и операционного материала больных с туберкулемами легких, молекулярно-генетическими и культуральными методами исследования.

## Материалы и методы

Проведено бактериологическое исследование резецированных участков легких у 247 пациентов с диагнозом туберкулема, получивших хирургическое лечение в клинике УНИИФ в 2010-2011 гг. Также проведено сравнение данных о ЛЧ МБТ, полученных из операционного материала, с ранее установленной ЛЧ возбудителя туберкулеза, выделенного из мокроты.

Нефиксированный резецированный материал в течение одного часа после операции в стерильных условиях подвергали первичному исследованию. При этом из операционного материала вырезали кусочки легкого, пораженного туберкулезным процессом, для культуральных и молекулярно-генетических исследований.

Микробиологическое исследование проводили согласно приказу МЗ РФ № 109 от 21.03.2003г. Оно включало люминесцентную микроскопию мазка и посев на плотную питательную среду Левенштейна-Йенсена осадка гомогенизированного и деконтаминированного кусочка операционного материала.

Изучение ЛЧ проводили методом абсолютных концентраций с использованием среды Левенштейна-Йенсена («Himedia Laboratories», Индия). Культуры *M. tuberculosis* классифицировали по ЛЧ и ЛУ к основным ПТП в соответствии с приказом МЗ РФ № 109 от 21.03.2003г (концентрация изониазида (H) – 1 мкг/мл, рифампицина (R) – 40 мкг/мл, этамбутола (E) – 2 мкг/мл, стрептомицина (S) – 10 мкг/мл, канамицина (K) – 30 мкг/мл).

Для амплификации специфической нуклеотидной последовательности IS6110 геномного материала методом ПЦР в режиме реального времени использовали тест-систему «АмплиСенс®МТС-FL» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) и амплификатор iCycler iQ5 (Bio-Rad, США). Для молекулярно-генетического исследования ЛЧ МБТ к изониазиду (H), рифампицину (R) и фторхинолонам (FQ) был использован метод гибридизации с флуоресцентным изображением на биологическом микрочипе «ТБ-БИОЧИП®» и «ТБ-БИОЧИП®-2» (ООО «Биочип-ИМБ», Москва). Анализ результатов гибридизации проводили на приборе «Чипдетектор-01» с использованием специализированного программного обеспечения «Imageware» (ООО «Биочип-ИМБ», Москва).

Диагноз «туберкулема легкого» был верифицирован гистологически.

Результаты исследований мокроты, полученные на этапах терапевтического лечения, были изучены ретроспективно по историям болезни.

## Результаты и обсуждение

При исследовании резецированных участков легких, полученных от 247 (100,0%) больных с туберкулемами легких, методом люминесцентной бактериоскопии КУМ были обнаружены в 140 (56,7%) образцах, при посеве на плотные питательные среды получены 46 (18,6%) культур и определена их ЛУ, методом ПЦР ДНК МБТ была выявлена у 242 (98,0%) пациентов.

Методом посева МЛУ МБТ была определена в 37 (80,5%) случаях, устойчивые МБТ к одному из препаратов I ряда – в 8 (17,3%) случаях, МБТ устойчивые к стрептомицину – в 1 (2,2%) случае. Чувствительных культур обнаружено не было. Спектр устойчивости к основным ПТП представлен в табл. 1

Методом «ТБ-Биочип» удалось определить наличие или отсутствие мутаций устойчивости к ПТП в 239 (96,8%) случаях. Как видно из табл. 2, в 165 (69,0%) случаях МБТ имели мутации, 74 (31,0%) не имели. В 43 (18,0%) случаях в геноме МБТ выявляли мутации в генах, ответственных за устойчивость к одному ПТП (H или R или FQ), а в 122 (51,0%) – мутации, ответственные за устойчивость одновременно к нескольким препаратам (H, R или H, R, FQ).

Таблица 2. ЛЧ МБТ, полученных из резецированных участков легких, определенная методом Биочип

Чувствительность/устойчивость к ПТП	Число штаммов абс./%	Число штаммов абс./%	Число штаммов абс./%
Чувствительность	74 (31,0)	74 (31,0)	74 (31,0)
Уст. к H	34 (14,2)	43 (18,0)	165 (69,0)
Уст. к R	6 (2,5)		
Уст. к FQ	3 (1,3)		
Уст. к H,R	104 (43,5)	122 (51,0)	
Уст. к H,R,FQ	18 (7,5)		
Всего:		239 (100,0)	

Таблица 3. Спектр выявленных мутаций в геноме МБТ, выделенных из резецированных участков легких

ПТП	Ген, регион	Кодон, № нуклеотидной позиции	АМК-замены, нуклеотиды	Число штаммов абс./%
Рифампицин	<i>rpoB</i>	531	Ser->Leu	102 (77,3)
			Ser->Cys	4 (3,0)
			Ser->Gln	1 (0,8)
			Ser->Trp	1 (0,8)
		526	His->Asn	4 (3,0)
			His->Leu	4 (3,0)
			His->Cys	2 (1,5)
			His->Asp	1 (0,8)
		516	His->Tyr	1 (0,8)
			Asp->Tyr	3 (2,2)
		511	Asp->Val	2 (1,5)
			Leu-> Pro	1 (0,8)
515	Met->Ile	4 (3,0)		
	533	Leu-> Pro	2 (1,5)	
Всего:			132 (100,0)	
Изониазид	<i>katG</i>	315	Ser->Thr(1)	146 (81,6)
			Ser->Gly	1 (0,6)
	<i>inhA</i>	8	T	22 (12,3)
			A	3 (1,7)
			G	1 (0,6)
	<i>ahp-oxvR</i>	10	G	2 (1,1)
			C->T	2 (1,1)
			C->T	1 (0,6)
6	C	1 (0,6)		
	Всего:			179 (100,0)
Фторхинолоны	<i>gyrA</i>	90	Ala->Val	9 (41,0)
		91	Ser->Pro	4 (18,2)
		94	Asp->Ala	4 (18,2)
			Asp->Gly	2 (9,1)
			Asp-> Asn	1 (4,5)
		95	Asp->His	1 (4,5)
Ser->Thr	1 (4,5)			
Всего:			22 (100,0)	

Спектр выявленных мутаций, определяющих ЛУ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, представлен в табл. 3. Как видно из таблицы, спектр мутаций в геноме МБТ, выделенных из операционного материала, представлен 14 мутациями, ответственными за ЛУ к рифампицину, 9 – к изониазиду и 7 – к фторхинолонам. В гене *rpoB* преобладала мутация Ser->Leu в 531-м кодоне (77,3%). В генах *katG* и *inhA*, в основном, определялись аминокислотная замена Ser->Thr(1) в 315-м кодоне (81,6%) и мутации в 8-й нуклеотидной позиции (14,6%), соответственно. В гене *gyrA* чаще всего встречалась мутация Ala->Val (41,0%) в 90-м кодоне. Полученные данные по частоте встречаемости мутаций совпадают с литературными данными.

Следует отметить, что среди исследованных изолятов МБТ, отнесенных к ЛУ (165), не было ни одного, имеющего мутации устойчивости одновременно во всех 5 возможных генах; в 4 генах мутации имели место в 1,8% случаев, в 3 генах – 19,4% в 2 генах – 54,0%, изолятов МБТ с сочетанными мутациями в одном гене было 3,6%.

При ретроспективном анализе результатов ранее проведенного исследования мокроты больные были разделены на 2 группы: без установленной ЛЧ и с известной ЛЧ МБТ. Группу № 1 составили 148 (60,0%) пациентов, группу № 2 – 99 (40,0%).

У пациентов 1 группы исследование резектатов легких молекулярно-генетическими методами позволило

определить ЛЧ возбудителя туберкулеза у 143 (96,6%) больных. МЛУ МБТ была обнаружена у 65 (45,5%) пациентов, из которых у 9 (6,3%) больных были МБТ с сочетанными мутациями устойчивости к H, R и FQ. Моноустойчивые штаммы выявлены у 19 (13,3%) пациентов, чувствительные у 59 (41,2%).

Из 99 пациентов, у которых на этапах терапевтического лечения ЛЧ МБТ была известна (группа № 2), результаты ЛЧ возбудителя туберкулеза, выделенного из операционного материала, удалось получить в 96 (97,0%) случаях. МЛУ МБТ была обнаружена у 57 (59,4%) пациентов, из которых у 9 (9,4%) больных были сочетанные мутации устойчивости к H, R и FQ. Моноустойчивые изоляты выявлены у 24 (25,0%) пациентов, чувствительные у 15 (15,6%). При сравнении полученных данных о ЛЧ МБТ, выделенных из операционного материала и мокроты, совпадения были найдены в 56,2% случаев, различия – в 43,8%. МБТ, выделенные из операционного материала, имели мутации устойчивости к изониазиду в 29 (51,8%) случаях, к рифампицину – в 16 (28,6%), мутации устойчивости к изониазиду не были обнаружены в 3 (5,3%) случаях, к рифампицину – в 8 (14,3%) по сравнению с МБТ, полученными из мокроты. У 36,5% (35) пациентов из 2 группы были найдены МБТ со скрытой ЛУ. Под «скрытой ЛУ» авторы понимают ЛУ МБТ, которая не была установлена при исследовании респираторного материала на терапевтическом этапе лечения пациента, но обнаружилась при исследовании операционного материала. В 9,4% (9) случаев при исследовании мокроты были выявлены ЛУ МБТ, а при исследовании операционного материала – МБТ с ЛЧ.

## Заключение

В результате проведенного исследования было выявлено, что 60,0% больных с туберкулемами легких на этапах терапевтического лечения не имеют данных о ЛЧ МБТ. Исследование ЛУ МБТ, полученных из резецированных участков легких, позволило обнаружить МБТ с МЛУ у 45,5% этих пациентов.

Сравнение данных ЛЧ МБТ, выделенных из мокроты, полученной на этапах терапевтического лечения, и операционного материала, показало различие в 43,8% случаев. У 36,5% этих пациентов были найдены МБТ со

«скрытой» ЛУ, однако у 9,4% пациентов при исследовании мокроты были найдены ЛУ МБТ, а при исследовании операционного материала – МБТ с ЛЧ.

МЛУ МБТ у больных с туберкулемами легких составила 51,0%.

Анализ операционного материала больных с туберкулемами легких на биочипах обнаружил широкий спектр мутаций в генах *M. tuberculosis*, связанных с ЛУ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, и продемонстрировал преобладание мутаций в 531 кодоне гена *groB* (Ser->Leu) в 77,3%, 315 кодоне гена *katG* (Ser->Thr(1)) в 81,6% и в 90 кодоне гена *gyrA* Ala->Val в 41,0% случаев.

Молекулярно-генетические методы исследования имеют большую разрешающую способность по сравнению с культуральными методами и позволяют выявить МБТ из операционного материала и установить их ЛЧ при туберкулемах легких в 5 раз чаще. Также молекулярно-генетические методы диагностики сокращают время выявления ЛЧ МБТ, что позволяет в короткие сроки скорректировать режим химиотерапии для лечения пациентов в послеоперационном периоде.

Таким образом, для адекватного и своевременного назначения режимов химиотерапии в послеоперационном периоде лечения больных с туберкулемами легких необходимо исследовать ЛЧ МБТ, выделенных из резецированных участков легких, молекулярно-генетическими методами. ■

*Бобровская Ксения Валерьевна* – младший научный сотрудник лаборатории диагностических и экспериментальных методов исследования ФГБУ «УНИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург.; *Кравченко Марионелла Анатольевна* – к.б.н., ст.н.с. и заведующая лабораторией диагностических и экспериментальных методов исследования ФГБУ «УНИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург.; *Бердников Роман Борисович* – к.м.н., ст.н.с. и заведующий патологоанатомическим отделением ФГБУ «УНИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург.; Автор, ответственный за переписку: *Бобровская К.В.* – 620039, г. Екатеринбург, ул. 22 партсъезда, 50, тел. (343)333-44-66, E-mail: kbobrovskaya@mail.ru

## Литература:

1. Туберкулез в Российской Федерации 2007 г. Аналитический обзор основных статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации М., 2008.
2. Головинский Р.Н., Григорян В.А., Мальцева В.И. Резекция легких у больных туберкулезом с лекарственной чувствительностью. Проблемы туберкулеза 2001; (9): 10-11.
3. Елькин А.В., Реткин Ю.М., Левашев Ю.Н. Хирургическое лечение послеоперационных рецидивов туберкулеза легких. Проблемы туберкулеза 2004; (2): 28-32.
4. Лабораторная диагностика туберкулеза. Использование молекулярно-генетических методов для выявления *M. tuberculosis* Под ред. Литвинова В.И., Мороза А.М. – М., 2001: 72-73.
5. Cheng V.C., Yew W.W., Yuen K.Y. Molecular diagnostics in tuberculosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 2005; 24 (11): 711-720.
6. Бобровская К.В., Камаев Е.Ю., Вахрушева Д.В., Кравченко М.А. Определение лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к рифампицину и изониазиду методом абсолютных концентраций и анализ мутаций на биологических микрочипах Омской научной вестник 2007; 84 (1): 9-13.
7. Васильева И.А., Черноусова Л.Н., Заседателей А.С. и др. Клиническое значение микрочиповой технологии определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Проблемы туберкулеза 2002; (6): 21-24.
8. Вахрушева Д.В., Кравченко М.А., Камаев Е.Ю. Результаты определения МЛУ микобактерий туберкулеза культуральным методом и методом биочипов. Туберкулез в России: Материалы VIII Российского съезда фтизиатров М., 2007; 118.