УДК 616.002.5

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЕЗЕЦИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ЛЕГКИХ И РЕСПИРАТОРНОГО МАТЕРИАЛА

Белоусова К.В., Кравченко М.А., Бердников Р.Б., Вахрушева Д.В., Скорняков С.Н., Еремеева Н.И.

Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения России, Екатеринбург, e-mail: kbobrovskaya@mail.ru

Цель данного исследования – провести сравнительный анализ клинически значимых биологических свойств (массивность и скорость роста, лекарственная чувствительность, генотипические особенности) *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резецированных участков легких и респираторного материала. Проведено культуральное (посев на плотную питательную среду с последующим определением лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций) и молекулярно-генетическое (ПЦР в режиме реального времени, Биочип, MIRU-VNTR-генотипирование) исследование мокроты, промывных вод бронхов и операционного материала от 291 больного туберкулезом легких. Микобактерии туберкулеза, полученные из респираторного материала на этапе хирургического лечения и из операционного материала больных туберкулезом легких, по изученным клинически значимым биологическим свойствам не отличались. При этом резецированные участки легких являются наиболее информативным материалом, позволяющим получить достоверные сведения о возбудителе туберкулеза непосредственно из очага туберкулезного поражения.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, операционный материал легкого, бактериологическая диагностика, биочип-диагностика, генотипирование

COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATED FROM SURGICAL AND RESPIRATORY MATERIAL

Belousova K.V., Kravchenko M.A., Berdnikov R.B., Vakhrusheva D.V., Skornyakov S.N., Eremeeva N.I.

Ural Research Institute for Phthisiopulmonology, Yekaterinburg, e-mail: kbobrovskaya@mail.ru

The aim of this study was to conduct comparative analysis of clinically significant biological properties (massiveness and rate of growth, drug susceptibility, genotype) of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from respiratory and surgical material. Bacteriological study of sputum and surgical material obtained from 291 patients with pulmonary tuberculosis was conducted. Cultural methods include inoculation of solid medium followed by determination of drug susceptibility by method of absolute concentration. Molecular genetics methods include «Real-time» PCR, Biochip and MIRU-VNTR-genotyping. *Mycobacterium tuberculosis* derived from respiratory material at stage of surgical treatment and surgical material from patients with pulmonary tuberculosis identical studied clinically significant biological properties. Surgical material is most informative material allows obtaining reliable information on the causative agent of tuberculosis directly from the focus tuberculosis lesions.

Keywords: mycobacterium tuberculosis, drug resistance, surgical material from lung, bacteriological diagnostics, biochip-diagnostics, genotyping

Проблема лекарственной устойчивости (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) приобрела в последнее время глобальное значение [6, 9]. Клиническое излечение у впервые выявленных больных с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) МБТ остается низким и составляет 34,6 %, что в три раза ниже уровня клинического излечения туберкулеза у больных с лекарственно чувствительным возбудителем туберкулеза [6].

Необходимость персонализированного подхода к выбору тактики лечения больного, основанного на получении своевременной и достоверной информации о клинически значимых биологических свойствах выделенного от него возбудителя туберкулеза, не вызывает сомнений. Однако вследствие снижения интенсивности бактериовыделения и жизнеспособности МБТ на этапах терапевтического лечения пациента или его исходной олигобактериальности традиционные методы выделения возбудителя из мокроты больного в значительной части случаев недостаточно информативны [3, 7]. Классические бактериологические методы обнаружения, идентификации и определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ длительны и весьма ресурсоемки. В связи с этим в последние годы приоритет отдается применению современ-

ных молекулярно-генетических методов, направленных на решение этих задач [2, 4].

Свойства возбудителя непосредственно в очагах туберкулезного поражения остаются малоизученными. Бактериологическое исследование резецированного участка легкого определяется необходимостью проведения послеоперационного курса химиотерапии у больного с учетом данных о возбудителе и его ЛЧ к ПТП [5, 8]. Очевидно, что комплексное лабораторное исследование резецированного участка, пораженного туберкулезом легкого, дает более полные сведения об особенностях патологического процесса, возбудителе заболевания, его видовой принадлежности и чувствительности к ПТП.

Цель исследования: провести сравнительный анализ клинически значимых биологических свойств (массивность и скорость роста, лекарственная чувствительность, генотипические особенности) *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резецированных участков легких и респираторного материала.

Материалы и методы исследования

Культуральными и молекулярно-генетическими методами исследовали двукратно мокроту и/или промывные воды бронхов ($n = 219$) (при возможности получения материала) непосредственно перед операцией и резецированные участки легких ($n = 291$) больных, перенесших хирургический этап лечения туберкулеза легких в УНИИ фтизиопульмонологии.

Всего было исследовано 510 образцов биологического материала и 102 культуры МБТ, полученных от 291 больного различными клиническими формами туберкулеза легких. У 259 (89,0% (95% ДИ 84,8–92,4%)) больных туберкулезом легких был установлен диагноз «туберкулема легкого», у остальных 32 (11,0% (95% ДИ 7,7–15,2%)) – «кавернозный» и «фиброзно-кавернозный туберкулез легких».

Культуральное исследование включало посев деконтаминированных осадков мокроты, промывных вод бронхов и гомогенизированных кусочков операционного материала на плотную питательную среду Левенштейна – Йенсена («Himedia Laboratories», Индия) с последующим определением ЛЧ МБТ методом абсолютных концентраций. Культуры *M. tuberculosis* по чувствительности к основным ПТП делили на ЛЧ и ЛУ в соответствии с приказом МЗ РФ № 109 от 21.03.2003 г. (концентрация изониазида – 1 мкг/мл, рифампицина – 40 мкг/мл, этамбутола – 2 мкг/мл, стрептомицина – 10 мкг/мл, канамицина – 30 мкг/мл).

Скорость роста рассматривали как интервал времени от посева до появления роста в пробирках. Появление колоний МБТ в срок до 30 дней считали быстрым ростом, от 30 до 50 дней – замедленным, свыше 50 дней – медленным ростом. Массивность роста – число колоний, выросших в пробирке. Скудным рост считали при массивности до 20 колоний (1+), умеренным – 21–100 колоний (2+), обильным – свыше 100 колоний (3+).

Обработку первичного материала для выделения ДНК проводили коммерческим набором «ДНК-сорб-В» («Амплисенс», Россия). Операционный материал предварительно гомогенизировали. Для амплификации специфической нуклеотидной последовательности IS6110 геномного материала методом полимеразной цепной реакции (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 мутаций ЛУ МБТ к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам 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).

Методом MIRU-VNTR типирования было исследовано 18 культур МБТ, полученных от 7 больных (7 изолятов, выделенных из операционного материала, и 11 изолятов, выделенных из респираторного материала этих же больных). Изоляты были генотипированы с использованием 7 локусов: MIRU10, MIRU26, MIRU31, Mtub21, ETRA, QUB26, QUB11b. Для постановки ПЦР использовали реактивы производства «Интерлабсервис» (Москва) и праймеры для ПЦР ООО «Синтол» (Москва). Принадлежность к генетической линии определяли путем сравнения полученных MIRU-VNTR профилей изолятов с имеющимися в базе данных «MIRU-VNTR*plus*» [1].

Результаты проведенных исследований статистически обработаны с использованием лицензионной компьютерной программы MedCalc® V12.6.1 (MedCalc Software, Бельгия). Для всех статистических критериев ошибка первого рода устанавливалась равной 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

При сравнительном анализе биологических свойств МБТ, полученных из различного материала, было установлено, что скорость роста МБТ ($n = 37$), выделенных из респираторного материала, составила 59 (15) суток; скорость роста МБТ ($n = 65$), выделенных из операционного материала, составила 56 (17) суток. Максимальный срок появления роста культур – 88 суток, минимальный – 21 сутки. В скорости роста культур МБТ, выделенных из респираторного и операционного материала, статистических различий не найдено ($p = 0,261$).

Вместе с тем массивность роста культур МБТ, полученных из респираторного и операционного материала, статистически различалась ($p = 0,01$). При посеве резецированных участков легких в 40,0% (95% ДИ 28,0–52,9%) (26 из 65) случаев отмечали умеренный рост, в 36,9% (95% ДИ 25,3–49,8%) (24 из 65) – обильный, в 23,1% (95% ДИ 13,5–35,2%) (15 из 65) – скудный. При посеве респираторного материала скудный рост отмечали в 69,4% (95% ДИ 51,8–83,6%) (26 из 37) случаев,

обильный – 19,5% (95% ДИ 8,2–36,1%) (7 из 37), умеренный – 11,1% (95% ДИ 3,1–26,0%) (4 из 37). Это, по-видимому, можно объяснить тем, что в операционном материале содержится большее количество МБТ, чем в респираторном материале.

Лекарственная чувствительность МБТ была определена методом абсолютных концентраций в 18,8% (95% ДИ 13,6–25,0%) (37 из 197) образцов респираторного материала и в 22,3% (95% ДИ 17,6–27,5%) (65 из 291) образцов операционного материала. С помощью метода биочипов было определено наличие или отсутствие мутаций, обуславливающих лекарственную устойчивость к ПТП, в геноме МБТ в 7,5% (95% ДИ 3,9–12,7%) (12 из 161) образцов респираторного материала и в 95,9% (95% ДИ 92,3–97,9%) (279 из 291) образцов операционного материала.

Сравнительный анализ ЛЧ МБТ, выделенных из операционного и респираторного материала, полученных на хирургическом этапе лечения методом абсолютных концентраций, удалось провести у 19 больных.

При сопоставлении результатов определения ЛЧ МБТ из резецированных участков легких (n = 19), с результатами ЛЧ МБТ из респираторного материала (n = 23), полученных от одних и тех же пациентов (n = 19) на хирургическом этапе лечения, методом абсолютных концентраций совпадение составило 100,0%.

У всех 19 больных были выявлены культуры МБТ с ЛУ. У 8 (42,1% (95% ДИ 20,2–66,5%)) пациентов были найдены МБТ с ЛУ к пяти ПТП (изониазиду, рифампицину, этамбутолу, стрептомицину и канамицину). У 6 (31,5% (95% ДИ 12,5–56,5%)) больных были выявлены МБТ с ЛУ к изониазиду, рифампицину, этамбутолу и стрептомицину. 2 (10,5% (95% ДИ 1,3–33,1%)) пациента имели МБТ с ЛУ к изониазиду, рифампицину, этамбутолу и канамицину. Культуры МБТ с ЛУ к изониазиду, рифампицину, этамбутолу и канамицину, а также культуры МБТ с ЛУ к изониазиду, рифампицину и стрептомицину были получены от 1 (5,3% (95% ДИ 0,13–26,1%)) больного каждая. Таким образом, у 18 (94,7% (95% ДИ 73,9–99,9%)) больных были обнаружены ЛУ МБТ к 2 основным ПТП I ряда (изониазиду и рифампицину), то есть имели МЛУ МБТ. Еще от 1 (5,3% (95% ДИ 0,13–26,1%)) больного была получена культура МБТ с ЛУ к изониазиду, этамбутолу, стрептомицину и канамицину.

Сравнительный анализ результатов определения наличия или отсутствия мутаций, обуславливающих ЛУ, в геноме МБТ, выделенных из операционного и респираторного материала, полученных на хирургическом этапе лечения, методом биочипов удалось провести только у 11 больных.

При сравнении результатов определения наличия или отсутствия мутаций в геноме МБТ, выделенных из респираторного материала (n = 12), с результатами определения наличия или отсутствия мутаций в геноме МБТ, полученных из резецированных участков легких (n = 11) одних и тех же пациентов (n = 11), методом биочипов совпадение составило 100,0%.

У 1 (9,1% (95% ДИ 0,2–41,3%)) из 12 больных и в респираторном, и в операционном материале была обнаружена ДНК МБТ, не содержащая мутаций в генах *rpoB, katG, inhA*, промоторной области *ahp-oxyR* и *gyrA*, в материале 10 (90,9% (95% ДИ 58,7–99,8%)) больных выявлялись мутации в указанных генах МБТ. В 9,1% (95% ДИ 0,2–41,3%) (1 из 11) случаев были обнаружены моноустойчивые МБТ, которые имели мутации в гене *inhA*, отвечающие за ЛУ к изониазиду. Сочетание мутаций в генах, ответственных за МЛУ МБТ, было обнаружено в 81,8% (95% ДИ 48,2–97,7%) (10 из 11) случаев, причем мутации, ответственные за ЛУ ко всем трем препаратам (рифампицину, изониазиду и фторхинолонам), были найдены в 63,6% (95% ДИ 30,8–89,1%) (7 из 11) случаев, мутации, обуславливающие ЛУ к рифампицину и изониазиду, были выявлены в 18,2% (95% ДИ 2,3–51,8%) (2 из 11) случаев.

Таким образом, МБТ, содержащиеся в респираторном материале, полученном на хирургическом этапе лечения, и операционном материале, по спектру ЛЧ не отличались.

Для подтверждения идентичности генотипов МБТ, выделенных из респираторного материала с генотипами МБТ, полученных из очага туберкулезного поражения, было проведено VNTR-генотипирование МБТ из респираторного и операционного материала. По результатам исследования все изученные изоляты *M. tuberculosis* отнесены к группе Beijing (100%) и разделены на 5 кластеров, которые имели следующие VNTR-профили по MIRU10, MIRU26, MIRU31, Mtub21, ETRA, QUB26, QUB11b: 3755476 (2 пациента), 3755486 (2), 3455466 (1), 3755466 (1), 3555486 (1).

При сравнении генотипов МБТ из операционного материала с генотипами МБТ из респираторного материала различий обнаружено не было. У всех пациентов был выявлен один генотип микобактерий. Таким образом, генотипы МБТ, выделенных при исследовании резектатов легких, по 7 локусам были идентичны генотипам МБТ, полученных при исследовании респираторного материала.

Заключение

Проведенное исследование показало, что МБТ, полученные из респираторного материала на этапе хирургического лечения и из операционного материала больных туберкулезом легких, по изученным клинически значимым биологическим свойствам (скорость роста, ЛЧ, генотип) одинаковы.

При этом резецированные участки легких являются более информативным материалом, позволяющим получить достоверные сведения о возбудителе туберкулеза непосредственно из очага туберкулезного поражения по сравнению с респираторным материалом на момент хирургического вмешательства, так как выявляемость МБТ из респираторного материала и, соответственно, определение их ЛЧ существенно ниже, чем из резектатов.

Таким образом, для адекватного и своевременного назначения режимов химиотерапии в послеоперационном периоде лечения больных с туберкулезом легких целесообразно исследовать ЛЧ МБТ, выделенных из резецированных участков легких.

Список литературы

1. База данных «MIRU-VNTRplus» (http://www.miru-vntrplus.org).

2. Барило В.Н. Ускоренное определение чувствительности M. tuberculosis к основным противотуберкулезным препаратам в системе «BACTEC MGIT 960» и на биочипах «ТБ-Биочип» / В.Н. Барило, А.В. Кузьмин, Л.Н. Черноусова, В.И. Голышевская // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2009. – № 11. – С. 56–60.

3. Бобровская К.В. Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза, полученных из мокроты и операционного материала больных с туберкулемами легких / К.В. Бобровская, М.А. Кравченко, Р.Б. Бердников // Уральский Медицинский журнал. – 2013. – № 2 (107). – С. 50–53.

4. Гаева Н.Д. Опыт применения тест-систем «ТБ-Биочип (МЛУ)» в Липецкой области / Н.Д. Гаева, О.В. Жилин, С.Р. Ивлева, О.А. Овчинникова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2010. – № 12. – С. 57–59.

5. Концепции химиотерапии и этиологической (микробиологической и молекулярно-биологической) диагностики туберкулеза в Российской Федерации на современном этапе: проект методических рекомендаций // Медицинский альянс. – 2013. – № 1. – С. 15.

6. Подгаева В.А., Канавина Н.В. Эпидемическая ситуация по туберкулезу и деятельности противотуберкулезной службы на Урале в 2013 году: стат. материалы / ФГБУ «УНИИФ» Минздрава России [под ред. С.Н. Скорнякова]. – Екатеринбург, 2014.

7. Репин Ю.М. Значение лекарственной устойчивости микобактерий в хирургии туберкулеза легких / Ю.М. Репин, А.О. Авестян, А.В. Елькин, Т.Ф. Оттен, Т.Б. Ряснянская, М.А. Трофимов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2001. – № 9. – С. 6–9.

8. Скорняков С.Н. Медико-социальная оценка и пути повышения результативности комплексного лечения ограниченных форм туберкулеза легких / С.Н. Скорняков, С.С. Карсканова, А.С. Мальцева, И.Я. Мотус, М.А. Кравченко // Фтизиатрия и пульмонология. – 2011. – № 1. – С. 5–10.

9. Global tuberculosis report 2013 // WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. – 2013. – P. 45–58.

References

1. Database «MIRU-VNTR*plus*» (http://www.miru-vntrplus.org).

2. Barilo V.N., Kuzmin A.V., Chernousova L.N., Golyshevskaya V.I. *Problemy tuberculeza I boleznei legkikh* (Problems of tuberculosis and lung disease). 2009, no. 11, pp. 56–60.

3. Bobrovskaya K.V., Kravchenko M.A., Berdnikov R.B. *Uralskiy medithinskiy zhurnal* (Ural Medical Journal). 2013, no. 2 (107), pp. 50–53.

4. Gaeva N.D., Zhilin O.V., Ivleva S.R., Ovchinnikova O.A. *Problemy tuberculeza I boleznei legkikh* (Problems of tuberculosis and lung disease). 2010, no. 12, pp. 57–59.

5. Draft of methodical recommendations *Kontseptsii khimioterapii I etiolodicheskoy (mikrobiologicheskoy I molecularno-biologicheskoy) diagnostiki tuberculeza v Rossiyskoy Federatsii na sovremennom etape* (Concept of chemotherapy and etiological diagnosis (microbiology and molecular biology) of tuberculosis in the Russian Federation at the present stage). Medical alliance. 2013, no. 1, pp. 15.

6. Podgaeva V.A., Kanavina N.V. *Epidemicheskaya situatsiya po tuberculezu I deyatelnosti protivotuberculeznoi sluzhby na Urale v 2013 godu: statisticheskie materialy* (The epidemiological situation of TB and TB service activities in the Urals in 2013. Statistical material). Urals research institute for phthisiopulmonology. Yekaterinburg, 2014.

7. Repin Yu.M., Avestyan A.O., Elkin A.V., Otten T.F., Ryasnyanskaya T.B., Trofimov M.A. *Problemy tuberculeza I boleznei legkikh* (Problems of tuberculosis and lung disease). 2001, no. 9, pp. 6–9.

8. Scornyakov S.N., Karskanova S.S., Maltseva A.S., Motus I.Ya., Kravchenko M.A. *Ftiziatriya I pulmonologiya* (Phthisiology and pulmonology). 2010, no. 1, pp. 5–10.

9. Global tuberculosis report 2013 // WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2013, pp. 45–58.

Рецензенты:

Мордовской Г.Г., д.м.н., заведующий отделом лабораторной диагностики Свердловского областного противотуберкулезного диспансера, г. Екатеринбург;

Чугаев Ю.П., д.м.н., профессор кафедры фтизиатрии и пульмонологии Уральского государственного медицинского университета, г. Екатеринбург.

Работа поступила в редакцию 15.09.2014.