

БАКТЕРИОЛОГИЯ

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИНФОРМАТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОГО И ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗНОМ СПОНДИЛИТЕ

Телицина Э.В., Камаева Н.Г., Вильданова Д.Р., Камаев Е.Ю., Гринберг Л.М.,
Дьячков И.А.

ФГБУ «УНИИФ» Минздрава РФ

Кафедра фтизиатрии и пульмонологии УГМУ

THE COMPARATIVE ESTIMATION OF INFORMATIVE OF CULTURE- AND PCR-EXAMINATIONS OF SURGICAL MATERIAL BY TUBERCULOSIS SPONDYLITIS

Telicina E., Kamaeva N., Vildanova D., Kamaev E., Dyachkov I.

Ural Research Institute for Phthisiopulmonology Ministry of Public health of
Russian Federation

Department of phthisiology and pulmonology Ural State Medical University

Резюме. Современные эпидемиологические условия по заболеваемости костным туберкулезом оцениваются как негативные. Костный туберкулез характеризуется олигобациллярностью, которая затрудняет этиологическую диагностику лекарственно устойчивого туберкулеза. Современные молекулярно-генетические методы диагностики позволяют проводить верификацию туберкулезного поражения костной ткани, получать быстрый и достоверный результат наличие и выраженность лекарственной устойчивости, что позволяет скорректировать химиотерапию туберкулеза. В данном исследовании было проведено сравнение результатов бактериологических и молекулярно-генетических методов этиологической верификации процесса при диагностированном туберкулезном спондилите. Таким образом, наше исследование демонстрирует, что ПЦР-исследование интраоперационного материала является наиболее чувствительным методом

среди остальных. При помощи ПЦР-исследования мы установили наличие лекарственной устойчивости в 55% случаев.

Ключевые слова: туберкулез, спондилит, PCR, HIV, MDR, DNA M. tuberculosis, биопсия

Summary. The modern conditions of epidemiological situation with incidence of bone tuberculosis are negative. Bone tuberculosis is characterizing a paucibacillary, which complicates the etiological diagnosis and drug-resistance verification. The modern molecular-genetic diagnosis lets to make the verification of tuberculosis lesion of bone tissue, get a fast reliable result about presence and range of drug-resistance that lets also to choose target chemotherapy. The aim of our study was to compare results of bacteriological and molecular-genetic methods of the etiological verification for morphologically diagnosed causes of tuberculosis spondylitis. So, our study is proving that the PCR-examination of surgical material more sensitivity than culture examination of one. However, PCR-examination revealed an about 55 percent of patients with multiple drug-resistance.

Keywords. Tuberculosis, spondylitis, PCR, HIV, MDR, DNA M. tuberculosis, operating biopsy.

Введение. В условиях сохраняющейся неблагоприятной эпидемиологической ситуации по туберкулезу заболеваемость костным туберкулезом остается высокой, а частота инвалидизации пациентов достигает 85%. Указанная ситуация обусловлена поздней диагностикой заболевания в связи с трудностями бактериологической и гистологической верификации. При малоактивной фазе туберкулезного воспаления гистологическое исследование биопсийного материала из-за слабой выраженности морфологических признаков не всегда позволяет достоверно подтвердить этиологию процесса [1]. Туберкулезное поражение костей характеризуется олигобациллярностью, что затрудняет этиологическую диагностику и определение лекарственной устойчивости возбудителя. Молекулярно-генетические методы диагностики дают возможность в

короткие сроки проводить достоверную этиологическую верификацию туберкулезного поражения костей и определить его лекарственную устойчивость, что позволяет своевременно и эффективно подобрать химиотерапию [2-4].

Цель исследования - сравнение результатов этиологической диагностики бактериологическими и молекулярно-генетическими методами исследования при морфологически диагностированном туберкулезном спондилите (ТС), оценка эффективности применения метода полимеразной цепной реакции для верификации туберкулезного поражения костей.

Материалы и методы исследования. В исследование вошел 121 пациент, пролеченный в ОКСТ УНИИФ за период 2007-2013 гг. по поводу морфологически подтвержденного диагноза ТС, при обязательном наличии бактериологического и ПЦР-исследований интраоперационного материала. При этом были выполнены следующие МГМ исследования:

1. Выявление ДНК микобактерий туберкулезного комплекса. В ходе исследования образцы подвергали процедуре пробоподготовки и экстракции ДНК с использованием тест-системы «АмплиСенс *Mycobacterium tuberculosis complex*–FL» (ИнтерЛабсервис, Москва). Гибридизационно-флуоресцентную детекцию осуществляли на амплификаторе iCycler iQ5 (Bio-Rad, США) с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» [2].

2. Выявление мутаций, детерминирующих лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам *M. tuberculosis complex* с помощью метода гибридизации с ДНК-зондами (мультиплексная амплификация лигазно-зависимых зондов) основанный на DNA•Strip® технологии (Hain Lifescience GmbH, Германия) [2].

3. Метод бактериологического исследования. Материал из очага костной деструкции подвергали исследованию согласно унифицированной методике бактериологического исследования микобактерий комплекса *M. tuberculosis*. Микробиологическое исследование операционного материала включало:

культуральное исследование (посев на плотные яичные среды Левенштейна-Йенсена и «Новая»); видовую идентификацию и определение лекарственной чувствительности выделенного возбудителя [2].

Результаты и их обсуждение. Клинико-anamнестическая характеристика пациентов, больных туберкулезным спондилитом. Среди 121 пациента количество мужчин составило: 76 (62,8%), женщин 45 (37,2%). Средний возраст женщин составил $41,3 \pm 13,8$ (21 год – 76 лет), мужчин – $40,7 \pm 10,5$ (24 года – 70 лет).

Большинство пациентов - 93,4% были в молодом трудоспособном возрасте (21-60 лет), 6,6% больных туберкулезным спондилитом заболели в более старшем возрасте. Средняя продолжительность периода от момента появления первых признаков заболевания до постановки диагноза составила $26,6 \pm 28,5$ месяцев (1 месяц – 12 лет) у мужчин и $30,4 \pm 36,1$ (2 месяца – 20 лет) у женщин. При изучении фоновой патологии пациентов с туберкулезным спондилитом 15,7% (n=19) больных страдали героиновой наркоманией. У 12,3% (n=15) выявлен гепатит С, в 3,3% (n=4) случаев наблюдалось сочетание спондилита с хроническими гепатитами В и С. Из 121 пациента 14,0% (n=17) ВИЧ-инфицированы. У 57% процентов поражение позвоночника сочеталось с другими локализациями туберкулезного процесса (Рисунок №1).

Выявление *M. tuberculosis* методом посева и методом ПЦР. При исследовании костных биоптатов пациентов с гистологически подтвержденным туберкулезным спондилитом 75,2% (n=91) образцов операционного материала обнаружена ДНК МБТ. Культуру МБТ из операционного материала удалось получить лишь в 24,8% (n=30) исследований. При сравнении чувствительности ПЦР-диагностики и исследования методом посева операционного материала больных туберкулезным спондилитом, шанс выявления возбудителя (*M. tuberculosis*) методом полимеразной цепной реакции в 9 раз выше, чем при посеве ($p < 0,0001$, ОШ=9,27). (Рисунок №2)

ПЦР-исследование операционного материала у 3% пациентов позволило выявить устойчивость к изониазиду, у 12% к рифампицину. У 55% пациентов выявлена множественная лекарственная устойчивость возбудителя. (Рисунок №3)

Выводы.

1. Туберкулезным спондилитом заболевают лица трудоспособного возраста, большинство из которых являются инвалидами и имеют тяжелую сопутствующую патологию, в том числе ВИЧ-инфекцию (14%), более чем у половины больных наблюдаются сочетанные внепозвоночные локализации туберкулезного процесса, у четверти больных туберкулезное поражение позвоночника является распространенным.

2. Молекулярно-генетическое исследование операционного материала от больных туберкулезным спондилитом обладает более высокой чувствительностью в сравнении с посевом, при этом шанс выявления возбудителя (*M. tuberculosis*) методом полимеразной цепной реакции в 9 раз выше, чем при посеве (74% и 24% соответственно, $p < 0,0001$, ОШ=9,27). Молекулярно-генетическое исследование операционного материала у 55% пациентов позволило выявить множественную лекарственную устойчивость возбудителя. Посев операционного материала от больных туберкулезным спондилитом позволяет получить культуру микобактерий в 24% исследований.

Литература

1. Камаев, Е.Ю. Этиологическая верификация туберкулезных спондилитов в различных фазах активности процесса / Е.Ю. Камаев, Р.Б. Бердников, Л.М. Гринберг, Н.Г. Камаева, С.Н. Скорняков // Уральский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С.54-59.

2. Приказ №951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания» от 29 декабря 2014г. – Москва, 2014. – 43 с.

3. Afanasev, M.V. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis isolates from the Russian Federation / M.V. Afanas'ev, L.N. Ikryannikova, E.N. Il'ina, V.M. Govorun, S.V. Sidorenko, A.V. Kuzmin, E.E. Larionova, T.G. Smirnova, L.N. Chernousova, E.Y. Kamaev, S.N. Skorniakov, V.N. Kinsht, A.G. Cherednichenko // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2007. – Vol. 59, №6. – P. 1057-1064.

5. Zhuravlev, V. Actual technologies in etiologic diagnostics of tuberculous spondylitis (TS). / V. Zhuravlev, G. Vasilieva, I. Vasilieva // *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. – 2011. – Vol. 15, № 11. – P. 269.