

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЕЗЕЦИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ЛЕГКИХ, И АКТИВНОСТЬ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРОЦЕССА

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

ФГБУ «УНИИФ» Минздравсоцразвития РФ, г. Екатеринбург

DRUG RESISTANCE OF MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS ISOLATED FROM SURGICAL MATERIAL AND ACTIVITY OF TUBERCULAR PROCESS

Bobrovskaya KV, Kravchenko MA, Berdnikov RB

Urals research institute for phthisiopulmonology, Ekaterinburg

Резюме: Целью данного исследования было установить зависимость активности туберкулезного процесса от лекарственной чувствительности (ЛЧ) микобактерий туберкулеза (МБТ). Было проведено бактериологическое и гистологическое исследование резецированных участков легких у 261 пациента. Установлено, что при всех фазах туберкулезного процесса встречаются как чувствительные МБТ, так и МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). При активном туберкулезном процессе вероятность наличия ЛУ у МБТ высока, тем не менее, по фазе активности невозможно предсказать степень ЛУ МБТ.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, операционный материал легкого, бактериологическая диагностика, биочип-диагностика, фазы активности туберкулезного процесса.

Summary:

The aim of the study was to identify the dependence of drug sensitivity of Mycobacterium tuberculosis (MBT) on activity of tubercular process. Bacteriological and histological examination of surgical material of 261 patients was conducted. It was found that at all phases of tubercular process both sensitive

and multidrug resistant mycobacteria took place. Probability of drug resistance of MBT in active tubercular process is high however activity phase is impossible to estimate the degree of drug resistance.

Keywords: mycobacterium tuberculosis, drug resistance, surgical material from lung, bacteriological diagnostics, biochip-diagnostics, activity phases of tubercular process.

Введение: Резекции легких при туберкулезе весьма актуальны в настоящее время, когда устойчивость микобактерий туберкулеза к современным противотуберкулезным препаратам продолжает увеличиваться [1]. Однако у значительного числа пациентов на этапах терапевтического лечения получить сведения о лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам невозможно в силу ограниченности и олигобактериальности процесса.

Изучение резецированного участка легкого дает наиболее полные сведения об особенностях процесса, эффективности лечения, возбудителе заболевания, его видовой принадлежности и чувствительности к противотуберкулезным препаратам. Значение широкого бактериологического исследования резецированного участка легкого определяется необходимостью проведения послеоперационного курса химиотерапии с учетом данных о возбудителе и его чувствительности к противотуберкулезным препаратам.

В связи с тем, что классические бактериологические методы обнаружения, идентификации и определения ЛЧ МБТ занимают много времени, а также весьма ресурсоемки, в последние годы активно развиваются молекулярно-генетические методы, направленные на решение этих задач [2,3].

Цель исследования: выявить зависимость активности туберкулезного процесса от лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза, полученных из резецированных участков легких, определенной культуральными и молекулярно-генетическими методами.

Материалы и методы: было проведено бактериологическое и гистологическое исследование резецированных участков легких у 261 пациента, получавших хирургическое лечение по поводу туберкулеза легких в клинике УНИИФ в 2010-2011 гг.

Нефиксированный резецированный материал в течение одного часа после операции в стерильных условиях подвергали первичному исследованию. При этом из наиболее крупной туберкулемы или каверны (при наличии распада – из зоны распада) вырезали кусочки для культуральных и молекулярно-генетических исследований. В дальнейшем при патологоанатомическом исследовании из операционного материала вырезали 6-9 кусочков (1-2 из линии резекции, 3-4 из туберкулемы или стенки каверны, 2-3 из респираторной ткани).

Материал фиксировали в 10% забуференном формалине, для обезвоживания проводили по спиртам возрастающей концентрации, заливали в «Histomix». Срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, комбинированной окраской: пикрофуксин по Ван-Гизону + резорцин фуксин Вейгерта.

Различали следующие фазы активности туберкулезного процесса в операционном материале при туберкулемах: активная, умеренная (стихающая) и малоактивная; при кавернозном и фиброзно-кавернозном туберкулезе (ФКТ): активная фаза и фаза санирования.

Анализ лекарственной устойчивости (ЛУ) проводили методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Изоляты *M. tuberculosis* классифицировали по лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам, согласно приказу № 109 от 21.03.2003г. Также оценивали результаты бактериоскопии операционного материала.

Для амплификации специфической нуклеотидной последовательности IS6110 геномного материала методом ПЦР в режиме реального времени использовали тест-системы “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).

Результаты и обсуждение: Исследован операционный материал из резектатов легких 261 пациента, из которых у 232 (88,9%) имелись туберкулемы и у 29 (11,1%) - кавернозный и фиброзно-кавернозный туберкулез.

С помощью гистологических исследований была проведена верификация диагнозов и определены фазы активности туберкулезного процесса в операционном материале (Рис.1).

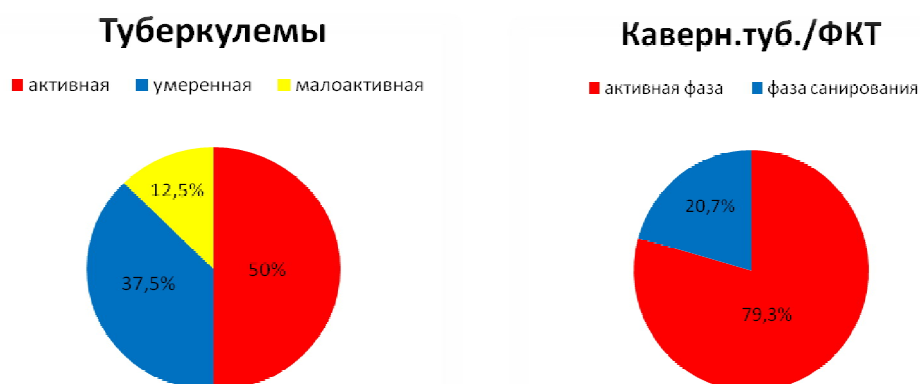


Рисунок 1 - Фазы активности туберкулезного процесса в резецированной части легкого

У больных с диагнозом «туберкулема» преобладала активная фаза туберкулезного процесса, которая выявлялась в 116 (50,0%) случаев, умеренная и малоактивная фазы - в 87 (37,5%) и 29 (12,5%) случаев соответственно. У больных ФКТ и кавернозным туберкулезом также преобладала активная фаза, которая составила 23 (79,3%) случая; фаза санирования составила 6 (20,7%) случаев. Данные по выявляемости МБТ из операционного материала различными методами представлены на рис.2.

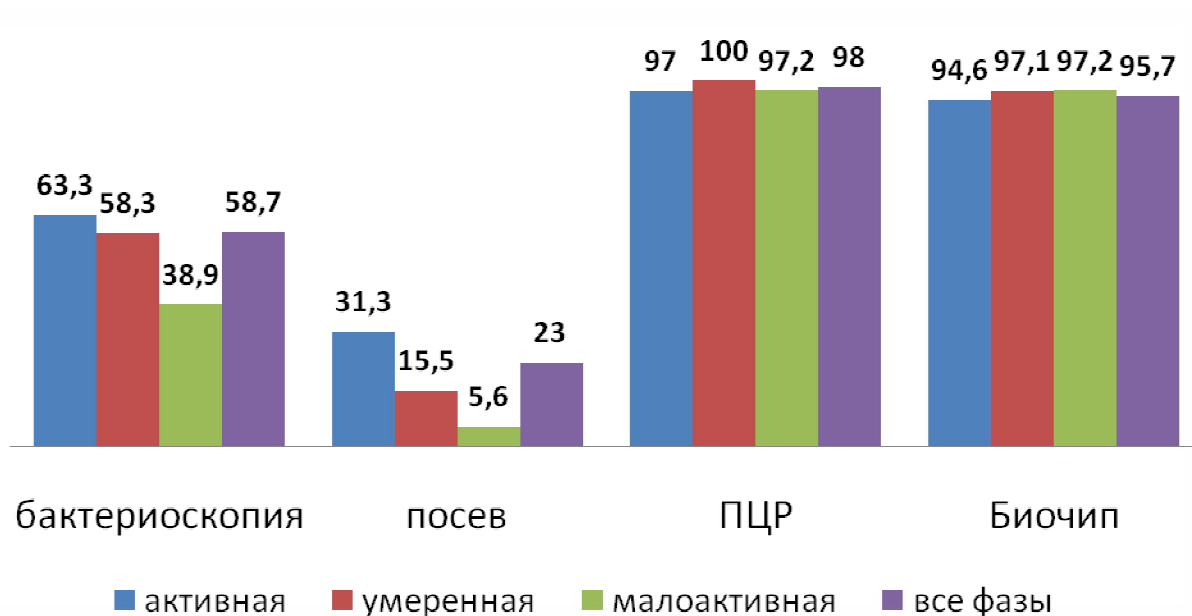


Рисунок 2 – Выявляемость МБТ из резектатов легких при разных фазах активности туберкулезного процесса культуральными и молекулярно-генетическими методами

Как видно из представленной диаграммы, молекулярно-генетические методы исследования имели большую разрешающую способность по сравнению с культуральными методами. МБТ методом бактериоскопии определялись в 58,7% случаев, посевом – 23,0%, Real-time PCR – 98,0%, Биочип-диагностикой – 95,7%. Была выявлена закономерность частоты высеваемости МБТ культуральными методами в зависимости от активности туберкулезного процесса: чем активнее процесс, тем выше жизнеспособность МБТ и, соответственно, их высеваемость.

Молекулярно-генетические исследования резектатов легких позволили выявить ДНК МБТ и определить мутации ЛУ возбудителя туберкулеза почти у всех пациентов. У 77 (29,5%) пациентов выявлены ЛЧ МБТ. Моноустойчивые МБТ обнаружены у 39 (15,0%) пациентов, и у всех из них имели место туберкулемы легких. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) МБТ была обнаружена у 145 (55,5%) больных.

Культуры МБТ с МЛУ, выявленные у 33 (22,8%) из 145 пациентов, имели устойчивость к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам. У больных с диагнозами «ФКТ» и «кавернозный туберкулез» культуры МБТ, устойчивые к 3 ПТП (H,R,FQ), встречались в 5 раз чаще, чем при туберкулемах.

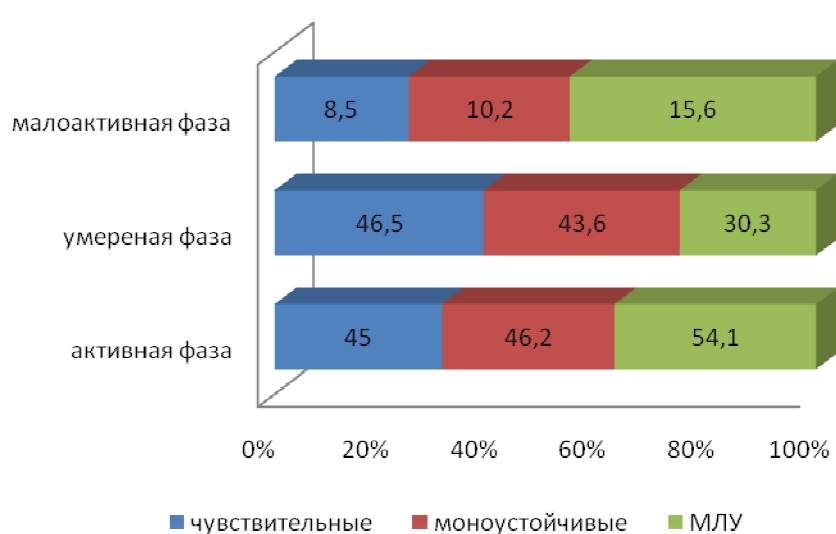
Результаты определения ЛЧ возбудителя туберкулеза обоими методами (и молекулярно-генетическим и культуральным) удалось получить только в 23,0% (n=66) случаев, при этом совпадение результатов составило 82,1% (n=55). Несовпадения результатов определения ЛЧ МБТ различными методами составили 17,9%. Методом Биочип удалось выявить МЛУ культур МБТ на 14% больше, чем культуральным методом.

Отличие между показателями ЛУ, определенными разными методами, на наш взгляд, может объясняться несколькими причинами:

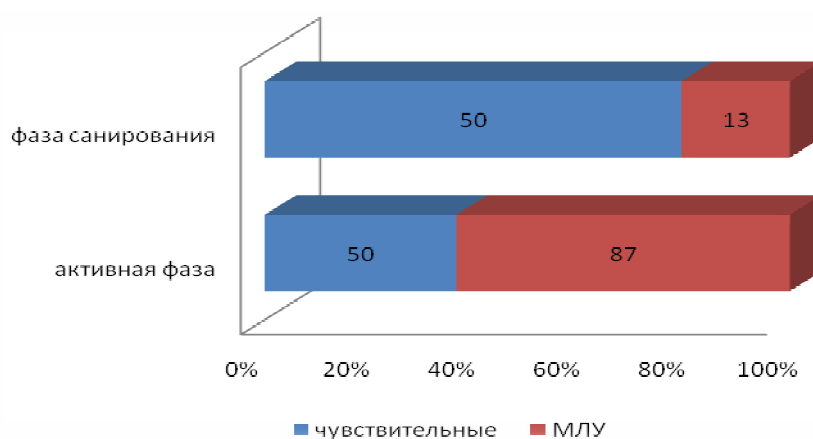
1. Не все известные мутации, ответственные за резистентность к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, можно выявить с помощью микрочипов, так как на них представлены дискриминирующие олигонуклеотиды для определения мутаций наиболее распространённого типа, а не всех возможных.
2. Не все мутации имеют фенотипическое проявление при культивировании штаммов на плотной питательной среде с указанными концентрациями противотуберкулезных препаратов.
3. При диагнозе «туберкулема» (Рис. 3а) преобладали МБТ с МЛУ, которые были выявлены в 52,6% (n=122) случаев от всех туберкулем. При этом в активных туберкулемах МЛУ МБТ обнаружены в 54,1% (n=66) случаев, в умеренных - в 30,3% (n=37), а в туберкулемах с минимальной активностью - в 15,6% (n=19). Моноустойчивые формы МБТ в туберкулемах встретились в 16,8% (n=39) случаев. В активной фазе туберкулезного процесса МБТ, устойчивые к одному ПТП, обнаружены в 46,2% (n=18) случаев, в фазе умеренной активности в 43,6% (n=17) и в фазе минимальной активности - в 10,2% (n=4). Лекарственная чувствительность МБТ установлена в 30,6% (n=71) случаев. В активной фазе туберкулезного процесса МБТ с лекарствен-

ной чувствительностью обнаружены в 45,0% (n=32) случаев, в фазе умеренной активности в 46,5% (n=33) и в малоактивной фазе в 8,5% (n=6).

4. При диагнозе «кавернозный туберкулез» и «ФКТ» (Рис.3б) также преобладали формы МБТ с МЛУ, которые составили 79,4% (n=23) случаев от общего количества каверн. В активной каверне МЛУ МБТ обнаружены в 87,0% (n=20) случаев, при фазе санирования - в 13,0% (n=3). Лекарственно чувствительные формы МБТ выявлены в 20,7% (n=6) случаев. И в активной фазе, и в фазе санирования МБТ с лекарственной чувствительностью обнаружены в 50,0% (по n=3) случаев.



а)



б)

Рисунок 3 – Результаты биочип-диагностики МБТ, полученных из резецированных участков легких. а) При диагнозе «туберкулема легкого». б) При диагнозе «ФКТ» и «кавернозный туберкулез»

Выводы:

1. Молекулярно-генетические методы диагностики позволяют сократить сроки выявления ЛУ МБТ и в короткие сроки скорректировать режим химиотерапии в послеоперационном периоде лечения пациентов.

2. При всех формах и фазах туберкулезного процесса встречаются как чувствительные, так и устойчивые МБТ. У больных с ФКТ и кавернозным туберкулезом устойчивые к 3 ПТП (H,R,FQ) МБТ встречались в 5 раз чаще, чем при туберкулемах.

3. При активном туберкулезном процессе вероятность наличия ЛУ у МБТ высока, тем не менее, по фазе активности невозможно предсказать степень ЛУ МБТ.

Литература

1. Казак Т.И., Трегубов Е.С., Бердников Р.Б. // Пробл. туб. и болезней легких. 2005. № 12. С. 32-34.
2. Лабораторная диагностика туберкулеза. / Под ред. В.И. Литвинова, А.М. Мороза // Использование молекулярно-генетических методов для выявления *M. tuberculosis*. С. 72-73.
3. Cheng V.C., Yew W.W., Yuen K.Y. Molecular diagnostics in tuberculosis // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2005. Vol. 24. № 11. P. 711-720.