ISSN 2413-0346

МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
МОФ
МОСКОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ФТИЗИАТРОВ

Туберкулёз и социально значимые заболевания

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№ 2_2016

Научно-практический журнал

№ 2_2016

Туберкулёз и социально значимые заболевания

Номер свидетельства
ПИ № ФС 77 – 54449 от 17.06.2013

Адрес редакции:
МОО «Московское общество фтизиатров»
107014, г. Москва,
ул. Стромынка, д. 10

Главный редактор
Богородская Е.М.

Ответственный секретарь
Слогоцкая Л.В.

Зав. редакцией
Дудина А.Г.
Тел. +7 (916) 972-37-76
E-mail: mostubjournal@mail.ru

Ответственный за выпуск
Литвинов В.И.

Оригинал-макет и компьютерная верстка –
ООО «Ин Тренд».

Служба рекламы и подписки
Тел. +7 (925) 183-46-48
E-mail: tubmagazine@gmail.com

Журнал предназначен для специалистов в области медицинской и фармацевтической деятельности.

Языки: русский, английский

Издатель – ООО «Ин Тренд»
Адрес: 105082, г. Москва,
ул. Большая Почтовая, д. 26В, стр. 1

Отпечатано в типографии
ООО «Лига-Принт»
Тираж 3000 экз.

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Все права защищены.
Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Редакционная коллегия:

Главный редактор – **Богородская Е.М.**, *д.м.н., директор ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы», главный внештатный специалист фтизиатр ДЗ г. Москвы*

Аксенова В.А. – *д.м.н., профессор, заведующая отделом туберкулеза у детей и подростков НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», главный внештатный детский специалист фтизиатр Минздрава России*

Борисов С.Е. *(зам. главного редактора) – д.м.н., профессор, заместитель директора по научно-клинической работе ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы»*

Белевский А.С. – *д.м.н., профессор, профессор кафедры пульмонологии факультета ДПО ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России», главный внештатный пульмонолог ДЗ г. Москвы*

Брюн Е.А. – *д.м.н., профессор, директор ГБУЗ «Московский научно-практический центр наркологии ДЗ г. Москвы», главный внештатный специалист нарколог ДЗ г. Москвы, главный нарколог Минздрава России*

Зубань О.Н. – *д.м.н., профессор, зам. главного врача по медицинской части ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы»*

Литвинов В.И. – *академик РАН, д.м.н., профессор, научный руководитель ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы»*

Мазус А.И. – *д.м.н., руководитель «Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИДом», главный внештатный специалист по проблемам диагностики и лечения ВИЧ-инфекции ДЗ г. Москвы*

Малышев Н.А. – *д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова» Минздрава России*

Пучков К.Г. – *д.м.н., профессор, заместитель главного врача по педиатрии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы»*

Плавунов Н.Ф. – *д.м.н., профессор, главный врач ГБУ «Станция скорой и неотложной медицинской помощи им. А.С. Пучкова» ДЗ города Москвы, главный внештатный специалист ДЗ г. Москвы по скорой, неотложной медицинской помощи и медицине катастроф*

Потекаев Н.Н. – *д.м.н., профессор, первый заместитель руководителя ДЗ г. Москвы, главный внештатный специалист ДЗ г. Москвы по дерматологии и косметологии*

Севостьянова Т.А. – *к. м. н., зав. детским консультационно-диагностическим отделением ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы», заместитель главного внештатного специалиста фтизиатра по педиатрии ДЗ г. Москвы*

Сельцовский П.П. – *д.м.н., профессор, зам. директора по научной и организационно-методической работе ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы», зав. кафедрой фтизиатрии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»*

Слогоцкая Л.В. *(ответственный секретарь) – д.м.н., заведующая научно-клиническим отделом, ученый секретарь ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом ДЗ г. Москвы»*

Научный редактор:
Борисов С.Е.

СОДЕРЖАНИЕ

ОТ РЕДАКЦИИ

3 К юбилею Виталия Ильича Литвинова

АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ФТИЗИАТРИИ

5 «Дремлющие» микобактерии, дормантные локусы, латентная туберкулезная инфекция
В.И. Литвинов

ВЫЯВЛЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗА

14 Эффективность выявления туберкулеза микробиологическими методами в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах
В.А. Краснов, А.Г. Чередниченко, О.В. Ревякина, Т.И. Петренко

19 Выявление эпидемиологически значимых вариантов возбудителя туберкулеза в клиническом материале
Т.В. Умпелева, Л.А. Голубева, Л.С. Лавренчук, Н.И. Еремеева, М.А. Кравченко

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА

24 Одновременное определение генетических детерминант широкой лекарственной устойчивости и генотипирование *M. tuberculosis* с помощью гибридизационного анализа на биочипах
Е.Ю. Носова, А.А. Хахалина, А.И. Исакова, К.Ю. Галкина, М.А. Краснова, М.В. Макарова, Л.Ю. Крылова, С.Г. Сафонова

33 Влияние мутаций, связанных с устойчивостью к рифампицину, на «фитнес» штаммов *M. tuberculosis*
С.Н. Андреевская, И.Ю. Андриевская, Е.А. Киселева, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, Л.Н. Черноусова, А.Э. Эргешов

38 Характеристика штаммов *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью с помощью тест-системы Sensititre MycoTB (предпосылки для внесения корректив в лечение больных туберкулезом с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя)
М.В. Макарова, Л.Ю. Крылова, Е.Ю. Носова, В.И. Литвинов

44 Бактериальная нагрузка респираторного и операционного материала при туберкулезе органов дыхания с сохраненной лекарственной чувствительностью, множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя
Б.И. Вишневский, О.А. Маничева, Н.Н. Мельникова, М.З. Догонадзе, Л.Н. Стеклова, А.И. Иноземцева

49 Лабораторная диагностика легочного аспергиллеза у больных туберкулезом органов дыхания: алгоритм исследований и критерии интерпретации получаемых результатов
А.Б. Кулько

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

54 К механизмам регуляции туберкулезного воспаления
В.Я. Гергерт, В.В. Еремеев

59 Возможность формирования устойчивости моноцитарных и эпителиальных клеток к рифампицину
М.В. Ерохина, Л.Н. Лепеха, А.Э. Эргешов

ТУБЕРКУЛЕЗ И ВИЧ-ИНФЕКЦИЯ

66 Результаты применения иммунологических методов диагностики туберкулеза *in vivo* и *in vitro* у больных ВИЧ-инфекцией
Т.В. Ванеева, Н.В. Куликовская, М.А. Краснова, Г.В. Бондаренко, И.В. Рыманова, А.Л. Собкин, С.Г. Сафонова

ТУБЕРКУЛЕЗ И СОПУТСТВУЮЩАЯ ПАТОЛОГИЯ

72 Патологоанатомическая характеристика антибиотикоассоциированных поражений кишечника при противотуберкулезной терапии
Ю.Р. Зюзя

ХРОНИКА

78 Протокол заседания Межрегиональной общественной организации «Московское общество фтизиатров», посвященного теме «Латентная туберкулезная инфекция» от 11 июня 2015 г.

82 Юбилей профессора А.В. Елькина

Редакционный совет:

Елькин А.В. – *д.м.н., профессор, зав. кафедрой фтизиопульмонологии и торакальной хирургии ФГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»*

Кравченко А.Ф. – *д.м.н., профессор, директор ГБУ Научно-практический центр «Фтизиатрия» Минздрава Республики Саха (Якутия)*

Малиев Б.М. – *д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «Республиканский противотуберкулезный диспансер» Минздрава Республики Северная Осетия-Алания, главный фтизиатр Минздрава Республики Северная Осетия-Алания*

Малыхина Т.И. – *к. м. н., зам. главного врача по организационно-методической работе ОГКУЗ «Противотуберкулезный диспансер», г. Белгород*

Морозова Т.И. – *д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «Саратовский областной противотуберкулезный диспансер», зав. кафедрой фтизиатрии ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»,*

Скорняков С.Н. – *д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России»*

Шилова М.В. – *д.м.н., профессор кафедры фтизиопульмонологии и торакальной хирургии им. академика М.И. Перельмана ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»*

К ЮБИЛЕЮ ВИТАЛИЯ ИЛЬИЧА ЛИТВИНОВА

Глубокоуважаемые, дорогие коллеги!

В этом номере журнала опубликованы статьи, в которых изложены результаты лабораторных исследований. Их задачи разные – развитие методических основ лабораторной диагностики, использование данных, полученных лабораторными методами, для решения клинических и эпидемиологических проблем. Есть и некоторые работы, результаты которых позволяют глубже понять какие-то аспекты патогенеза туберкулеза. Все эти статьи, бесспорно, говорят о том, что лабораторные исследования при туберкулезе являются важнейшим компонентом фтизиатрической науки и практики.

Благодарю всех коллег, приславших статьи в этот номер, который приурочен к моему юбилею.

Успехов Вам, В.И. Литвинов

4 июля 2016 года Виталию Ильичу Литвинову исполняется 75 лет и отмечается 50-летие его трудовой деятельности во фтизиатрии.

В.И. Литвинов – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ.

Родился 4 июня 1941 года в г. Харькове. В 1964-м окончил лечебный факультет Саратовского медицинского института, затем в течение полутора лет работал патологоанатомом и судмедэкспертом в Мордовской АССР. В 1966 году поступил на работу в Центральный НИИ туберкулеза РАМН. Его наставником и руководителем стал выдающийся ученый и замечательный человек Михаил Михайлович Авербах.

Научная деятельность В.И. Литвинова складывалась успешно. Первые его исследования были посвящены иммунологическим аспектам противотуберкулезной вакцинации. Он начал заниматься иммунологией вакцинного процесса. В 1970 году защитил кандидатскую диссертацию на тему «Иммунология вакцинного процесса, вызываемого BCG» и опубликовал книгу «Иммунобиологические основы противотуберкулезной вакцинации». В последующем он занялся изучением роли повышенной чувствительности замедленного типа как одного из основополагающих механизмов защиты от туберкулезной инфекции и спустя четыре года после защиты кандидатской диссертации защитил докторскую, став доктором наук в 33 года. В.И. Литвиновым были проведены исследования в области межклеточного взаимодействия и иммуногенетики туберкулеза и других инфекций, разработан ряд методов иммунодиагностики туберкулеза и других болезней легких и инфекционных заболеваний, получены диагностические препараты – антигены и антитела (в т.ч. моноклональные) для иммунодиагностики туберкулеза и идентификации микобактерий разных видов.

В 1997 году В.И. Литвинов завершил свою деятельность в Центральном НИИ туберкулеза РАМН в должности заведующего отделом иммунологии и лабораторией биотехнологии.

С 1997-го по 2012 год В.И. Литвинов был директором Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы, а с 2012 года является научным руководителем центра.

Во время работы в МНПЦ борьбы с туберкулезом приоритетами в научных исследованиях В.И. Литвинова всегда были разработка и применение микробиологических, молекулярно-генетических, иммунологических методов выявления и идентификации туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, а также эпидемиология туберкулеза. Он принимал активное участие в разработке тестов для выявления, идентификации микобактерий и определения их лекарственной чувствительности (наборы реагентов «ТБ-БИОЧИП»). За эти исследования В.И. Литвинов с коллективом авторов удостоен премии города Москвы в области медицины за 2003 год.

При активном участии В.И. Литвинова был создан новый диагностический препарат для внутрикожного введения (ДИАСКИНТЕСТ®) – рекомбинантный белок, который присутствует только в вирулентных, размножающихся микобактериях туберкулеза и отсутствует в вакцинном штамме BCG. Его применение позволяет выявить наличие активной туберкулезной инфекции и проводить дифференциальную диагностику с заболеваниями нетуберкулезной природы и поствакцинальной аллергией. Под его руководством были проведены клинические исследования, подтверждавшие эффективность теста, что позволило рекомендовать его для внедрения в Российской Федерации. За эту работу В.И. Литвинов вместе с коллективом исследователей был удостоен премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники за 2011 год и международной премии Галена за 2014 год.

Итогом деятельности В.И. Литвинова этого периода стали две монографии по лабораторной диагностике туберкулеза, две – посвященные изучению нетуберкулезных микобактерий и две монографии по эпидемиологическим и социальным проблемам туберкулеза.

Проведенные В.И. Литвиновым и сотрудниками эпидемиологические исследования и совершенствование противотуберкулезной работы позволили разработать программу неотложных противотуберкулезных мероприятий в Москве, проводить организационные мероприятия, направленные на совершенствование деятельности фтизиатрической службы города. Все это в значительной мере сыграло роль в стабилизации эпидемической обстановки по туберкулезу в Москве.

В настоящее время В.И. Литвинов большое внимание уделяет вопросам иммунологии, в частности, диагностике латентной туберкулезной инфекции, которые особенно актуальны в период спада туберкулезной эндемии. Такие исследования стали возможны благодаря появлению новых диагностических тестов, основанных на иммунном ответе на специфичные для микобактерий туберкулеза белки – это лабораторные тесты оценки продукции интерферона-гамма и кожные пробы с препаратом Диаскинтест®. Этому вопросу посвящена его монография «Латентная туберкулезная инфекция», изданная в 2015 году.

В 1987 году В.И. Литвинову присвоено звание профессора, в 1995 году – члена-корреспондента РАМН по специальности «аллергология и иммунология», в 2003-м он стал действительным членом РАМН и в 2006-м – избран заместителем академика-секретаря отделения профилактической медицины РАМН.

Результаты исследований В.И. Литвинова защищены 20 патентами и авторскими свидетельствами. По этим материалам опубликованы более 400 научных работ, в том числе три руководства и 33 книги (две из которых изданы за рубежом).

В.И. Литвинов создал свою научную школу – он был руководителем и научным консультантом при выполнении 26 докторских и 49 кандидатских диссертаций, авторы которых трудятся в настоящее время в России и за рубежом. Деятельность В.И. Литвинова отмечена орденом Дружбы.

В.И. Литвинов – член редколлегии журналов «Туберкулез и социально значимые заболевания», «Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика», специализированного Совета по проблемам фтизиатрии и пульмонологии (при Центральном НИИ туберкулеза).

Свой 75-летний юбилей В.И. Литвинов отмечает множеством творческих планов и начинаний.

Мы желаем ему воплощения его творческих замыслов, здоровья, благополучия!

Члены Московского общества фтизиатров

Коллектив ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Редакционная коллегия научно-практического журнала «Туберкулез и социально значимые заболевания»

УДК 616-002.5-08(66)

«ДРЕМЛЮЩИЕ» МИКОБАКТЕРИИ, ДОРМАНТНЫЕ ЛОКУСЫ, ЛАТЕНТНАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ

В.И. Литвинов

ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

«DORMANT» MYCOBACTERIA, DORMANT LOCI, LATENT TUBERCULOSIS INFECTION

V.I. Litvinov

Обзор посвящен описанию исследований, характеризующих современное состояние проблемы латентной туберкулезной инфекции. Особое внимание уделено описанию особенностей возбудителя в латентном («дремлющем») состоянии и реакции макроорганизма на «дремлющие» микобактерии (дормантные локусы, реакции макрофагов и др.).

***Ключевые слова**: латентная туберкулезная инфекция, «дремлющие» микобактерии, дормантные локусы*

The review is dedicated to the description of studies that characterized the current state of the problem of latent TB infection. Particular attention is paid to the description of features of the pathogen in a latent («dormant») state and response of host organism to «dormant» mycobacteria (dormant loci, the reaction of macrophages and others).

***Keywords**: latent TB infection, dormant mycobacteria, dormant loci*

Латентная туберкулезная инфекция (ЛТИ) сегодня едва ли не самая обсуждаемая во фтизиатрии проблема. Частично это обусловлено представлениями о том, что ЛТИ – практически значимое состояние, опасное в плане развития полноценного (манифестного активного) туберкулеза, а частично просто красивым термином, который используют люди, мало понимающие, о чем идет речь.

Для того чтобы говорить о наличии латентной туберкулезной (да и любой другой) инфекции, надо как минимум иметь в организме инфект (возбудитель). Но сколь скоро мы имеем дело с полноценным возбудителем – в данном случае *M. tuberculosis*, то это никакая не латентная, а обычная инфекция, и если мы его не находим в период обследования, то найдем позже или по крайней мере обнаружим проявления его жизнедеятельности. И, действительно, например, у детей с «проявлениями» такой «латентной» инфекции часто при использовании компьютерной томографии обнаруживают изменения, характерные для туберкулеза [6].

Однако вполне вероятно, что существуют ситуации, когда никаких подобных изменений не обнаруживают, а диагноз латентной туберкулезной инфекции ставят на основании признаков, о соответствующей трактовке которых фтизиатры более или менее дружно договорились.

Дремлющие микобактерии, дормантные локусы. Предполагается, что латентная туберкулезная инфекция может быть связана с «дормантным» (дремлющим) состоянием микобактерий. Однако что это такое?

Разные исследователи высказывали различные мнения о природе «дремлющих» микобактерий. Некоторые считали, что эти микобактерии персистируют в особых L- или фильтрующихся формах, другие – что это «полноценные» микобактерии, но в так называемом латентном (дормантном) состоянии, неразмножающиеся или слабо размножающиеся, третьи – что присутствуют самые обычные туберкулезные микобактерии (но в незначительном количестве), не способные ни вызвать патологию, ни индуцировать полноценный иммунный ответ [1, 2, 3, 8, 30, 31, 33, 34, 35].

В литературе широко обсуждается физическая и метаболическая природа того, что происходит в таких персистирующих (латентных) микобактериях.

M. tuberculosis «отдают» большую часть своего генома функциям, направленным на внутриклеточное выживание при проникновении в клетки млекопитающих, в том числе (а скорее, в первую очередь – *авт.* [1]) макрофаги [7, 30].

Имеется много работ, в какой-то мере свидетельствующих о том, что *M. tuberculosis* может под влиянием внешних (в первую очередь в макрофагах) воздействий существенно менять свой «метаболический репертуар» и впадать в нереплицирующееся состояние [14, 30, 41].

После попадания в фагосому патогенные бактерии оказываются под воздействием ряда факторов, направленных на их уничтожение. К таким факторам можно отнести слияние фагосомы с лизосомами, синтез реактивных радикалов кислорода и азота, в особенности оксида азота. Гибель микобактерии внутри макрофага может осуществляться с помощью нескольких механизмов, в результате сложных, опосредованных цитокинами взаимодействий между лимфоцитами и фагоцитами. Возможно, что умение микобактерий избегать токсических действий реактивных радикалов кислорода и азота является ключевым этапом перехода к латентной стадии инфекции. В ситуации, способствующей развитию дормантного состояния микобактерий, замедляется внутриклеточный метаболизм, редуцируется напряжение кислорода (гипоксия), ограничивается потребление железа, происходит потеря питательных веществ, определяется низкая pH и отмечается усиление продукции окисей азота и моноксида углерода [10, 22, 30, 33, 56].

Есть также некоторые данные, свидетельствующие о том, что *M. tuberculosis*, благодаря оксидации миколовых кислот клеточной стенки, стимулируют дифференциацию макрофагов в пенистые макрофаги, в которых через дисрегуляцию поглощения липопротеинов низкой плотности развивается множество внутриклеточных липидных телец, обеспечивающих микобактерии углеродом и энергией. Кроме того, у пенистых макрофагов повреждена фагоцитарная бактерицидная функция, и, следовательно, обеспечивается ниша для персистенции микобактерий [23, 42, 47].

Способность макрофагов подавлять рост *M. tuberculosis* зависит от стадии активации клетки и от баланса цитокинов. Так, Т-клетки-эффекторы продуцируют преимущественно ИФН-γ, эффекторы памяти – одновременно ИФН-γ и ИЛ-2, а клетки центральной памяти – ИЛ-2. В связи с этим необходимо подчеркнуть, что при активном туберкулезе большинство антигенспецифических Т-клеток являются эффекторами, а при ЛТИ – клетками центральной памяти [13, 19, 30, 34, 37, 49].

Т-клеточный иммунный ответ на определенные антигены (АГ) ассоциируется с дормантной стадией *M. tuberculosis*, и он может быть важным, если не основным, в развитии и течении латентной инфекции (и в ее диагностике) [9, 20, 26, 27, 30, 33, 43, 46].

Многие исследования по сопоставлению различных параметров ЛТИ и активного туберкулеза были выполнены в эксперименте (на мышах и обезьянах). Но у мышей развивается скорее хроническая, чем латентная инфекция, а что касается обезьян, то у них инфекция действительно может быть сходной с таковой у человека. Экспериментальные исследования на обезьянах в значительной мере позволили охарактеризовать структуру гранулем и изменения в процессе прогрессирования заболевания. ЛТИ у них, как правило, ассоциируется с небольшим количеством ограниченных гранулем, с минимальным (или без) вовлечением внутригрудных лимфатических узлов. Активное заболевание характеризуется большим количеством диссеминированных казеозных гранулем, которые инвазируют сосуды и бронхи/бронхиолы. В гранулемах (часто с казеификацией) при активном туберкулезе определяется бóльшее количество $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов (100-кратное увеличение) и бóльшая пропорция Т-клеток с экспрессией хемокиновых рецепторов (CCR5 и CXCR). Различия также касаются антигенспецифического иммунного ответа. Так, число Т-клеток, продуцирующих ИФН-γ в ответ на антигены ESAT-6 и CFP-10, существенно выше в легких обезьян с активной, чем латентной инфекцией [10, 12, 33, 56, 59].

Геном *M. tuberculosis* был секвенирован и расшифрован S. Cole и соавт. [15], он состоит из 4 411 532 пар азотистых оснований, насчитывает 4012 генов, функция большинства из которых установлена.

Как уже было сказано выше, выживание *M. tuberculosis* в дормантном состоянии (DOS – *dormancy survival*) обусловлено гипоксией (конечно, в сочетании с целым рядом других метаболических изменений). Нахождение микобактерий в этом состоянии кодируется Dos-регулоном [41], затем следует индукция целого ряда генов, в первую очередь *Enduring Hypoxic Response* (EHR) – регулона длительной гипоксии; они усиливают и пролонгируют гипоксию и, вероятно, выживание в дормантном состоянии [48].

Регуляция экспрессии генов необходима для рационального использования ресурсов клетки. Для организации микобактериальных генов, впрочем, как и для всех прокариот, характерна оперонная модель. Оперон – это транскрипционная единица, с которой считывается информация о ферментах, структурных и регуляторных белках и т. д. В свою очередь несколько оперонов, находящихся в разных частях кольцевой хромосомы и управляемых одним и тем же регулятором объединяют в регулон. Активация регулона включает координированную работу нескольких оперонов, выполняющих общую функцию [5].

[1] Здесь и далее: *авт.* – замечания автора настоящего обзора.

Регуляторная система DosR-DosS (DosRST), состоящая из двух сенсорных киназ DosS (Rv3132c) и DosT (Rv2027c) и регулятора ответа DosR (Rv3133c), является регулоном дормантности [5, 41, 53].

Обе киназы – DosS и DosT – чувствительны к оксиду азота. В то же время показано, что функция DosT наиболее значима на ранних стадиях гипоксии, а при нарастании дефицита кислорода только DosS индуцирует регулон дормантности. Как и другие двухкомпонентные системы, оперон *dosRS* авторегулируется. В геноме *M. tuberculosis* этот регулон представлен геном *dosR*, а также *dosS* и *dosT*, кодирующими DosR-киназы (DosS/DosT-киназы), acg (Rv3131) и Rv3130 (продуктами которых являются нитроредуктаза и диацилглицерол ацилтрансфераза), гены, кодирующие UPS-белки, и т. д. Регулон дормантности насчитывает до 50 генов и включает в себя семь основных, так называемых ко́ровых групп (регуляторы, киназы, UPS-белки, диацилглицерол ацилтрансферазы, нитроредуктазы, ферредоксины, белки теплового шока) и десять дополнительных генов, включенных в цепочку анаэробного метаболизма микобактерий. Потеря жизнеспособности *M. tuberculosis* мутантов по гену *dosR* подтверждает, что регулятор ответа DosR и DosR-регулон играют ключевую роль в адаптации *M. tuberculosis* к гипоксии. В то же время активация DosR-регулона является первичным краткосрочным ответом на изменения внешней среды микобактерии за счет процессов, происходящих в электронно-транспортной цепи клетки (окислительно-восстановительном потенциале). Эти изменения скорее адаптационные, нежели специфические. Уже после того, как было установлено, что экспрессию Rv3133c индуцирует гипоксия, и была определена его регуляторная функция, этот ген получил свое современное название – *dosR* [5, 41, 53].

В микобактериях, находящихся в активированных макрофагах, главным образом после экспозиции с окисью азота, индуцируется большинство генов DosR регулона. Их транскрипция влияет на метаболизм жирных кислот, а также интенсифицирует «удаление» железа, анаэробное дыхание и ремоделирование клеточной стенки [51].

При нарастании негативных воздействии на микобактерию включается более сложный регулон длительного гипоксического ответа EHR, который насчитывает около 230 генов. EHR обеспечивает микобактерии продолжительное существование вне клеточного цикла (без репликации) в агрессивных условиях макрофагальной фаголизосомы [5].

Были охарактеризованы также гены, имеющие отношение к контролю выхода из дормантного состояния – ресусцитации (Rpf) [21] и потере питательных веществ (депривации) (TVE-TB) [16].

Таким образом, сегодня с достаточной определенностью можно сказать, что *M. tuberculosis* могут находиться в дормантном состоянии. Для этого существует «материальная база»: со стороны *M. tuberculosis* – это гены, определяющие состояние дормантности, а со стороны микроорганизма – конкретные изменения, в первую очередь в макрофагах.

Дормантные локусы, кодируемые ими антигены и диагностика ЛТИ. Имеются данные о специфическом и «предпочтительном» для ЛТИ эффекте генов локусов DosR, EHR, Rpf (и др.), в частности, более высоком уровне продукции под действием кодируемых ими АГ ряда цитокинов, что указывает на перспективность их использования в иммунодиагностике ЛТИ [18, 25, 38, 52, 53, 57].

Так, M. Serra-Vidal и соавт. [53] изучили 60 рекомбинантных АГ, связанных с латентной инфекцией – их действие на продукцию ИФН-γ лейкоцитами крови больных туберкулезом, лиц с ЛТИ и не инфицированных микобактериями туберкулеза. АГ были сгруппированы, исходя из предполагаемой (или известной) функции, связанной с латентностью: дормантность, реактивация, ресусцитация, клеточное «голодание» и т.д. Было показано (табл. 1), что в каждой группе хотя бы один АГ индуцировал различия в продукции интерферона (статистически значимые). При этом авторы подчеркивают, что наиболее выраженный иммунный ответ (*in vitro*) в зависимости от статуса обследуемого вызывал АГ Rv1733, относящийся к регулону дормантности.

После того как были приведены некоторые (основные) факты, свидетельствующие о вероятном наличии «дормантных» локусов и кодируемых ими антигенов, возможности отличить с их помощью ЛТИ и о событиях, происходящих при нахождении в макроорганизме микобактерий в «дормантном» состоянии, можно попытаться сформулировать современные представления о сущности латентной туберкулезной инфекции.

В справочной литературе, в частности в ряде изданий Большой Советской энциклопедии, латентную инфекцию определяют как форму (или фазу) инфекционного процесса, наблюдаемую преимущественно при затяжных или хронических инфекционных заболеваниях и характеризующуюся длительным сохранением возбудителя в организме без клинических, бактериологических (и морфологических? – *авт.*) проявлений болезни. Такие проявления могут возникать под воздействием факторов, вызывающих ослабление организма (суперинфекция, стресс и т. п.).

В соответствии с наиболее широко принятыми «фтизиатрическим сообществом» представлениями, ЛТИ – это один из вариантов «бессимптомного туберкулеза», когда при положительных результатах туберкулинового теста и продукции ИФН-γ (IGRA) на специфические для *M. tuberculosis* АГ отсутствуют клинические, бактериологические и рентгенологические проявления активности заболевания [2, 3, 20, 31, 35].

Латентная инфекция: ее основные признаки. Латентная туберкулезная инфекция и активный туберкулез могут «независимо» развиваться (при попадании в организм *M. tuberculosis*):

в одних случаях – активный туберкулез, а в других – ЛТИ. Помимо «массивности» инфекта, состояния «входных ворот» и ряда других факторов, выбор макроорганизма зависит от состояния иммунной системы, все компоненты которой находятся под генетическим контролем. Так, при развитии ЛТИ макроорганизм «выбирает»: элиминировать ли *M. tuberculosis* через некоторое время, позволить сохраняться (и как долго) или разрешить им перейти в такое количественное и/или качественное состояние, чтобы процесс трансформировался в активный туберкулез.

Возможно, что отличия распознавания микобактерий Т-клетками при активном и латентном туберкулезе связаны со свойствами антигенов, экспрессируемых *M. tuberculosis* на разных стадиях роста и размножения, и особенностями реагирующих на них иммунокомпетентных клеток и их «продуктов».

На рисунке схематически представлены варианты течения и исходов взаимодействия возбудителя (*M. tuberculosis*) и организма «хозяина». Пунктиром обозначены «точки», в которых по разным причинам может возникать ситуация, которую называют ЛТИ.

Для того чтобы сформулировать более или менее реальное представление об ЛТИ, имеет смысл коротко описать ее основные характеристики («природа», «субстрат»):

– эпидемиологические;
– клинические;
– бактериологические;
– морфологические.

Говоря об эпидемиологии ЛТИ, можно отметить, что наиболее известными, но все-таки косвенными доказательствами существования латентной инфекции на протяжении многих десятилетий были положительные результаты кожной

Таблица 1. Антигены M. tuberculosis, использованные для оценки продукции in vitro ИФН-γ (главным образом) (по M. Serra-Vidal и соавт. [53], с рядом сокращений и дополнений)

Антигены	Локусы и функции	Оценка *in vitro*	Продукция выше при ЛТИ (авторы)
PPD (очищенный дериват туберкулина)	Локусы не изучены, функции многообразны	Продукция ИФН-γ и другие тесты (а также особенно широко используют в кожных туберкулиновых пробах)	Большое число противоречивых работ
ESAT-6 – ранний секреторный антиген / CFP10 – антиген культурального фильтрата	RD1	Продукция ИФН-γ и другие тесты	Большое число противоречивых работ (скорее, выше при активном туберкулезе)
Ряд других «контрольных» антигенов (TB10.4, Ag85a и др.) широко используют в тестах *in vitro* для диагностики туберкулеза (в т. ч. ЛТИ)			
Rv1733	DosR	Продукция ИФН-γ	[53]
Rv1471, Rv2662, Rv3862	Локусы (антигены) реактивации	Продукция ИФН-γ	[53]
Rv2389	Rpf – локус (антигены) – выход микобактерий из дормантного состояния (ресусцитация)	Продукция ИФН-γ	[53]
Rv2660	Локусы (антигены) – метаболизм в условиях пониженного поступления питательных веществ (старвация)	Продукция ИФН-γ	[53]
Rv0244, Rv1909, Rv2913	Локусы (антигены) – стресс-индуцируемые функции *M. tuberculosis*	Продукция ИФН-γ	[53]
Rv0847, Rv0967, Rv1806, Rv2380M, Rv2435n, Rv2642	Локусы (антигены), экспрессируемые *M. tuberculosis in vivo* (IVE)	Продукция ИФН-γ	[53]
α-кристаллин (16kDa-R2031c, hspX)	«Латентность»	Продукция ИФН-γ	[11, 18]
Rv3407	«Латентность»	Продукция ИФН-γ	[52]
Rv2660, Rv2659	RD11 – локус (антигены) старвации	Продукция ИФН-γ	[24]
Нативный гепарин–связывающий гемагглютинин (ГСГА)	«Латентность»	Продукция ИФН-γ	[17, 58]
PPD, CFP-10, ESAT-6, Rv3879c, Rv3878, Pv3873, α-кристаллин	Разные, в том числе DosR	Продукция ИФН-γ	[27] (нет различий при ЛТИ и активном туберкулезе)

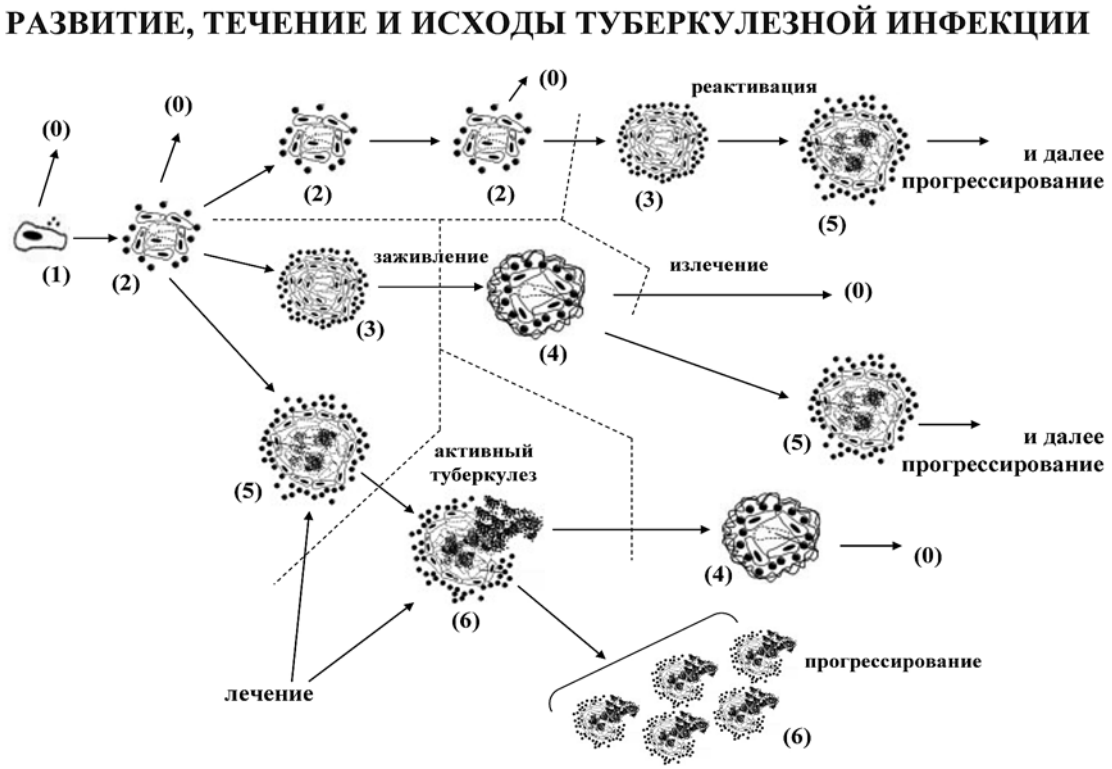


Рисунок. Схема вариантов развития, течения и исходов туберкулезной инфекции

(1) заражение
(2), (3) образование гранулемы
(4) заживление гранулемы
(5) размножение микобактерий, образование казеоза (активный туберкулез)
(6) деструкция гранулемы — развитие и прогрессирование «манифестного» (активного) туберкулеза
(0) элиминация микобактерий
---- этапы, на которых возможно развитие латентной туберкулезной инфекции

туберкулиновой пробы в странах с невысокой инфицированностью *M. tuberculosis* (и, соответственно, заболеваемостью), в которых не проводят вакцинацию (БЦЖ). А в странах с высокой заболеваемостью «отражением ЛТИ» считали наличие гиперергических туберкулиновых проб или переход отрицательной реакции Манту в положительную («вираж»), в первую очередь у детей (без связи с предшествующей вакцинацией). Сегодня об этом могут свидетельствовать и положительные результаты тестов оценки продукции ИФН-γ и проба с препаратом ДИАСКИНТЕСТ® (со специфическими для *M. tuberculosis* антигенами) у лиц с высоким риском развития туберкулеза [2, 3, 4, 7, 8, 20, 31, 32, 34, 35, 36, 55].

По обобщенным данным, которые приводят M. Serra-Vidal и соавт. [53], высоковероятным развитие ЛТИ является у следующих лиц: 1) находящихся в контакте с больными туберкулезом – при положительной кожной туберкулиновой пробе и с положительным результатом пробы на высвобождение ИФН-γ (IGRA+); 2) имевших интенсивный контакт с больными туберкулезом – при отрицательной пробе на высвобождение ИФН-γ (IGRA-) и папулой при кожной туберкулиновой пробе более 5 мм (если пациенты вакцинированы БЦЖ – источник инфекции должен быть бактериовыделителем, а при контакте с больным без бактериовыделения – при папуле 15 мм и более); 3) при IGRA- с нарастанием кожной туберкулиновой пробы с папулы размером менее 10 мм до более чем 10 мм (разница не менее 6 мм); 4) при IGRA- и положительной кожной туберкулиновой пробе (папула более 10 мм у не вакцинированных БЦЖ и недавних мигрантов и 15 мм и более – у вакцинированных БЦЖ).

Косвенным доказательством, что «латентная инфекция» существует, является то, что в вышеописанных ситуациях более высокой является частота развития манифестных форм туберкулеза. На возможность развития такой инфекции указывают также высокая вероятность инфицирования лиц, находящихся в тесном контакте с больными туберкулезом, например, в семье или в производственном коллективе, и то, что в этих группах лиц также более высокой (впоследствии) является частота развития манифестных форм туберкулеза. Однако данные на эту тему достаточно противоречивы, особенно потому, что в случаях масштабного проведения вакцинации БЦЖ трактовка туберкулиновых проб и прогноз на их основании затруднены. Сегодня подобные же сообщения «о прогнозе» имеются в отношении лиц, у которых положительными являются пробы, оценивающие продукцию ИФН-γ [2, 3, 4, 31, 34, 35].

Таблица 2. Факторы риска инфицирования и перехода латентной туберкулезной инфекции в активный туберкулез (по G. Mazurek и соавт, [35], с дополнениями)

Группы риска инфицирования *M. tuberculosis* (развития ЛТИ)	Группы риска прогрессирования ЛТИ с переходом в активный туберкулез
• лица, находящиеся в тесном контакте с больными активным туберкулезом; • выходцы из регионов с высокой заболеваемостью туберкулезом (Африка, Азия, Восточная Европа, Латинская Америка, Россия); • посещающие страны с высокой заболеваемостью туберкулезом, особенно если визиты частые и/или продолжительные; • лица, чья профессиональная деятельность связана с нахождением в местах скопления пациентов с активным туберкулезом (исправительные учреждения, дома для бездомных, лечебные учреждения для хронических больных); • медицинские работники, контактирующие с лицами с повышенным риском развития активного туберкулеза; • лица с низким доходом, низким уровнем медицинского обслуживания, злоупотребляющие наркотиками и алкоголем; • новорожденные и дети раннего возраста; • ВИЧ-инфицированные и лица с другими серьезными нарушениями иммунитета (применение иммунодепрессантов при трансплантации и в ряде других ситуаций).	• лица с ВИЧ-инфекцией; • новорожденные; • лица, получающие иммуносупрессивную терапию (ингибиторы ФНО-α, большие дозы кортикостероидов и др.); • лица, инфицированные *M. tuberculosis* в течение последних двух лет; • лица с «недолеченным» активным туберкулезом в анамнезе и/или с фиброзными изменениями на рентгенограмме, свидетельствующими о «перенесенном» активном туберкулезе; • больные силикозом, сахарным диабетом, с хронической почечной недостаточностью, лейкемией, лимфомой, раком головы, шеи или легких (и др. – *авт.*); • лица, злоупотребляющие курением, наркотиками, алкоголем; • лица, имеющие недостаточное медицинское обслуживание или малообеспеченные; • лица с «существенным» снижением массы тела.

Сведения об основных факторах риска развития ЛТИ и перехода ЛТИ в активный туберкулез представлены в таблице 2.

Предполагается, что в странах с низким уровнем эндемии туберкулеза определяется небольшое количество случаев ЛТИ (≈ 0,3%), причем независимо от вакцинации БЦЖ. В «промежуточных» в отношении эндемии туберкулеза странах число таких случаев в популяции – менее 4%, и оно выше (до 20%) среди пациентов, находившихся в контакте с больными туберкулезом – бактериовыделителями. В регионах с высокой эндемией туберкулеза число случаев ЛТИ достигает 30%, и оно выше (до 60–70%) при домашних контактах с больными туберкулезом [29, 39, 55] (большей частью эти «конкретные проценты» – фантазия – *авт.*).

По данным многих авторов (это переходит из обзора в обзор, из статьи в статью), в первые два года после первоначального инфицирования 5–10% таких лиц (с ЛТИ) заболевают активным туберкулезом и в течение нескольких десятилетий – до конца жизни при нормальном иммунитете – еще 5–10%, большая часть в течение ближайших пяти лет [8, 10, 17, 22, 28, 31, 36, 45, 50].

В принципе, для газет и телевидения все это нормально (чтобы запугать публику), но:

– самое близкое к истине допущение – это 5% в течение двух лет, что, конечно, мало доказано (но это не так важно – бойтесь заболеть и все); другое дело лица из контактов с больными туберкулезом (семейный, медработники в противотуберкулезных учреждениях и др.) – в этих случаях риск заболеть существенно выше [2, 3, 4, 40, 44, 50, 55];

– особая проблема – ВИЧ-инфицированные: в этой ситуации можно ожидать до 10% заболевших туберкулезом в первый год и затем еще до 20–50% [43, 44, 54]; в развитых странах любые допущения не очень страшны – все ВИЧ-инфицированные находятся под наблюдением, но в развивающихся – ситуация не ясна;

– сколько заболеет туберкулезом лиц с ЛТИ среди получающих иммунодепрессанты и из других групп риска?

О микробиологическом «*субстрате*» ЛТИ было сказано выше – им могут быть «дремлющие» микобактерии или какие-то «особые» формы *M. tuberculosis*. Но точно неизвестно, как происходит их «оживление» и, соответственно, восстановление способности вызывать полноценное заболевание. Их пребывание в дормантном состоянии контролируется особыми «дормантными» антигенами [30, 53].

Что касается *клинических признаков*, то, кроме «туберкулезной интоксикации» у детей и подростков, нет ничего хотя бы относительно реального. Можно, конечно, рассуждать о наличии активности в так называемых «кальцинатах», но даже по данным компьютерной томографии часто не ясно – есть или нет в них проявления активного туберкулезного процесса (а если есть – ЛТИ ли это? – *авт.*).

Ну а с *морфологическим* «*субстратом*» совсем сложно, Как только что-то такое обнаруживают – это уже скорее не латентный, а настоящий туберкулез.

Заключение

Латентная туберкулезная инфекция сегодня находится в центре внимания фтизиатрии и ряда других отраслей медицины (вероятно, в первую очередь иммунологии). В принципе,

представления о том, что это такое, можно считать сформированными. Описаны некоторые особенности иммунного ответа, которые при ЛТИ частично отличаются от таковых при активном туберкулезе. В какой-то мере эти особенности зависят от отличий генетической структуры (наличия так называемых дормантных локусов) микобактерий, вызывающих ЛТИ. Буквально в последние годы особенности антигенной структуры дремлющих микобактерий и ее генетического контроля приобрели некоторые реальные очертания. И сразу появился ряд работ, в которых диагностика ЛТИ и дифференциация этой «формы» туберкулеза от клинически манифестированного стала основываться на их использовании. Что касается методической «оснащенности» соответствующих диагностических тестов – то она есть. Сегодня это – тесты на высвобождение ИФН–γ, а возможно, и кожные пробы (типа туберкулиновых, например, проба с препаратом ДИАСКИНТЕСТ®) с использованием соответствующих АГ. Эти пробы должны послужить для выявления ЛТИ (в том числе в эпидемиологических исследованиях), ее дифференциации от последствий вакцинации БЦЖ (это удается уже сегодня с помощью проб на высвобождение ИФН–γ и пробы с ДИАСКИНТЕСТОМ®, использующими антигены RD1-локуса), а также прогноза перехода ЛТИ в активный туберкулез и диагностики последнего.

Вполне можно согласиться с мнением ряда авторов, которые считают, что диагностика и лечение ЛТИ являются «краеугольным камнем» среди всех аспектов туберкулеза, по крайней мере в развитых странах мира [31, 35].

Наверное, это так, если ЛТИ – правильный (отражающий сущность явления) термин. По крайней мере в странах с низкой пораженностью населения туберкулезом и, соответственно, низкой инфицированностью микобактериями (да если еще не вакцинируют детей БЦЖ), есть шансы пытаться (тем или иным способом) выявить произошедшее инфицирование (ЛТИ) и, следовательно, предупредить (? – *авт.*) развитие активного туберкулеза или хотя бы назначить лечение на ранней стадии заболевания.

Результаты исследований, изложенные в настоящем обзоре, свидетельствуют о том, что сегодня появились реальные перспективы для использования научных разработок в этой области (расшифровка генома *M. tuberculosis*, обнаружение дормантных локусов) во фтизиатрической практике. Дормантные антигены уже начали применять для выявления ЛТИ, и, вероятно, очень скоро это может приобрести настоящее практическое значение.

Литература

1. Земскова З.С., Дорожкова И.Р. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция. // М.: Медицина, 1984. – 224 с.

2. Литвинов В.И. Латентная туберкулезная инфекция – миф или реальность? // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 6. – С. 3-9.

3. Литвинов В.И. Латентная туберкулезная инфекция – свойства возбудителя; реакции макроорганизма; эпидемиология и диагностика (IGRA-тесты, ДИАСКИНТЕСТ® и другие подходы), лечение. – М.: МНПЦБТ. – 2016. – 196 с.

4. Митинская Л.А. Туберкулез у детей. – М.: ЗАО «Кудесники», 2004. – 196 с.

5. Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л. Адаптивные изменения экспрессии генов Mycobacterium tuberculosis в ходе инфекционного процесса. // Биоорг. химия. – 2012. – Т. 38. – С. 391-405.

6. Слогоцкая Л.В., Сенчихина О.Ю., Никитина Г.В., Богородская Е.М. Эффективность кожного теста с аллергеном туберкулезным рекомбинантным при выявлении туберкулеза у детей и подростков Москвы в 2013 г. // Педиатрическая фармакология. – 2015. – № 1. – С. 99-103.

7. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. // Clin. Dev. Immunol. – 2011. – P. 814-943.

8. Al-Orainey I. Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? // Ann. Thorac. Med. – 2009. – Vol. 4. – N. 1. – P. 5-9.

9. Andersen P., Munk M., Pollock J. et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. // Lancet. – 2000. – Vol. 356. – P. 1099-1104.

10. Barry C., Boshoff H., Dartois V. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7. – N. 12. – P. 845-855.

11. Belay M., Legesse M., Mihret A. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines against Rv2031 are elevated during latent tuberculosis: a study in cohorts of tuberculosis patients, household contacts and community controls in an endemic setting. // PLoS One. – 2015. – Vol. 10. – N. 4. – e0124134.

12. Capuano S., Croix D., Pawar S. et.al. Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71. – N. 10. – P. 5831-5844

13. Casey R., Blumenkrantz D., Millington K. et al. Enumeration of functional T-cell subsets by fluorescence-immunospot defines signatures of pathogen burden in tuberculosis. // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – N. 12. – e15619.

14. Chao M., Rubin E. Letting sleeping dos lie: does dormancy play a role in tuberculosis?// Ann. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 64. – P. 293-311.

15. Cole S., Brosch R., Parkhill J. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. // Nature. – 1998. – Vol. 393. – P. 537-544.

16. Commandeur S., van Meijgaarden K., Prins C. et.al. An unbiased genome-wide Mycobacterium tuberculosis gene expression approach to discover antigens targeted by human T-cells expressed during pulmonary infection // J. Immunol. – 2013. – Vol. 190. – N. 4. – P. 1659-1671.

17. Corbière V., Pottier G., Bonkain F. et al. Risk stratification of latent tuberculosis defined by combined interferon gamma release assays. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – N. 8. – e43285.

18. Demissie A., Leyten E.M., Abebe M. et al. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with Mycobacterium tuberculosis // Clin. Vaccine Immunol. – 2006. – Vol. 13. – N. 2. – P. 179-186.

19. Dheda K., Schwander S., Zhu B. et al. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. // Respirology. – 2010. – Vol. 15. – P. 433–450.
20. Diel R., Goletti D., Ferrara G. et al. Interferon-γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. // Eur. Respir. J. – 2011. – Vol. 37. – N. 1. – P. 88-99.
21. Ernst J. The immunological life cycle of tuberculosis // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12. – N. 8. – P. 581-591.
22. Esmail H., Barry E., Wilkinson R. Understanding latent tuberculosis: the key to improved diagnostic and novel treatment strategies. // Drug. Discov. Today. – 2012. – Vol. 17. – N. 9-10. – P. 514-521.
23. Garton N., Waddell S., Sherratt A. et al. Cytological and transcript analyses reveal fat and lazy persister-like bacilli in tuberculous sputum // PLoS Med. – 2008. – Vol. 5. – N. 4. – e75.
24. Govender L., Abel B., Hughes E. et al. Higher human CD4 T cell response to novel Mycobacterium tuberculosis latency associated antigens Rv2660 and Rv2659 in latent infection compared with tuberculosis disease. // Vaccine. – 2010. – Vol. 29. – N. 1. – P. 51-57.
25. Harari A., Rozot V., Bellutti Enders F. et al. Dominant TNF-alpha(+) Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. // Nat. Med. – 2011. – Vol. 17. – N. 3. – P. 372-376.
26. Harboe M., Oettinger T., Wiker H. et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64. – N. 1. – P. 16-22.
27. Hinks T., Dosanjh D., Innes J. et al. Frequencies of region of difference 1 antigen-specific but not purified protein derivative-specific gamma interferon-secreting T cells correlate with the presence of tuberculosis disease but do not distinguish recent from remote latent infections. // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77. – N. 12. – P. 5486-5495.
28. Horsburgh C. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 350. – N. 20. – P. 2060-2067.
29. Johnson P., Stuart R., Grayson M. et.al. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after Mycobacterium bovis BCG vaccination and in patients with tuberculosis // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 1999. – Vol. 6. – N. 6. – P. 934-937.
30. Kunnath-Velayudhan S., Gennaro M. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. // Clin. Microbiol. Rev. – 2011. – Vol. 24. – N. 4. – P. 792-805.
31. Lalvani A., Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. // Br. Med. Bull. – 2010. – Vol. 93. – P. 69-84.
32. Lawn S., Wood R., Wilkinson R. Changing concepts of «latent tuberculosis infection» in patients living with HIV infection. // Clin. Dev. Immunol. – 2011: pii: 980594.
33. Lin P., Rodgers M., Smith L. et al. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model. // Infect. and Immun. – 2009. – Vol. 77. – N. 10. – P. 4631-4642.
34. Mack U., Migliori G., Sester M. et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. // Eur. Respir. J. – 2009. – Vol. 33. – P. 956-973.
35. Mazurek G., Jereb J., Vernon A. et al. Updated guidelines for using interferon gamma release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection. // MMWR Recomm. Rep. – 2010. – Vol. 59. – P. 1-25.
36. Menzies D., Pai M., Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. // Ann. Intern. Med. – 2007. – Vol. 146. – P. 340-354.
37. Millington K., Innes J., Hackforth S. et al. Dinamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. // J. Immunol. – 2007. – Vol. 178. – N. 8. – P. 5217-5226.
38. Millington K., Fortune S., Low J. et al. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for Mycobacterium tuberculosis infection. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – Vol. 108. – N. 14. – P. 5730-5735.
39. Mori T., Sakatani M., Yamagishi F. et al. Specific detection of tuberculosis infection: An interferon-gamma-based assay using new antigens. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2004. – Vol. 170. – P. 59-64.
40. Pai M., Kalantri S., Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. // Expert. Rev. Mol. Diagn. – 2006. – Vol. 6. – P. 413-422.
41. Park H., Guinn K., Harrell M. et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 48. – P. 833-843.
42. Peyron P., Vaubourgeix J., Poquet Y. et.al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for M. tuberculosis persistence // PLoS. Pathog. – 2008. – Vol. 4. – N. 11. – e1000204.
43. Rangaka M., Diwakar L., Seldon R. et al. Clinical, Immunological, and epidemiological importance of antituberculosis T cell responses in HIV-infected Africans. // Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 44. – P. 1639-1646.
44. Rangaka M., Wilkinson K., Glynn J. et al. Predictive value of interferon-γ release assay for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // Lancet Infect. Dis. – 2012. – Vol. 12. – N. 1. – P. 45-55.
45. Rieder H. Socialization patterns are key to the transmission dynamics of tuberculosis // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 1999. – Vol. 3. – N. 3. – P. 177-178.
46. Rueda C., Martin N., Garcia L., Rojas M. Characterization of CD4 and CD8 T cells producing INF-gamma in human latent and active tuberculosis // Tuberculosis (Edinb). – 2010. – Vol. 90. – N. 6. – P. 346-353.
47. Russell D., Cardona P., Kim M. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma // Nat. Immunol. – 2009. – Vol. 10. – N. 9. – P. 943-948.
48. Rustad T., Harrell M., Liao R. Sherman D. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. In: The immunological life cycle of tuberculosis // Nat. Rev. Immunol. – 2012. – Vol. 12. – N. 8. – P. 581-591.

49. Sargentini V., Mariotti S., Carrara S. et al Cytometric detection of antigen-specific INF-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis. // BMC Infect. Dis. – 2009. – Vol. 9. – P. 99.
50. Schluger N., Burzynski J. Recent advances in testing for latent TB. // Chest. – 2010. – Vol. 138. – N. 6. – P. 1456-1463.
51. Schnappinger D., Ehrt S., Voskuil M. et al. Transcriptional adaptation of Mycobacterium tuberculosis within macrophages: insights into the phagosomal environment // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198. – N. 5. – P. 693-704.
52. Schuck S., Mueller H., Kunitz F. et.al. Identification of T-cell antigens specific for latent Mycobacterium tuberculosis infection // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – N. 5. – e5590.
53. Serra-Vidal M., Latorre I., Franken K. et al. Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of Mycobacterium tuberculosis. // Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 517.
54. Sester M., Sotqiu G., Lanqe C. et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. // Eur. Respir. J. – 2011. – Vol. 37. – N. 1. – P. 100-111.
55. Vekemans J., Lienhardt C., Sillah J. et al. Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69. – N. 10. – P. 6554-6557.
56. Wallis R., Pai M., Menzies D. et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. // Lancet. – 2010. – Vol. 375. – P. 1920-1937.
57. Wergeland I., Assmus J., Dyrhol-Riise A. et al. T regulatory cells and immune activation in Mycobacterium tuberculosis infection and effect of preventive therapy. // Scand. J. Immunol. – 2010. – Vol. 73. – N. 3. – P. 234-242.
58. Wyndham-Thomas C., Corbière V., Dirix V. et al. Key role of effector memory CD4+ T lymphocytes in a short-incubation heparin-binding hemagglutinin gamma interferon release assay for the detection of latent tuberculosis // Clin. Vaccine Immunol. – 2014. – Vol. 21. – N. 3. – P. 321-328.
59. Zhang T., Li S., Williams K. et al. Short-course chemotherapy with TMC207 and rifapentine in a murine model of latent tuberculosis infection // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2011. – Vol. 184. N. 6. – P. 732-737.

Сведения об авторе

Литвинов Виталий Ильич *– научный руководитель ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор, академик РАН*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. +7 (499) 268-04-15

e-mail: mnpcbtlv@yandex.ru

УДК 571:[616-002.5:614.446:57.083.1]

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ В СИБИРСКОМ И ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ ФЕДЕРАЛЬНЫХ ОКРУГАХ

В.А. Краснов, А.Г. Чередниченко, О.В. Ревякина, Т.И. Петренко
ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава России

THE EFFECTIVENESS OF TB DETECTION BY MICROBIOLOGICAL METHODS IN THE SIBERIAN AND FAR EASTERN FEDERAL DISTRICTS

V.A. Krasnov, A.G. Cherednichenko, O.V. Revyakina, T.I. Petrenko

Представлена характеристика лабораторной службы, выполняющей микробиологические исследования с целью диагностики туберкулеза в 12 субъектах Сибирского и девяти – Дальневосточного федеральных округов. Проведена оценка эффективности выявления туберкулеза методом световой микроскопии с окраской мазка по Цилю-Нельсену на этапе первичной медико-санитарной помощи населению. Показана динамика эффективности выявления различными методами микробиологической диагностики за период с 2010 по 2014 гг. в бактериологических лабораториях противотуберкулезных медицинских организаций. Выделены актуальные моменты в работе лабораторной службы, требующие дальнейшего совершенствования и оптимизации.

***Ключевые слова**: Сибирский и Дальневосточный федеральные округа, лабораторная диагностика туберкулеза, метод микроскопии, метод культуральной диагностики, лекарственная устойчивость микобактерий, метод культивирования на жидких средах, выявление туберкулеза*

In the article, we presented description of laboratory facilities, performing microbiological tests for tuberculosis (TB) diagnosis in 12 Siberian and 9 Far Eastern Federal Districts. We conducted effectiveness evaluation of TB detection by light microscopy with the Ziehl-Neelsen coloring in primary health care clinics. The dynamic of effectiveness of TB detection by different microbiological methods in the period from 2010 to 2014 in the TB bacteriological laboratories was presented. In the paper, we focused on the relevant points in the work of TB laboratories that require further improvement and optimization.

***Keywords**: Siberian and Far Eastern Federal Districts, TB laboratory diagnostics, microscopy methods, culture method of TB diagnosis, drug resistance, method of cultivation in liquid media, efficiency of TB detection*

Введение

Эпидемическая обстановка во многом определяется уровнем организации своевременного выявления больных туберкулезом, в том числе и микробиологическими методами. Наиболее надежным основанием для установления диагноза туберкулеза является обнаружение микобактерий туберкулеза в исследуемом диагностическом материале. Внедрение приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации № 951 от 29 декабря 2014 г. «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечению туберкулеза органов дыхания» позволило унифицировать лабораторные методы, создать алгоритм для ускоренной этиологической диагностики туберкулеза и определения лекарственной устойчивости возбудителя.

Цель исследования

Оценить эффективность работы лабораторной службы по выявлению и диагностике больных туберкулезом в субъектах Российской Федерации Сибирского и Дальневосточного федеральных округов.

Материалы и методы исследования

Оценка выполнена на основании данных из 12 регионов Сибирского федерального округа (республики: Алтай, Бурятия, Тыва, Хакасия; края: Алтайский, Красноярский, Забайкальский;

Таблица 1. Обследование лиц с подозрением на туберкулез в клинико-диагностических лабораториях общей лечебной сети методом световой микроскопии по Цилю-Нельсену в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2010–2014 гг.)

Год	Количество исследований с целью диагностики	Количество лиц, обследованных с целью диагностики:			Кратность исследования
		всего	из них КУМ+		
			абс.	%	
2010	940 842	478 187	9143	1,9	2,0
2011	911 354	413 766	6481	1,6	2,2
2012	854 488	414 554	4253	1,0	2,1
2013	902 545	425 362	5413	1,3	2,1
2014	851 790	397 713	4876	1,0	2,1

области: Иркутская, Кемеровская, Новосибирская, Омская, Томская) и девяти регионов Дальневосточного федерального округа (Республика Саха (Якутия); края: Приморский, Хабаровский, Камчатский; области: Амурская, Магаданская, Сахалинская; Еврейская автономная область и Чукотский автономный округ). Проведен анализ государственной и отраслевой отчетности, годовых отчетов лабораторий и данных, полученных в ходе кураторских визитов. Рассмотрены показатели за пять лет (2010–2014 гг.).

Результаты исследования

Обязательным исследованием при подозрении на туберкулез является исследование мокроты методом световой микроскопии на наличие кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ) с окраской по Цилю-Нельсену, выполняемое в медицинских организациях муниципального уровня. На сегодняшний день медицинские организации муниципального уровня в территориях Сибирского и Дальневосточного федеральных округов представлены 1078 клинико-диагностическими лабораториями (КДЛ) общей лечебной сети (ОЛС). По сравнению с 2010 г. число лабораторий сократилось на 8%. Данные по обследованию пациентов методом световой микроскопии в КДЛ ОЛС за период с 2010 по 2014 гг. представлены в таблице 1.

Расчетное число лиц, подлежащих обследованию в подразделениях ОЛС методом световой микроскопии, составляет 1 259 523 (при соблюдении трехкратного обследования должно быть проведено 3 778 569 исследований). В 2014 г. на базе клинико-диагностических лабораторий общей лечебной сети выполнено 851 790 микроскопических исследований нативного материала с окраской по Цилю-Нельсену. Обследовано 397 713 лиц с целью диагностики туберкулеза, из них КУМ были обнаружены (положительный результат – КУМ+) у 4876 пациентов (1,0%). С учетом численности населения территорий курации и показателей заболеваемости туберкулезом расчетное число лиц с КУМ+, выявленных в КДЛ ОЛС за 2014 г., должно стремиться к 11 713. Таким образом, недовыявление лиц с КУМ+ на уровне подразделений ОЛС составило 58,4%. Обращает на себя внимание и недостаточная кратность обследования, в среднем – 2,1.

В медицинских организациях субъектов Российской Федерации, оказывающих специализированную медицинскую помощь по профилю «фтизиатрия», лабораторная служба представлена 108 бактериологическими лабораториями, выполняющими микроскопические исследования с окраской флюорохромными красителями, культуральные исследования на плотных и жидких питательных средах, видовую идентификацию микобактерий и постановку тестов лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам основного и резервного ряда. Число бактериологических лабораторий, выполняющих данные виды исследований, по сравнению с 2010 г., остается неизменным. Однако необходимо отметить недостаточное инженерно-техническое состояние ряда лабораторий, необходимость обновления материально-технической базы бактериологических лабораторий.

С целью диагностики и контроля лечения в территориях Сибирского и Дальневосточного федеральных округов в 2014 г. выполнено 652 256 посевов на плотные яичные среды (в 2013 г. – 670 576). По сравнению с 2010 г. число посевов уменьшилось почти на 55 000 исследований. В первую очередь это

Таблица 2. Эффективность выявления микобактерий туберкулеза культуральным методом в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2010–2014 гг.)

Год	Количество посевов	Количество посевов с положительным результатом (МБТ+)	
		абс.	%
2010	707 227	127 647	18,0
2011	617 412	112 055	18,1
2012	689 983	120 594	17,5
2013	670 576	112 481	16,8
2014	652 256	109 722	16,8

Таблица 3. Выявление микобактерий туберкулеза у впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания, взятых на учет в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2010–2014 гг.)

Результаты микробиологического обследования	Годы									
	2010		2011		2012		2013		2014	
	абс.	%	*абс.*	%	*абс.*	%	*абс.*	%	*абс.*	%
Всего впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания	26 156	100,0	22 457	100,0	24 761	100,0	23 188	100,0	21 542	100,0
в том числе:										
М+ П+	8319	31,8	6621	29,5	7303	29,5	7112	30,7	5936	27,6
М+ П–	1346	5,1	1031	4,6	1117	4,5	892	3,9	1043	4,8
М– П+	4031	15,4	3676	16,4	3712	15,0	3316	14,3	3831	17,8
М– П–	12 460	47,6	11 132	49,6	12 628	51,0	11 868	51,2	10732	49,8
Из впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания:										
выявлено и подтверждено методом посева	12 350	47,2	10 297	45,6	11 316	45,7	10 425	45,0	9767	45,3
выявлено методом микроскопии	9665	37,0	7652	34,1	8421	34,0	8004	34,5	6979	32,4
бактериовыделение подтверждено любым методом	13 696	52,4	11 325	50,4	12 133	49,0	11 320	48,8	10810	50,2

М+ – микроскопия на КУМ дала положительный результат
М– – микроскопия на КУМ дала отрицательный результат
П+ – посев на МБТ дал положительный результат
П– – посев на МБТ дал отрицательный результат

связано с уменьшением числа пациентов с активным туберкулезом в целом почти на 15 000 лиц (2010 г. – 74 621 пациент, 2014 г. – 60 475). Эффективность выявления составила 16,8% (109 722 положительных посевов). Имеет место тенденция к снижению эффективности выявления больных туберкулезом – бактериовыделителей культуральным методом. Снижение показателей эффективности культурального метода объясняется уменьшением доли деструктивных форм как среди впервые выявленных больных туберкулезом легких (2010 г. – 11 485, 2011 г. – 10 862, 2012 г. – 10 254, 2013 г. – 9437, 2014 г. – 8844), так и среди контингентов больных туберкулезом легких (2010 г. – 31 847, 2011 г. – 30 116, 2012 г. – 28 868, 2013 г. – 27 058, 2014 г. – 24 909).

На сегодняшний день все бактериологические лаборатории противотуберкулезных учреждений оснащены автоматическими микробиологическими анализаторами BACTEC™ MGIT™ 320/960. Данная методика способствует увеличению скорости получения культуры и повышению частоты обнаружения МБТ. Высокая стоимость расходных материалов и зачастую отсутствие регулярного сервисного обслуживания анализаторов приводит к ограничению использования данного метода культивирования. Так, доля использования метода культивирования на жидких средах в 2014 г. составила 5,7% от числа всех посевов. При этом эффективность выявления МБТ при бульонном культивировании в 2014 г. была в 1,6 раза выше, чем эффективность выявления на плотных питательных средах (26,9% – 9918 культур).

В 2014 г. МБТ были выявлены микроскопическим и культуральным методом у 50,2% впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания (в 2013 г. этот показатель составлял 48,8%). В 2014 г. у данной категории пациентов бактериовыделение было подтверждено только методом посева в 45,3% случаев, а только микроскопическим методом – в 4,8%.

В Российской Федерации основными методами определения лекарственной чувствительности МБТ, рекомендуемыми Приказом № 951 от 29 декабря 2014 г., являются непрямые фенотипические методы: метод абсолютных концентраций, метод пропорций в жидкой питательной среде в системе с автоматизированным учетом роста микроорганизмов, нитратредуктазный метод индикации роста с использованием реактива Грисса и модифицированный метод определения минимальных ингибирующих концентраций в жидкой питательной среде.

В бактериологических лабораториях Сибирского и Дальневосточного федеральных округов исследование лекарственной чувствительности МБТ проводят преимущественно методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена и методом пропорций в жидкой питательной среде (BACTEC™ MGIT™).

В 2014 г. выполнено 9006 исследований лекарственной чувствительности МБТ у впервые выявленных пациентов с положительным посевом, что составило 92,2% от их общего числа. Среди всех контингентов пациентов с положительным результатом культурального исследования лекарственная устойчивость МБТ определена в 24 551 случае. Доля определения лекарственной устойчивости методом пропорций на жидких средах с использованием автоматизированных систем составила 37,3% (9169 исследований).

В Сибирском и Дальневосточном федеральных округах сохраняются высокие показатели лекарственной устойчивости МБТ у впервые выявленных больных туберкулезом органов

Таблица 4. Исследования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2010–2014 гг.)

Год	Федеральный округ	Всего больных с положительным посевом (*абс.*)	Обследовано на лекарственную устойчивость МБТ	
			абс.	%
2010	СФО	8745	8520	97,4
	ДФО	3851	3484	90,5
2011	СФО	7104	6537	92,0
	ДФО	3292	2953	89,7
2012	СФО	8106	6882	84,9
	ДФО	3210	2763	86,1
2013	СФО	7087	6631	93,6
	ДФО	2680	2375	88,6
2014	СФО	7655	7068	92,3
	ДФО	2751	2575	93,6

дыхания (рисунок). В 2014 г. устойчивость хотя бы к одному противотуберкулезному препарату обнаружена у 54,8% (4935 чел.) пациентов. Отмечается рост доли пациентов с множественной лекарственной устойчивостью МБТ, которая в 2014 г. составила 29,0% (2609 пациентов).

Необходимо отметить, что в регионах 7,8% бактериовыделителей методом посева не обследованы на лекарственную устойчивость (табл. 4).

Выводы

Следует отметить недостаточную эффективность выявления больных туберкулезом лабораторными методами на всех этапах оказания противотуберкулезной помощи.

Своевременное направление пациентов с соответствующей симптоматикой на микроскопическое исследование нативного диагностического материала с окраской по Цилю-Нельсену, соблюдение трехкратного обследования пациентов и повышение квалификации персонала позволят повысить эффективность метода световой микроскопии на этапе первичной медико-санитарной помощи.

Контролируемый сбор диагностического материала, внедрение щадящих методов предпосевной обработки диагностического материала, в том числе и для посева на комплекс плотных питательных сред, применение ускоренных методов бульонного культивирования даст возможность повысить эффективность культурального выявления МБТ в

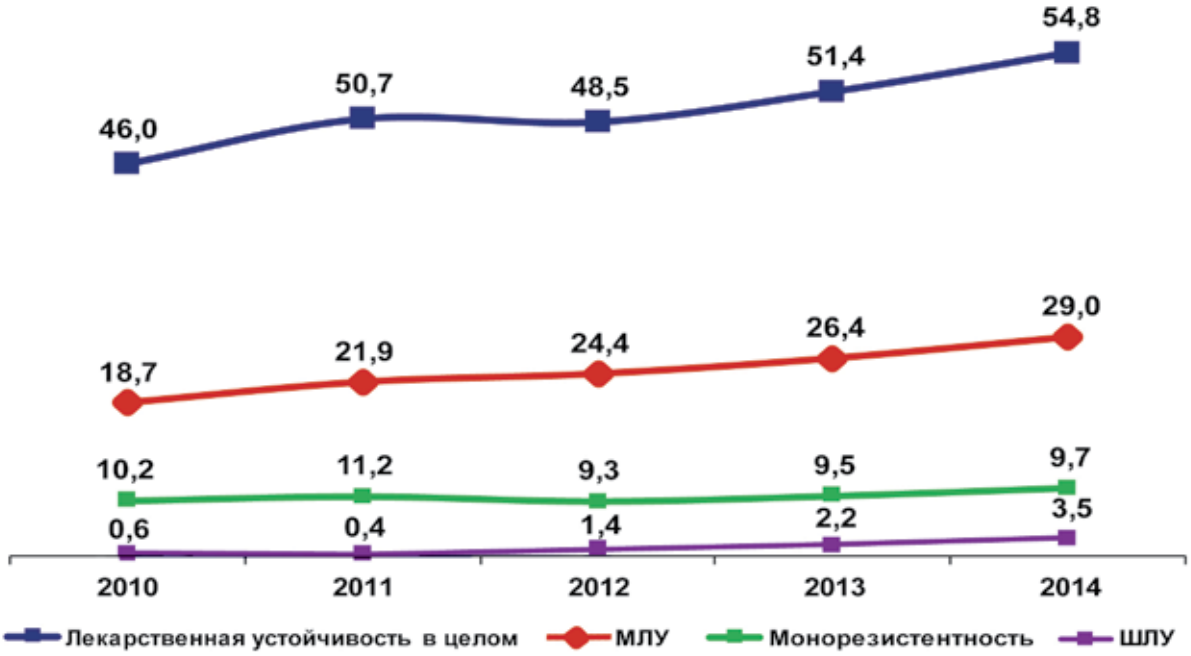


Рисунок. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (% от числа обследованных, 2010–2014 гг.)

бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений.

Включение в алгоритм диагностики туберкулеза молекулярно-генетических методов выявления и определения лекарственной устойчивости в каждом противотуберкулезном учреждении, регламентированное Приказом Минздрава России № 951н от 29 декабря 2014 г., позволит в ранние сроки проводить этиологическую диагностику туберкулеза и своевременно назначать адекватную схему химиотерапии с учетом чувствительности возбудителя.

Сведения об авторах

Краснов Владимир Александрович *– директор ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор*

Адрес: 630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81а
Тел. + 7 (383) 203-83-67, факс + 7 (383) 203-78-25
e-mail: info@nsk-niit.ru

Ревякина Ольга Владимировна *– заведующая научно-организационным сектором ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава России, кандидат медицинских наук*

Адрес: 630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81а
Тел. + 7 (383) 203-83-67, факс + 7 (383) 203-83-65
e-mail: info@nsk-niit.ru (для Ревякиной)

Чередниченко Андрей Георгиевич *– заведующий микробиологической лабораторией ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава России*

Адрес: 630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81а
Тел. + 7 (383) 203-83-62, факс + 7 (383) 203-83-62
e-mail: bact.nniit@gmail.com

Петренко Татьяна Игоревна *– заместитель директора по науке ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава России, доктор медицинских наук*

Адрес: 630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, д. 81а
Тел. + 7 (383) 203-83-58, факс + 7 (383) 203-78-25
e-mail: tipetrenko@gmail.com

УДК 616-002.5:614.446:57.083.1

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Т.В. Умпелева, Л.А. Голубева, Л.С. Лавренчук, Н.И. Еремеева, М.А. Кравченко
ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург

DETECTION OF EPIDEMIOLOGY SIGNIFICANT GENOTYPE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN CLINICAL MATERIAL

T.V. Umpeleva, L.A. Golubeva, L.S. Lavrenchuk, N.I. Eremeeva, M.A. Kravchenko

В работе представлены данные генотипирования и определения спектра мутаций лекарственной устойчивости M. tuberculosis, выделенных от больных туберкулезом, находящихся на лечении в клинике Уральского НИИ фтизиопульмонологии г. Екатеринбурга в 2012–2016 гг. Показаны возможности технологий «Ампилитуб-Beijing» (НПК «Синтол»), GenoType® MTBDR (Hain Lifescience) и тест-системы «ТБ-ТЕСТ» (ООО «Биочип-ИМБ») для проведения внутривидовой дифференциации M. tuberculosis и выявления эпидемиологически-значимых вариантов возбудителя туберкулеза (Beijing МЛУ) непосредственно из клинического материала.

***Ключевые слова**: M. tuberculosis, лекарственная устойчивость, генотипирование*

This study presents genotyping and drug resistance mutations data of M. tuberculosis isolated from tuberculosis patients from 2012 to 2016 in Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Ekaterinburg. We performance capabilities of Amplitub-Beijing (Sintol, Russia), GenoType® MTBDR (Hain Lifescience, Germany) and TB-TEST (Biochip-IMB, Russia) test-systems for differentiation and diagnostic of epidemiology significant variants of M. tuberculosis (Beijing MDR) in clinical samples.

***Keyworlds**: M. tuberculosis, drug resistance, genotyping*

Введение

Распространение штаммов возбудителя туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ и ШЛУ) ставит задачу внедрения в практику лабораторий противотуберкулезных учреждений ускоренных методов определения лекарственной устойчивости возбудителя. В настоящее время на территории России рекомендованы к применению четыре молекулярно-генетических подхода, позволяющих в короткие сроки идентифицировать мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью *M. tuberculosis* (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП), непосредственно в диагностическом материале, полученном от больного туберкулезом:

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени (определение ЛУ МБТ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам).
2. ДНК-стриповая технология (определение ЛУ МБТ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, этамбутолу, аминогликозидам/полипептиду).
3. Биочиповая технология (определение ЛУ МБТ к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам).
4. Картриджная технология GeneXpert MTB/RIF – определение ЛУ МБТ к рифампицину [9].

При этом данные о наличии или отсутствии мутаций, ассоциированных с ЛУ к ПТП, должны учитываться лечащим врачом не только с точки зрения выбора режима химиотерапии, но

также с точки зрения эпидемиологической опасности больного и его размещения в противотуберкулезном стационаре. Однако генетическая вариабельность МБТ представляет собой не только полиморфизмы в генах, ответственных за возникновение ЛУ, но и захватывает другие участки генома. В настоящее время известно, что генетически неоднородная российская популяция возбудителя туберкулеза насчитывает более 20 генетических семейств/линий, среди которых доминируют Beijing (50–80%), LAM (10–40%), Ural (2–15%), Haarlem (2–15%) [1, 3, 4, 7, 8]. В пределах каждой генетической линии можно выделить отдельные группы или кластеры генетически родственных штаммов. На основе данных генотипирования были выделены отдельные кластеры изолятов, ассоциированные с МЛУ и имеющие эпидемиологическое и клиническое значение на территории России (Beijing B0) [1-3, 6, 8, 10, 13]. В классическом варианте генотипирование проводят при выделении культуры *M. tuberculosis* с использованием сполиготипирования, MIRU-VNTR- и *IS6110*-RFLP-типирования и других методов исследования геномного полиморфизма микобактерий [11, 12, 13]. Однако в последнее время появились коммерческие тест-системы, позволяющие проводить «грубое» генотипирование возбудителя туберкулеза непосредственно в клиническом материале и выделять его эпидемиологически значимые варианты: «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол», Россия), «ТБ-ТЕСТ» (ООО Биочип-ИМБ, Россия) и «СПОЛИГО-БИОЧИП» (ООО «Биочип-ИМБ», Россия).

Цель исследования

Оценить возможность использования тестов «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол», Россия) и «ТБ-ТЕСТ» («ООО Биочип-ИМБ», Россия) для внутривидовой дифференциации микобактерий туберкулеза, выделенных из клинического материала.

Материалы и методы исследования

Для исследования было отобрано 255 образцов операционного материала, полученного от больных, оперированных по поводу туберкулеза легких в клинике Уральского НИИ фтизиопульмонологии в 2012–2014 гг. Во всех образцах была выявлена ДНК *M. tuberculosis complex* и в 241 случае определены мутации, ассоциированные с устойчивостью к ПТП.

Выделение и амплификацию ДНК *M. tuberculosis* проводили с использованием наборов «РеалБест ДНК МВТС» (ООО «Вектор-Бест», Россия) и «Амплитуб-РВ» (НПК «Синтол», Россия) на приборе CFX (BioRad, США).

Определение мутаций в генах *rpoB, katG* и *inhA*, обуславливающих устойчивость к рифампицину и изониазиду, проводили с использованием набора GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience, Германия), в генах *gyrB, rrs, embB*, обуславливающих устойчивость к фторхинолонам, аминогликозидам/капреомицину, этамбутолу – с использованием набора GenoType® MTBDRsl (Hain Lifescience, Германия).

Для дифференциации изолятов на группы Beijing и non-Beijing методом ПЦР использовали ПЦР-тест-систему «Амплитуб-Beijing» (НПК «Синтол», Россия).

С 2016 г. в лаборатории Уральского НИИ фтизиопульмонологии начались исследования по определению спектра мутаций в генах *rpoB, katG, inhA, ahpC gyrA, gyrB, rrs, eis, embB*, обуславливающих устойчивость к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, аминогликозидам, этамбутолу, и принадлежности выделенных изолятов к эндемичным для территории России семействам Beijing, Haarlem, LAM, Ural с использованием тест-системы «ТБ-ТЕСТ» (ООО «Биочип-ИМБ», Россия). Для оценки возможностей данной тест-системы был отобран 21 образец клинического материала, выделенного в 2016 г. от 21 больного и положительный по данным количественной ПЦР. Операционный материал был представлен 12 образцами (пять – костная ткань, семь – ткань легкого), мокрота – шестью, моча и материал, полученный при фибробронхоскопии по одному образцу. Выделение и амплификацию ДНК *M. tuberculosis* проводили с использованием набора «Амплитуб-РВ».

Статистическую обработку данных проводили с использованием таблиц сопряженности и критерия χ^2 с поправкой Йетса; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

По результатам генотипирования 255 изолятов, выделенных из операционного материала, установлена принадлежность к генетической группе Beijing или non-Beijing у 251(98,4%). Из них к генотипу Beijing принадлежало 206 (82,1%) образцов, к генетической группе non-Beijing – 38 (15,1%). В 7 (2,7%) случаях была выявлена смесь генотипов.

Анализ данных определения мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, и генотипа МБТ позволил установить, что среди представителей генотипа Beijing 134 (65,0%) изолята обладают МЛУ, 12 (5,8%) – ШЛУ, в то время как в группе non-Beijing только 3 (7,9%) изолята обладали МЛУ, а изолятов с ШЛУ не выявлено ($p < 0,01$). Мутаций, обуславливающих ЛУ к ПТП, не выявлено у 31 (15,1%) и 18 (47,3%) изолятов в группах Beijing и non-Beijing, соответственно. Среди представителей генотипа Beijing с МЛУ у 125 (92,5%) выявлено сочетание мутаций к рифампицину *rpoB* S351L и изониазиду *katG* S315T1 (табл. 1). Как видно из таблицы, ШЛУ обладали только изоляты Beijing с указанным выше сочетанием мутаций ($p < 0,01$). Ранее было показано, что данное сочетание замен характерно для представителей генотипа Beijing и обеспечивает устойчивость к высоким концентрациям рифампицина и изониазида *in vitro*, не снижая жизнеспособности и вирулентности микроорганизма [6].

Таблица 1. Спектр лекарственной устойчивости изолятов M. tuberculosis, принадлежащих к генетическим группам Beijng и non-Beijing, определенный наборами «Ампилитуб-Beijing», GenoType® MTBDRplus и GenoType® MTBDRsl

Генотип	Мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к ПТП			Количество изолятов	Количество изолятов, обладающих мутациями, ассоциированными с лекарственной устойчивостью к ПТП			ШЛУ
	Рифампицин *rpoB*	Изониазид			Фторхинолоны *gyrA*	Этамбутол *embB*	Аминогликозиды/ Капреомицин *rrs*	
		katG	*inhA*					
Beijing	wt	wt	wt	31	—	1	—	—
	wt	S315T1	wt	36	—	6	—	—
	wt	wt	C15T	1	—	—	—	—
	wt	S315T1	C15T	2	—	—	—	—
	D516V	S315T1	wt	8	—	1	—	—
	S531L	S315T1	wt	116	11	37	13	12
	S531L	S315T1	C15T	8	1	1	1	—
	A516V	S315T1	C15T	1	—	—	—	—
	S531L	S315T1	T8C	1	1	1	—	—
non-Beijing	wt	wt	wt	18	—	—	—	—
	wt	S315T1	C15T	6	—	—	—	—
	wt	wt	C15T	2	—	—	1	—
	wt	S315T1	C15T	1	—	—	—	—
	S531L	S315T1	C15T	3	—	1	—	—
	H526Y	wt	C15T	1	—	—	—	—
Смесь	wt	wt	C15T	5	—	—	—	—
	wt	S315T1	C15T	1	—	—	—	—

wt – «дикий тип», отсутствие мутации

Мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам, выявлены у 13 изолятов: в гене gyrA у шести изолятов встретились замены D94G, у двух – D94A и у трех изолятов – A90V.

Мутации в гене embB, ассоциированные с устойчивостью к этамбутолу, выявлены у 47 изолятов, 38 из них содержали замену M306V, пять – A306V, два – M306I, в четырех случаях идентифицировать мутации не удалось.

У 14 изолятов обнаружены мутации, ответственные за устойчивость к аминогликозидам/капреомицину: из них у 13 изолятов в гене rrs отмечена замена A1401G и у одного изолята – G1484T.

Исследование 21 образца клинического материала с использованием набора «ТБ-ТЕСТ» установило у 19 (90,4%) принадлежность к генотипу Beijing, из них девять (42,8%) принадлежало к кластеру B0. Один изолят был классифицирован как Ural, и в одном случае изолят принадлежал к Европейско-Американской линии, однако установить принадлежность к определенному генотипу не удалось (табл. 2).

Оценка результатов генотипирования и спектра определяющих лекарственную устойчивость мутаций с помощью набора «ТБ-ТЕСТ», выявила, что среди 19 изолятов Beijing 11 (57,8%) обладали мутациями в генах *rpoB* и *katG*, ответственных за МЛУ–фенотип, причем семь из них принадлежали к кластеру Beijing B0. Среди этих семи изолятов три содержали мутации, обеспечивающие проявление ШЛУ–фенотипа. Интересно отметить, что из девяти представителей кластера Beijing B0 один изолят (клинический материал – резектат легкого) не содержал мутаций, ассоциируемых с устойчивостью к исследуемым ПТП.

Мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам, выявлены у восьми изолятов, из них четыре обладали набором из 2–3 мутаций. При этом спектр мутаций был достаточно велик: в гене *gyrA* замена D94G выявлена у двух изолятов, у одного изолята в этом гене выявлена смесь клеток с мутациями и без мутаций, замена S91T – у четырех изолятов; в гене gyrB – замены G509A, D500N, R485C, R485H выявлены в одном изоляте каждая.

Мутации в гене *embB*, ассоциируемые с устойчивостью к этамбутолу, выявлены у 10 изолятов: M306V – у шести изолятов, D354A и Q497K – по два изолята, G406D и V309F – по одному изоляту. В двух образцах выявлено сочетание двух мутаций.

У девяти изолятов обнаружены мутации, ответственные за устойчивость к аминогликозидам/капреомицину: в гене *eis* в позиции G10A – три изолята, C14T – два изолята и по одному изоляту – мутации G37T и C12T. В гене *rrs* замена A1401G отмечена у одного изолята, а еще один изолят сочетал мутантные в этой позиции особи МБТ и клетки дикого типа.

Таблица 2. Спектр лекарственной устойчивости изолятов M. tuberculosis, принадлежащих к генетическим группам Beijing и non-Beijing, определенный наборами «Ампилитуб-Beijing», GenoType® MTBDRplus и GenoType® MTBDRsl

Генотип	Количество изолятов	Мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к ПТП		Количество изолятов	Количество изолятов, обладающих мутациями, ассоциированными с лекарственной устойчивостью к ПТП			ШЛУ
		Рифампицин *rpoB*	Изониазид *katG*		Фторхинолоны *gyrA, gyrB*	Этамбутол *embB*	Аминогликозиды/ капреомицин *rrs, eis*	
Beijing	10	S531L	S315T1	3	2	2	1	—
		A516T	S315T1	1		1	1	—
		Asr516Tyr	wt	1	1	1	1	—
		wt	S315T1	1	—	—	—	—
		wt	wt	4	1	—	—	—
BeijingBO	9	S531L	S315T1	7	4	6	6	3
		wt	S315T1	1	—	—	—	—
		wt	wt	1	—	—	—	—
Ural	1	wt	wt	1	1	—	—	—
Не определен	1	wt	wt	1	—	—	—	—

wt – «дикий тип», отсутствие мутации

Заключение

Проведенное исследование показало возможность применения современных подходов, основанных на ПЦР, для анализа генетической гетерогенности изолятов, выделенных непосредственно из клинического материала. Так, использование ПЦР в режиме реального времени для определения принадлежности изолятов к генетическим группам Beijing и non-Beijing и идентификация ассоциированных с устойчивостью к ПТП мутаций ДНК-стриповой технологией позволили разбить выборку на отдельные группы изолятов и в 48,1% случаев выделить наиболее значимый в эпидемиологическом плане вариант возбудителя – Beijing с сочетанием замен *rpoB* S531L и *katG* S315T1. Исследование 21 образца клинического материала с использованием тест-системы «ТБ-ТЕСТ», несмотря на немногочисленность выборки, показало возможность определения большего спектра мутаций, ответственных за развитие фенотипической устойчивости к фторхинолонам, этамбутолу, аминогликозидам, по сравнению с наборами производства Hain Lifescience. В 42,8% случаев был выявлен эпидемиологически значимый для России вариант возбудителя туберкулеза Beijing B0.

Таким образом, молекулярно-генетические методы, позволяющие изучать гетерогенность популяции *M. tuberculosis*, должны являться основой современных технологий мониторинга распространения туберкулезной инфекции и персонализированной тактики лечения пациентов.

Литература

1. *Вязовая А.А., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов Mycobacterium tuberculosis, циркулирующих в Псковской области // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – №. 6. – С. 35-39.*
2. *Дымова М.А. Альховик О.И., Чередниченко А.Г. и др. Идентификация генотипов Mycobacterium tuberculosis, ассоциированных с резистентностью и чувствительностью к лекарственным препаратам // Микробиология. – 2012. – Т. 13. – С. 672-681.*
3. *Маничева О.А., Нарвская О.В., Мокроусов И.В. и др. Лекарственная устойчивость, жизнеспособность и вирулентность in vitro штаммов Mycobacterium tuberculosis различных генотипов // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1. – № 4. – С. 341-348.*
4. *Маркелов Ю.М., О.В. Нарвская Циркуляция штаммов возбудителя с множественной лекарственной устойчивостью на территории Республики Карелия // Туберкулез и болезни легких. – М., 2010. – № 2. – С. 54-57.*
5. *Мокроусов И.В., Нарвская О.В., Вязовая А.А. и др. Геноидентификация эпидемиологически и клинически значимого варианта M. tuberculosis Beijing B0/W148 // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 10. – С. 33-36.*
6. *Нарвская О.В. Геномный полиморфизм Mycobacterium tuberculosis и его роль в эпидемическом процессе: дис. д-ра мед. наук. – СПб., 2003. – 173 с.*
7. *Николаевский В.В., Балабанова Я.М., Браун Т. и др. Молекулярное генотипирование штаммов Mycobacterium tuberculosis, циркулирующих в Центральном регионе России: эффективность сполиготипирования и MIRU-VNTR // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2005. – № 4. – С. 9-13.*
8. *Умпелева Т.В., Кравченко М.А., Еремеева Н.И. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов Mycobacterium tuberculosis, циркулирующих на территории Уральского региона России // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3. – № 1. – С. 21-28.*
9. *Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2014. – 72 с.*

10. Drobniewski F., Balabanova Y., Ruddy M. et al. Rifampin- and multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 8. – № 11. – P. 1320-1326.
11. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology // J. Clin. Microbiol. – 1997. – № 35. – P. 907-914.
12. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2006. – № 44. – P. 4498-4510.
13. Surikova O. Voitech D., Kuzmicheva G. et al. Efficient differentiation of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family from Russia using highly polymorphic VNTR loci // Eur. J. Epidemiol. – 2005. – Vol. 20. – № 11. – P. 963-974.
14. Van Embden J.D., Cave M.D., Crawford J.T. et al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology //J. Clin. Microbiol. – 1993. – № 31. – P. 406-409.

Сведения об авторах

Умпелева Татьяна Валерьевна *– старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, кандидат биологических наук*
Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50
Тел. + 7 (343) 333-44-66; моб. + 7 (903) 078-03-73
e-mail: tumpeleva@ya.ru

Голубева Людмила Андреевна *– младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России*
Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50
Тел. + 7 (343) 333-44-66
e-mail: golubeva.luda2010@ya.ru

Лавренчук Леонид Сергеевич *– младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России*
Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50
Тел. + 7 (343) 333-44-66
e-mail: leon5d@list.ru

Кравченко Марионелла Анатольевна *– заведующая лабораторией экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, кандидат биологических наук*
Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50
Тел. + 7 (343) 333-44-66
e-mail: kravchenko@urniif.ru

Еремеева Наталья Ивановна *– старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России,, кандидат биологических наук*
Адрес: 620039, г. Екатеринбург, ул. 22-го Партсъезда, д. 50
Тел. + 7 (343) 333-44-66
e-mail: eremeevani@ya.ru

УДК 615.015.8:579.873.21:57083.1

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *M. TUBERCULOSIS* С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА НА БИОЧИПАХ

Е.Ю. Носова, А.А. Хахалина, А.И. Исакова, К.Ю. Галкина, М.А. Краснова, М.В. Макарова, Л.Ю. Крылова, С.Г. Сафонова

ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

SIMULTANEIUS DETECTION OF GENETIC DETERMINANTS OF EXTENSIVELY DRUG RESISTANCE AND GENOTYPING OF *M. TUBERCULOSIS* BY HYBRIDIZATION ON BIOCHIPS

E.Yu. Nosova, A.A. Khakhalina, A.I. Isakova, K.Yu. Galkina, M.A. Krasnova, M.V. Makarova, L.Yu. Krilova, S.G. Safonova

Проведено ретроспективное исследование генетических детерминант лекарственной устойчивости 150 изолятов МБТ с помощью «ТБ–ТЕСТ» и определена их корреляция с результатами микробиологического определения ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 и Sensititre MycoTB Plate.

Установлено, что из всего спектра мутаций с высоким уровнем устойчивости МБТ к рифампицину, как среди МЛУ, ШЛУ так и монорезистентных, наиболее часто определяется мутация S531L в гене rpoB. Напротив, «пограничным» или низким уровнем устойчивости обладают МБТ с мутациями D516Y, H526L и H526N в этом гене, которые стандартными микробиологическими методами определяются как чувствительные к препарату. Наиболее часто встречаемой мутацией как среди монорезистентных МБТ к изониазиду, так и у МБТ с МЛУ и ШЛУ является S315T в katG, приводящая к высокой степени устойчивости.

В большинстве изолятов высокий и умеренный уровень устойчивости МБТ к фторхинолонам связан с мутациями в гене gyrA или в gyrA/gyrB, а «пограничная» чувствительность и низкая устойчивость – в gyrB. Выявление мутаций в гене eis (низкий уровень устойчивости к канамицину) повышает корреляцию с фенотипическим определением ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 до 93,2%. В Московском регионе, также как и в других регионах России, преобладают МБТ с генотипом Beijing – 78,0% изолятов, из которых 20,0% относились к BO/W148 и ассоциированы с высокой лекарственной устойчивостью МБТ к противотуберкулезным препаратам.

***Ключевые слова**: микобактерии туберкулеза, лекарственная чувствительность к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам и аминогликозидам, мутации, молекулярно-генетические методы, генотип.*

We carried out a retrospective study of 150 MTB isolates to detect drug resistance genetic determinants by "TB–TEST" system and estimate their correlation with the results of the microbiological drug susceptibility testing in BACTEC MGIT 960 and Sensititre MycoTB Plate.

It was found that the substitution S531L in rpoB gene detected in MDR, XDR and monoresistant MTB isolates most frequently among all the spectrum of mutations leading to MTB resistance to high concentration of rifampicin. On the contrary, MTB with the D516Y, H526L and H526N substitutions in rpoB gene were intermediately or low-resistant and were detected as susceptible to rifampicin by standard microbiological methods. The substitution S315T in katG leading to MTB resistance to high concentration of isoniazid was detected in MDR, XDR and monoresistant MTB isolates most frequently.

In most cases high and moderate level of resistance of MTB to fluoroquinolones connected with mutations in gyrA or both in gyrA and gyrB genes and intermediate and low resistance connected with mutations only in gyrB. Detection of mutations in eis gene (low resistance to KAN) increases a correlation with phenotypic DST in Bactec MGIT 960 up to 93.2%. In Moscow region as well as in other regions of the Russian Federation Beijing genotype of MTB prevailed and were detected in 78.0% of cases. 20.0% of Beijing strains had BO/W148 genotype associated with high level of resistance of MTB to antituberculosis drugs.

***Keywords**: Mycobacterium tuberculosis, drug susceptibility to isoniazid, rifampicin, fluoroquinolones and aminoglycosides, mutations, molecular-genetic methods, genotyping.*

В настоящее время можно говорить о наметившейся тенденции к снижению заболеваемости туберкулезом в Российской Федерации. Однако главной проблемой остается нарастание лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* (МБТ) к основным и резервным противотуберкулезным препаратам (ПТП) [35]. Туберкулез, вызванный возбудителем с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, плохо поддается лечению существующими ПТП и требует проведения длительной (18–24 мес.) комплексной дорогостоящей терапии, которая сопровождается серьезными побочными эффектами [6, 14, 38]. Эффективность лечения таких пациентов в первую очередь зависит от быстрого определения профиля лекарственной устойчивости к данным препаратам. В лабораторной диагностике одними из наиболее быстрых методов, применяемых для этих целей, являются посев на жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9 (M7H9)* в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 и молекулярно-генетические тест-системы, позволяющие в течение одного–двух дней определять генетические детерминанты, связанные с лекарственной устойчивостью к ПТП.

Среди молекулярных технологий, позволяющих одновременно определять наиболее значимые мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду (H), рифампицину (R), фторхинолонам (Fq), аминогликозидам (Ag) и этамбутолу (E), основными являются тест-системы гибридизационного анализа на стрипах (GenoType MTBDR*plus*, GenoType MTBDR*sl*) и биочипах («ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2»).

Исследования последних лет в области изучения механизмов формирования лекарственной устойчивости показали, что это длительный адаптивный процесс с вовлечением все новых мутаций в известных генах-мишенях или новых бактериальных генов или межгенных регионов [35]. Так, устойчивость к фторхинолонам у 7% штаммов МБТ связана с мутациями в гене *gyrB* [20, 21, 26], а низкий уровень устойчивости возбудителя к канамицину коррелирует с мутациями в промоторной области гена *eis* [7, 10, 11, 39].

Другой немаловажной проблемой на сегодня является выявление очагов туберкулезной инфекции и путей ее распространения (особенно трансмиссии мультирезистентных штаммов), а также осуществление разграничения случаев экзогенной инфекции и эндогенной реактивации туберкулеза. Генотипирование МБТ изолятов, основанное на анализе специфических нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК возбудителя или олигонуклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяет решать эти задачи [16, 34].

В связи с этим на основе технологии гидрогелевых биочипов, разработанной в Институте молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, создан принципиально новый «ТБ-ТЕСТ», позволяющий определять расширенный спектр генетических детерминант лекарственной устойчивости к рифампицину, изониазиду, этамбутолу, фторхинолонам и аминогликозидам, а также устанавливать генотип наиболее эндемичных для Российской Федерации штаммов.

Цель исследования

Оценить эффективность применения «ТБ-ТЕСТ» для одновременного определения генотипа и генетических детерминант лекарственной устойчивости МБТ к основным противотуберкулезным препаратам I и резервного ряда.

Материалы и методы исследования

Клинические изоляты M. tuberculosis. Для исследования были отобраны 150 клинических изолятов МБТ, ранее охарактеризованных с помощью «ТБ-БИОЧИП», «ТБ-БИОЧИП-2» и GenoType MTBDR*sl*. Изоляты были выделены в жидкой среде *Middlebrook 7H9* с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, Sparks, MD) из диагностического материала больных туберкулезом, находящихся на лечении в Московском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы (МНПЦБТ).

Лекарственную чувствительность (ЛЧ) МБТ определяли двумя методами: в тест-системах BACTEC™ MGIT™ 960 и Sensititre MycoTB (MycoTB).

В BACTEC™ MGIT™ 960 определяли ЛЧ к изониазиду (H), рифампицину (R), этамбутолу (E), офлоксацину (Ofl), моксифлоксацину (Mox), канамицину (K) и амикацину (A) согласно руководству производителя.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) препаратов с использованием Sensititre MycoTB Plate (TREK Diagnostic Systems) определяли, как описано ранее [1, 2, 13]. Для определения МИК суспензию из исследуемой культуры МБТ, приготовленную по 0,5 стандарту мутности McFarland, в количестве 100 мкл переносили в пробирку с обогащенной жидкой питательной средой *Middlebrook 7H9* и засевали по 100 мкл в лунки планшета, содержащие лиофилизированные химиопрепараты в двукратно увеличивающихся концентрациях, и инкубировали при 37 °С. Рост *M. tuberculosis* оценивали через 7–14 дней, в зависимости от скорости роста микобактерий в контрольной лунке без препарата. МИК препарата считали наименьшую его концентрацию, подавляющую видимый рост микроорганизма в лунке. МИК, указывающие на устойчивость (*resistance breakpoints*), основаны на ранее опубликованных (установленных) значениях: H – > 0,25, R – > 1,0, E – > 4,0, A – > 1,0, K – > 5,0, Mox – > 0,5, Ofl – > 2,0 мкг/мл [8, 13, 24]. Изоляты МБТ, для которых определены значения МИК, равные пороговым или на одно разведение ниже, оценивали как «обладающие пограничной чувствительностью», а имеющие МИК на одно разведение выше порогового значения (*breakpoints*) – как «обладающие низким уровнем устойчивости» [1, 2, 13, 25].

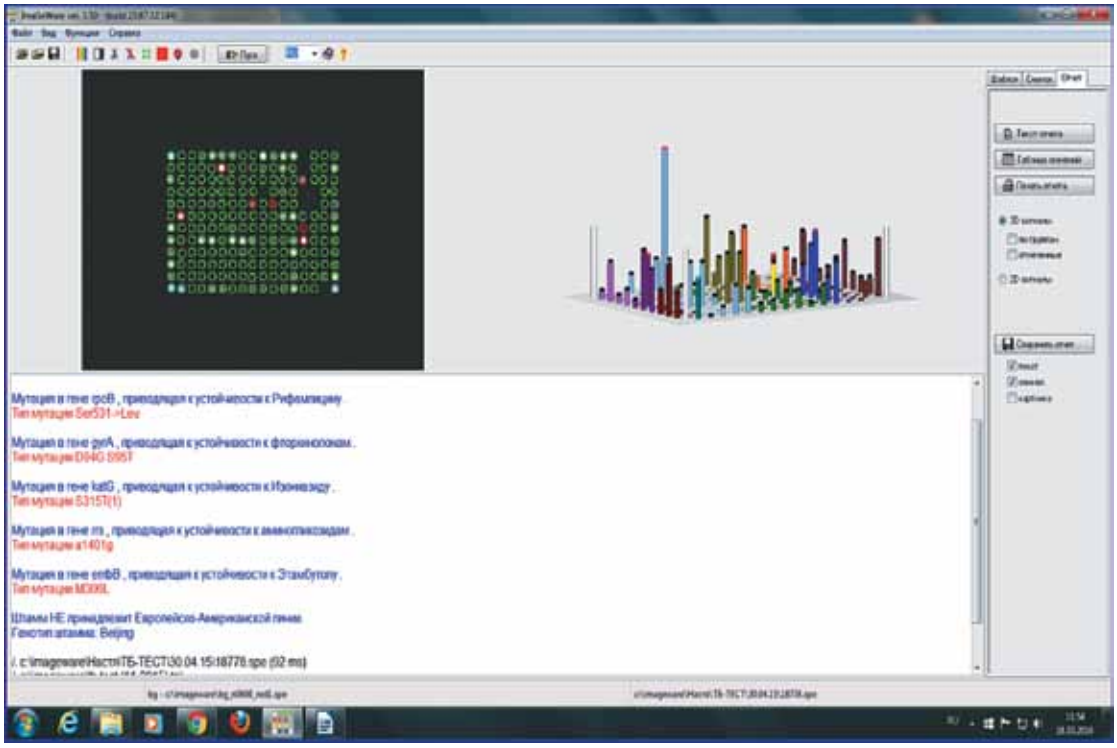


Рисунок. Генотип штамма M.tuberculosis с широкой лекарственной устойчивостью, принадлежащий к линии Beijing.

Выделение ДНК, ПЦР и гибридизация на биочипах. Выделение ДНК из культур МБТ, полученных в системе BACTEC™ MGIT™ 960 проводили на роботизированной станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) с использованием реагентов «М-Сорб» («Синтол», Россия). Проведение ПЦР и гибридизацию на биологических микрочипах проводили согласно прилагаемому протоколу к тест-системе «ТБ-ТЕСТ». Тест-система позволяет определять 28 мутаций в гене *rpoB*, 11 в *katG*, 5 в *inhA*, 5 в *ahpC*, 15 в *gyrA*, 23 в *gyrB*, 4 в *rrs*, 5 в *eis* и 18 в *embB*, а также генотип штаммов, наиболее эндемичных для Российской Федерации (рисунок).

Результаты исследования и обсуждение

В ретроспективном исследовании с помощью «ТБ-ТЕСТ» были охарактеризованы 150 изолятов МБТ и определена корреляция полученных данных с результатами микробиологического определения ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 и Sensititre MycoTB Plate.

Микробиологическое определение ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 показало, что среди 150 изолятов 65 (43,3%) обладали МЛУ и 40 (26,7%) – ШЛУ, 30 (20,0%) были чувствительными к H и R, 2 (1,3%) – монорезистентными к R и 13/150 (8,7%) – к H.

С помощью «ТБ-ТЕСТ» у 30 (20,0%) штаммов МБТ, чувствительных к H и R (в BACTEC™ MGIT™ 960 и MycoTB), мутации в генах *katG*, *inhA*, *oxyR* и *rpoB* не были обнаружены. У 111 из 150 (74,0%) изолятов МБТ обнаружены мутации, приводящие к устойчивости к R и в 118 (78,6%) – к H (табл. 1). 30 изолятов продемонстрировали чувствительность и к H, и к R, мутаций у них обнаружено не было, а МИК составляли для R – от 0,03 до 0,125 мкг/мл, а для H – от ≤ 0,125 до 0,5 мкг/мл.

Среди мутаций в гене *rpoB*, связанных с устойчивостью МБТ к R, наиболее часто встречалась замена S531L, выявленная у 93 из 111 (83,8%) изолятов. У всех МБТ с этой мутацией был определен высокий уровень устойчивости (у 91 МИК была ≥ 16 и у 2 МИК составила 8 мкг/мл) [18, 32]. Четыре культуры с мутациями D516Y, H526L и H526N в BACTEC™ MGIT™ 960 были чувствительными к R и обладали «пограничным» и низким уровнем устойчивости в MycoTB, что согласуется с результатами других авторов [30, 36, 37]. Два монорезистентных к R изолята с мутациями L511R и H526R также обладали высоким уровнем устойчивости (МИК = 8,0 и ≥16,0 мкг/мл, соответственно).

Наиболее часто встречаемой мутацией как среди монорезистентных к H МБТ, так и МБТ с МЛУ/ШЛУ является S315T в *katG* [18, 33]. С помощью «ТБ-ТЕСТ» она была выявлена у 76 из 118 (64,4%) изолятов. Другие замены встретились со следующей частотой: S315T и C15T (*katG* и *inhA*) – у 28 (23,7%), C15T (*inhA*) – у 8 (6,8%), S315T и Ile335Val (*katG*) – у 5 (4,2%) и один (0,9%) – с мутациями S315T, Ile335Val, C15T в обоих генах. У 115 (97,5%) изолятов была установлена МИК от 2 до ≥ 4 мкг/мл и у 3 (2,5%) – 1 мкг/мл, что соответствует высокой и умеренной степени устойчивости. В ранее опубликованных работах показано, что мутация C15T в *inhA* приводит к низкому или умеренному уровню устойчивости МБТ к H [19]. В нашем исследовании 2 из 8 изолятов с мутацией C15T в *inhA*, выявленной у монорезистентных к H МБТ, обладали «пограничной» (МИК = 0,25 мкг/мл) и низкой степенью устойчивости (МИК = 0,5 мкг/мл), однако у 6 из

Таблица 1. Корреляция между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к рифампицину и изониазиду

ТБ-ТЕСТ *rpoB (R)* *katG/inhA* (H)	**МИК** > 1,0 (R) > 0,25 (H)	**Количество штаммов**	**Фенотипическая категория**
Всего изолятов МБТ с мутациями, приводящими к устойчивости к R – 111 В том числе:			
S531L	8,0 – 16,0	93	МЛУ – 60 ШЛУ – 33
S531W	≥ 16,0	1	МЛУ
H526Y	≥ 16,0	2	МЛУ – 1 ШЛУ – 1
H526P	≥ 16,0	1	МЛУ
D516G, L511P	≥ 16,0	1	МЛУ
H526R	≥ 16,0	3	МЛУ – 1 ШЛУ – 1 R^y – 1
D516V	≥ 16,0 и 2,0	3	ШЛУ
H526D	≥ 16,0	1	ШЛУ
H526L	4,0	1	ШЛУ
H526 L	1,0	1	H^y
H526N	0,5	1	H^y
D516Y	0,5 – 1,0	2	H^y
L511R	8,0	1	R^y
Всего изолятов МБТ с мутациями, приводящими к устойчивости к H – 118 В том числе:			
S315T	1,0 – ≥ 4,0	67	МЛУ – 50 ШЛУ – 17
S315T	2,0 – ≥ 4,0	9	H^y
S315T, C15T	2,0 – ≥ 4,0	26	МЛУ – 11 ШЛУ – 15
S315T, C15T	2,0 – ≥ 4,0	2	H^y
S315T, Ile335Val		5	МЛУ – 2 ШЛУ – 3
S315T, C15T Ile335Val	≥ 4,0	1	МЛУ
C15T	2,0 – ≥ 4,0	6	МЛУ – 3 ШЛУ – 3
C15T	0,25 – 0,5	2	H^y

Примечание: H^y – устойчивость к H, R^y – устойчивость к R.

8 устойчивых и к H, и к R МБТ с данной мутацией выявлен высокий уровень устойчивости [33].

Выявленные типы мутаций с помощью «ТБ-ТЕСТ» в вышеуказанных генах в 100% совпали с данными «ТБ-БИОЧИП».

С помощью «ТБ-ТЕСТ» мутации в генах *gyrA* и/или *gyrB* были обнаружены у всех 55 устойчивых изолятов МБТ: у 38 из 55 (72,7%) с ШЛУ, 14 (21,8%) с МЛУ, одного (1,8%) с устойчивостью к H, одного (1,8%) с устойчивостью к R и двух (3,6%) – чувствительных к обоим препаратам (табл. 2).

Высоким уровнем устойчивости к обоим препаратам обладали 20 изолятов с мутациями в кодоне D94 (D94G, D94Y, D94N), но не D94A, а также с редко встречающейся мутацией G88C и двойной мутацией в *gyrA* – A90V, D94N и в *gyrA/gyrB* – D94G/G509A, A90V/D500N, как описано ранее другими авторами [17, 20, 26]. Уровень устойчивости МБТ с мутациями A90V и S91P к Ofl варьировал от среднего до высокого, а к Mox – от низкого до среднего [17, 20]. Низким уровнем устойчивости или «пограничной» чувствительностью к Ofl и низкой устойчивостью к Mox обладали изоляты с заменами D94A, D94V, двойной в *gyrA* – S91P, D94A и в *gyrA/gyrB* – G88A, H70A/G509A. МБТ с мутациями, выявленными только в *gyrB* (у двух изолятов – N538K и у одного – D500H), имели «пограничную» чувствительность и низкую устойчивость к обоим препаратам. В BACTEC™ MGIT™ 960 один штамм с N538K показал устойчивость только к Mox, другой с этой заменой – к обоим препаратам, а изолят с D500H – монорезистентность к Ofl [21, 26]. Таким образом, в большинстве изолятов высокий и умеренный уровень устойчивости МБТ к Fq связан с мутациями в гене *gyrA* или в *gyrA/gyrB*, а «пограничная» чувствительность и низкая устойчивость – в *gyrB* [12, 21, 26]. Значения МИК Mox в 2–4 раза меньше по сравнению с МИК Ofl, что демонстрирует его преимущество в применении для лечения пациентов туберкулезом с МЛУ с МБТ, устойчивыми к Ofl [17, 26].

Необходимо отметить, что в исследуемых изолятах с помощью «ТБ-БИОЧИП-2» мутации были определены только у 49

Таблица 2. Корреляция между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к офлоксацину и моксифлоксацину

ТБ-ТЕСТ *gyrA/gyrB* **(Fq)**	**МИК (мкг/мл)**		**Количество штаммов (*n* = 150)**	**Фенотипическая категория**
	> 2,0 (Ofl)	> 0,5 (Mox)		
A90V/wt	4,0 – 8,0	1,0 – 4,0	7	МЛУ, Fq^y – 1 ШЛУ – 4 H^y, Fq^y – 2
A90V/ D500N	16,0	8,0	1	ШЛУ
S91P/wt	4,0 – 8,0	1,0 – 4,0	4	ШЛУ – 4
D94G/wt	8,0 – 32,0	2,0 – 8,0	20	МЛУ, Fq^y – 4 ШЛУ – 14 Fq^y, K^y – 1 H^y, Fq^y, Ag^y – 1
D94G/ G509A	16,0	4,0	1	ШЛУ
D94N	8,0 – 32,0	2,0 – 8,0	6	МЛУ, Fq^y – 2 ШЛУ – 4
D94Y	8,0	4,0	1	ШЛУ
D94A	2,0 – 8,0	0,5 – 2,0	5	МЛУ, Fq^y – 2 ШЛУ – 1 Fq^y – 1 R^y, Fq^y, Ag^y – 1
D94A/E540D	4,0	2,0	1	ШЛУ
D94V	4,0	0,25; 1,0	2	ШЛУ
G88C	32,0	8,0	1	ШЛУ
S91P, D94A	2,0	0,5	1	ШЛУ
A90V, D94N	16,0	8,0	1	ШЛУ
G88A,H70A/G509A	4,0	1,0	1	МЛУ, Fq^y
wt/N538K	2,0; 4,0	1,0	2	ШЛУ
wt/ D500H	4,0	0,5	1	ШЛУ (Ofl^y)
wt/ wt	0,06 – 1,0	0,06 – 0,5	94	МЛУ – 55 H^y – 10 R^y – 1 $H^ч$, $R^ч$ – 28
wt/ R485C	0,06	0,25	1	МЛУ

Примечание: H^y – устойчивость к H, $H^ч$ – чувствительность к H, R^y – устойчивость к R, $R^ч$ – чувствительность к R, Fq^y– устойчивость к Fq, Ag^y – устойчивость к Ag, K^y – устойчивость к K, Ofl^y – устойчивость к Ofl.

из 55 (89,0%) устойчивых к Fq МБТ и у 48 (87,3%) – с помощью GenoType MTBDR*sl*. Это связано с отсутствием на чипе замен D94V, G88A, H70A в *gyrA* и G88C в GenoType MTBDR*sl*, а также региона гена *gyrB* в обоих тест-системах, что уменьшает корреляцию с микробиологическими результатами.

Устойчивость к K, A и капреомицину (Cap) связана с мутациями в гене 16S-рРНК (*rrs*) в 1400 регионе (A1401G, G1484T, C1402T, C1402A), встречающимися примерно в 60% штаммов, устойчивых к K, и 75% – к A и CAP [10]. Чаще всего встречается замена A1401G, которая приводит к высокому уровню устойчивости к K и перекрестной устойчивости к A и иногда к Cap [9]. Низкий уровень устойчивости к K связывают с мутациями в промоторной области гена *eis*, кодирующего ацетилтрансферазу *Eis* [11, 39].

В нашем исследовании (табл. 3) замена A1401G преобладала среди МБТ. устойчивых к обоим Ag и выявлена у 28 из 33 (84,8%) изолятов, большинство из которых обладали высоким уровнем устойчивости к K и A [7, 9, 40]. Один (3,0%) изолят с мутацией G1484T показал в MycoTB низкий уровень устойчивости к K и «пограничную» чувствительность к A [5]. Мутации в промоторной области гена *eis* были обнаружены в 40 изолятах, из которых три с мутацией C14T были устойчивы к обоим препаратам с умеренным уровнем устойчивости к K и «пограничной» чувствительностью или чувствительностью к A. Остальные замены (C14T, G10A, C12T, G37T) были выявлены у МБТ, устойчивых только к K с низким и умеренным уровнем. У четырех из 40 устойчивых к K изолятов и у одного из 33, устойчивых к обоим Ag, мутации в *rrs* и *eis* не были обнаружены (в таблице выделены жирным шрифтом). Возможно, это связано с мутациями в другом регионе гена *rrs* [40] или в 5′ Untranslated region *whiB7*, не представленных в «ТБ-ТЕСТ» [29].

Тест-система GenoType MTBDR*sl* позволяет определять мутации только в гене *rrs*. С помощью «ТБ-ТЕСТ» дополнительно у 39 (53,4%) изолятов из 73, устойчивых к Ag и/или K определены мутации в гене *eis*, что повышает корреляцию с фенотипическим определением ЛЧ в BACTEC™ MGIT™ 960 до 93,2%.

Таблица 3. Корреляция между типом мутаций и уровнем устойчивости МБТ к канамицину и амикацину

ТБ-ТЕСТ *rrs/eis* **(K, A)**	**МИК (мкг/мл)**		**Количество штаммов (*n* = 150)**	**Фенотипическая категория**
	> 5,0 (K)	> 4,0 (A)		
A1401G/wt	20,0 – 40,0	8,0 – 16,0	28	МЛУ, Agy – 9 ШЛУ – 17 H^y, Fq^y, Ag^y – 1 R^y, Fq^y, Ag^y – 1
G1484T/wt	10,0	2,0	1	ШЛУ
wt /C14T	10,0 – 20,0	1,0 – 2,0	6	МЛУ, K^y – 3 МЛУ, Ag^y – 2 ШЛУ – 1
wt /G10A	5,0 – 10,0	0,25 – 1,0	13	МЛУ, K^y – 2 МЛУ, Fq^y, K^y – 9 H^y, K^y – 2
wt /C12T	2,5 – 5,0	0,25 – 1,0	7	МЛУ, Fq^y, K^y – 4 H^y, Fq^y, K^y – 1 МЛУ, K^y – 2
wt /C12T	40	1	1	МЛУ, Fq^y, K^y – 1
wt /C12T	2,5	0,25	1	МЛУ – 1
wt /G37T	5,0 – 10,0	0,5 – 1,0	12	МЛУ, K^y – 8 МЛУ, Fq^y, K^y – 3 Fq^y, K^y – 1
wt /wt	**2,5**	**0,5**	**1**	**ШЛУ**
wt / wt	**2,5**	**0,5**	**1**	**МЛУ, Fq^y, K^y**
wt / wt	**5 to 10**	**0,25 to 1**	**3**	**МЛУ, K^y – 2** **ШЛУ – 1**
wt / wt	0,6 to 2,5	0,125 to 2	75	$H^ч$, $R^ч$ – 28 R^y – 1 H^y – 8 H^y, Fq^y – 1 МЛУ – 28 МЛУ, Fq^y – 8 Fq^y -1
wt / wt	5,0	1,0	1	МЛУ, Fq^y

Примечание: H^y – устойчивость к H, $H^ч$ – чувствительность к H, R^y – устойчивость к R, $R^ч$ – чувствительность к R, Fq^y– устойчивость к Fq, Ag^y – устойчивость к Ag, K^y – устойчивость к K.

Кроме основных препаратов H, R, Fq и Ag, устойчивость МБТ к которым определяется как ШЛУ, тест-система «ТБ-ТЕСТ» позволяет определять генетические детерминанты устойчивости возбудителя к E, однако роль некоторых из них до конца не ясна [27, 28]. Наиболее часто встречаются мутации в 306-м кодоне, но и они выявляются как у устойчивых, так и у чувствительных к E изолятов [4]. В нашем исследовании в BACTEC™ MGIT™ 960 ЛЧ МБТ к E была определена у 79 из 150 (52,7%) изолятов, в том числе трех (3,8%, монорезистентных к H, 42 (53,2%) с МЛУ и 34 (43,0%) с ШЛУ. С помощью «ТБ-ТЕСТ» мутации обнаружены у 96 из 150 (64,0%) изолятов, из которых 21 был чувствительным к E и 75 – устойчивыми. Наиболее часто встречалась мутация M306V, выявленная в 30,2% изолятах, в 15,6% выявлена мутация D354A, в равном количестве (по 18,8%) обнаружены мутации M306I и Q497R, остальные отмечены в единичных случаях. Достоверной корреляции между типом мутации и уровнем устойчивости МБТ к E не наблюдалось, однако у тех изолятов, в которых определены мутации, но фенотипически сохранялась чувствительность к препарату, МИК соответствовали «пограничному» уровню чувствительности (4,0 мкг/мл). Эти результаты подтверждают предыдущие данные, что методы микроразведений для определения уровня устойчивости, в данном случае с помощью теста MycoTB, лучше коррелируют с выявленными мутациями в *embB* по сравнению с традиционными культуральными методами [41].

Определение генотипа исследуемых изолятов с помощью «ТБ-ТЕСТ» осуществляли на основе анализа олигонуклеотидных полиморфизмов (SNP) (16). Результаты исследования показали, что в московском регионе, также как и в других регионах России, преобладали МБТ с генотипом Beijing, определенные

у 78,0% изолятов, из которых 20,0% относились к BO/W148. Генотипы LAM, европейско-американская линия, Ural и Haarlem определены в значительно меньшем проценте случаев – 8,0%, 8,0%, 4,0% и 2,0% изолятов, соответственно [22, 23]. Доли МБТ с МЛУ и с ШЛУ среди всех изолятов с генотипом Beijing составили 53,8% и 24,8%, соответственно, из которых к линии BO/W148 относились 30,5% и 34,4% штаммов [3, 8, 31]. Наиболее распространенным сочетанием мутаций среди них было S315T и S531L (61,9%), приводящее к высокой степени устойчивости к H и R, из которых 47,4% принадлежали к BO/W148 [15, 24]. В нашем исследовании мутации D94G в *gyrA* и A1401G в *rrs*, приводящие к высокой степени устойчивости к Fq и Ag, определены в 43,9% и 37,0%, из которых 38,9% и 35,0% относились к генотипу BO/W148, соответственно [3, 31]. В то же время замена M306V в гене *embB*, приводящая у большинства штаммов к низкой степени устойчивости, обнаружена в 29,3% изолятов, из которых к BO/W148 принадлежали 28,6%.

Заключение

Исследование показало, что анализ генов *gyrB* (устойчивость к Fq) и *eis* (устойчивость к K), а также определение дополнительных генетических детерминант в гене *embB* (устойчивость к E) с помощью «ТБ-ТЕСТ» значительно повышает корреляцию с фенотипическим определением ЛЧ МБТ к этим препаратам по сравнению с предыдущими версиями тест-систем гибридизационного анализа. Кроме того, из-за ограниченного выбора эффективных лекарственных препаратов в лечении туберкулеза с МЛУ или ШЛУ МБТ, определение типа мутации и связанной с ней степени лекарственной устойчивости МБТ к препаратам основного и резервного ряда может дать полезную информацию для клиницистов для дальнейшей оптимизации проводимого лечения. Одновременное генотипирование изолятов позволяет проводить эпидемиологический мониторинг туберкулезной инфекции, направленный на выявление очагов и предотвращение путей ее распространения.

Литература

1. *Макарова М.В., Сафонова С.Г., Исаева Ю.Д., Крылова Л.Ю., Носова Е.Ю., Литвинов В.И. Определение критической концентрации химиопрепаратов для оценки лекарственной чувствительности Mycobacterium tuberculosis с помощью тест-системы Sensititre MycoTB. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2015. – № 3. – С. 63-67.*
2. *Abuali M., Katariwala R., LaBombardi V. A comparison of the Sensititre MYCOTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 31. – N. 5. – P. 835-839.*
3. *An D., Duyen N., Lan N. et al. Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53. – N. 11. – P. 4835-4839.*
4. *BakuBa Z., Napiórkowska A., Bielecki J. et al. Mutations in the embB gene and their association with ethambutol resistance in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Poland. // BioMed. Res. Intern. – 2013. – Vol. 167954. – P. 5.*
5. *Bauskenieks M., Pole I., Skenders G. et al. Genotypic and phenotypic characteristics of aminoglycoside-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates i n Latvia // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 81.– P. 177-182.*
6. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000–2004. // MMWR. – 2006.– Vol. 55.– P. 301-305.*
7. *Chakravorty S., Lee J., Cho E. et al. Genotypic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates for amikacin and kanamycin resistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic lowenstein-jensen testing. // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – N. 1. – P. 41-53.*
8. *Drobniewski F., Balabanova Y., Nikolayevsky V. et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. // JAMA. – 2005. – Vol. 293. – N. 22. – P. 2726-2731.*
9. *Du Q., Dai G., Long Q. et al. Mycobacterium tuberculosis rrs A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin in clinical isolates from mainland China. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 77. – P. 138-142.*
10. *Georghiou S., Magana M., Garfein R. et al. Evaluation of genetic mutations associated with Mycobacterium tuberculosis resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review. // PloS One. – 2012. – Vol. 7. – e33275.*
11. *Gikalo M., Nosova E., Krylova L., Moroz A. The role of eis mutations in the development of kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from the Moscow region. // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – N. 9. – P. 2107-2109.*
12. *Groll A., Martin A., Jureen P. et al. Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis and mutations in gyrA and gyrB. // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2009. – Vol. 53. – N. 10. – P. 4498-4500.*
13. *Hall L., Jude K., Clark S. et al. Evaluation of the Sensititre MycoTB plate for susceptibility testing of the Mycobacterium tuberculosis complex against first- and second-line agents. // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – N. 11. – P. 3732-3734.*
14. *Haydel S. Extensively drug-resistant tuberculosis: a sign of the times and an impetus for antimicrobial discovery.// Pharmaceuticals (Basel). – 2010. – Vol. 3. – N. 7. – P. 2268-2290.*
15. *Hillemann D., Kubica T., Rüsch-Gerdes S. et al. Disequilibrium in distribution of resistance mutations among Mycobacterium tuberculosis Beijing and non-Beijing strains isolated from patients in Germany. // Antimicrob Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – N. 3. – P. 1229-1231.*
16. *Homolka S., Projahn M., Feuerriegel S. et al. High resolution discrimination of clinical Mycobacterium tuberculosis complex strains based on single nucleotide polymorphisms. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – N. 7. – e39855.*
17. *Kam K., Yip C., Cheung T. et al. Stepwise decrease in Moxifloxacin susceptibility amongst clinical isolates of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: correlation with Ofloxacin susceptibility. // Microb. Drug Resist. – 2006. – Vol. 12. – N. 1. – P. 7-11.*

18. Kambli P., Ajbani K., Sadani M. et al. Defining multidrug-resistant tuberculosis: correlating GenoType MTBDRplus assay results with minimum inhibitory concentrations. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – doi: 10.1016/j. diagmicrobio.
19. Larsen M., Vilche`ze C., Kremer L. et al. Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium smegmatis, M. bovis BCG and M. tuberculosis. // Mol. Microbiol. J. – 2002. – Vol. 46. – P. 453-466.
20. Li J., Gao X., Luo T. et al. Association of gyrA/B mutations and resistance levels to fluoroquinolones in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis. // Emerging. Microbes. Infect. – 2014. – Vol. 3. – e19.
21. Malik S., Willby M., Sikes D. et al. New insights into fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis: functional genetic analysis of gyrA and gyrB mutations. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – N. 6. – P. 1-10.
22. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of Mycobacterium tuberculosis. // Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 26. – P. 342-360.
23. Mokrousov I. The quiet and controversial: Ural family of Mycobacterium tuberculosis. // Infection. Genetics Evolution. – 2012. – Vol. 12. – P. 619-629.
24. Mokrousov I., Limeschenko E., Steklova L. High prevalence of katG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. // Antimicrobial Agents Chemotherapy. – 2002. – Vol. 46. – N. 5. – P. 1417-1424.
25. Mpagama S., Houpt E., Stroup S. et al. Application of quantitative second-line drug susceptibility testing at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. // BMC Infectious Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 432.
26. Nosova E., Bukatina A., Isaeva Y. et al. Analysis of mutations in the gyrA and gyrB genes and their association with the resistance of Mycobacterium tuberculosis to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin. // J. Med. Microbiol. – 2013. – Vol. 62. – P. 108-113.
27. Park Y., Ryoo S., Lee S. et al. Correlation of the phenotypic ethambutol susceptibility of Mycobacterium tuberculosis with embB gene mutations in Korea. // J. Med. Microbiol. – 2012. – Vol. 61. – N. 4. – P. 529-534.
28. Plinke C., Rüsch-Gerdes S., Niemann S. Significance of mutations in embB Codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2006. – Vol. 50. – N. 5. – P. 1900-1902.
29. Reeves A., Campbell P., Sultana R. et al. Aminoglycoside cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis due to mutations in the 5=Untranslated region of whiB7. // AAC. – 2013. – Vol. 57. – N. 4. – P. 1857-1865.
30. Rigouts L., Gumusboga M., Bram de Rijk W. et al. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for Mycobacterium tuberculosis isolates with specific rpoB Mutations. // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51. – N. 8. – P. 2641-2645.
31. Shitikov E., Bespyatykh J., Ischenko D. et al. Unusual large-scale chromosomal rearrangements in Mycobacterium tuberculosis Beijing B0/W148 cluster isolates. // Plos ONE. – 2014. – Vol. 9. – N. 1. – e84971.
32. Springer B., Lucke K., Calligaris-Maibach R. et al. Quantitative drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – N. 6. – P. 1773-1780.
33. Springer B., Calligaris-Maibach R., Ritter C., Böttger E. Tuberculosis drug resistance in an area of low endemicity in 2004 to 2006: semiquantitative drug susceptibility testing and genotyping. // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. N. 12. – P. 4064-4067.
34. Supply P., Allix C. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit–variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – N. 12. – P. 4498-4510.
35. Trauner A., Borrell S., Reither K. et al. Evolution of drug resistance in tuberculosis: recent progress and implications for diagnosis and therapy. // Drugs. – 2014. – Vol. 74. – P. 1063-1072.
36. van Deun A., Barrera L., Bastian I. et al. Mycobacterium tuberculosis strains with highly discordant rifampin susceptibility test results. // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – N. 11. – P. 3501-3506.
37. van Ingen J., Aarnoutse R., de Vries G. et al. Low-level rifampicin-resistantMycobacterium tuberculosis strains raise a new therapeutic challenge. // Intern. J. Tub. Lung. Dis. – 2011. – Vol. 15. – N. 7. – P. 990-992.
38. World Health Organization. Global Tuberculosis Control-Epidemiology, Strategy, Financing. – World Health Organization: Geneva, Switzerland. – 2009.
39. Zaunbrecher M., Sikes J., Metchock B. et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2009. – Vol. 106. – P. 20004-20009.
40. Zhang. Z., Liu M., Wang Y. et al. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates resistant to kanamycin, amikacin, and capreomycin in China. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2014. – Vol. 33. – N. 11. – P. 1959-1966.
41. Zhang Z., Wang Y., Pang Yu. et al. ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with embb mutations in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates// JCM. – 2014. – Vol. 52. – N. 2. – P. 638-641.

Сведения об авторах

Носова Елена Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (495) 603-30-33

Факс + 7 (499) 785-20-82

e-mail: rna68@rambler.ru

Сведения об авторах

Хахалина Анастасия Александровна *– научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33,
Факс + 7 (499) 785-20-82

Галкина Ксения Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
Факс + 7 (499) 785-20-82

Краснова Мария Александровна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. +7 (495) 603-30-33
e-mail: dna77@mail.ru

Крылова Людмила Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
Факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: mika_200417@yahoo.com

Макарова Марина Витальевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
Факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: makarova75@yandex.ru

Сафонова Светлана Григорьевна *– заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
e-mail: safonova.s.g.@inbox.ru

УДК 615.015.8:579.873.21:57083.1

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К РИФАМПИЦИНУ, НА «ФИТНЕС» ШТАММОВ *M. TUBERCULOSIS*

С.Н. Андреевская, И.Ю. Андриевская, Е.А. Киселева, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, Л.Н. Черноусова, А.Э. Эргешов
ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва

THE IMPACT OF MUTATIONS CONNECTED WITH RIFAMPICIN RESISTANCE ON THE *M. TUBERCULOSIS* STRAINS «FITNESS»

S.N. Andreevskaya, I. Yu. Andrievskaya, E.A. Kiseleva, E.E. Larionova, T.G. Smirnova, L.N. Chernousova, A.E. Ergeshov

Для оценки возможного влияния на «фитнес» штаммов M. tuberculosis (МБТ) мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину, с использованием набора «ТБ-БИОЧИП» («Биочип-ИМБ», Россия) проанализирован спектр однонуклеотидных полиморфизмов в rpoB у МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), выделенных от впервые выявленных (309 штаммов) и ранее леченных (324 штамма) больных туберкулезом. В группе штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных, было представлено большее число мутантных вариантов по сравнению со штаммами МБТ, выделенными от впервые выявленных больных. Также для штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом, были продемонстрированы компенсаторные механизмы, направленные на повышение ЛУ за счет возникновения дополнительных мутаций в анализируемом регионе rpoB. В обеих группах преобладали штаммы с заменой 531 Ser → Leu (87,4% и 71,3%, соответственно), что однозначно свидетельствует о сохранении «фитнеса» штаммов, несущих данную мутацию.

***Ключевые слова**: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, спектр мутаций, биологические микрочипы*

To estimate the potential impact of mutations leading to the RIF-resistance on the «fitness» of M. tuberculosis (MTB) we analyzed using TB-BIOCHIP («BIOCHIP IMB» Russia) the spectrum of single nucleotide polymorphisms (SNP) in rpoB gene in 309 MDR-MTB strains obtained from new-detected and 324 MDR-MTB strains obtained from previously treated TB-patients. It was found that in the group of MBT strains isolated from previously treated TB-patients was detected more mutant variants in comparison with MTB strains obtained from new-detected patients. Also MBT strains isolated from previously treated TB-patients had compensatory mechanisms aimed at severization of drug resistance due to additional mutations in the analyzed rpoB region. The strains with SNP 531 Ser → Leu prevailed in both groups (87,4% and 71,3%, respectively), that is clearly pointed to maintenance of «fitness» of strains with this SNP.

***Keywords**: M. tuberculosis, drug resistance, spectrum of mutations, biological microchips*

Введение

Рифампицин является одним из ключевых препаратов при лечении туберкулеза. Он обладает бактерицидным действием как в отношении размножающихся *M. tuberculosis* (МБТ), так и МБТ с низкой метаболической активностью, благодаря этим свойствам удалось сократить курс химиотерапии туберкулеза. Рифампицин связывается с β-субъединицей РНК-полимеразы и блокирует элонгацию цепи РНК. Возникновение у МБТ спонтанных мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину, происходит с частотой 10-7 – 10-8 и в 96% случаев обусловлено мутациями на уровне гена *rpoB* в регионе длиной 81 пара оснований [12]. Геномные альтерации, приводя в итоге к изменению белкового продукта гена, могут оказывать неоднозначное влияние на «фитнес» МБТ – так называют способность возбудителя выживать в макроорганизме и передаваться в популяции [3, 4].

Для оценки возможного влияния на «фитнес» штаммов МБТ мутаций, приводящих к устойчивости к рифампицину, был проанализирован спектр однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в гене *rpoB* у МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), выделенных от впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом.

Спектр мутаций МБТ, выделенных от впервые выявленных больных, будет характеризовать ОНП, которые не оказывают существенного негативного влияния на «фитнес» возбудителя, так как в случае первичного выявления МЛУ речь идет о заражении устойчивым клоном МБТ, что свидетельствует о сохранении его способности к передаче в популяции. Штаммы МБТ, выделенные от ранее леченных больных, могут служить моделью возникновения компенсаторных мутаций под действием химиотерапии или спонтанных мутаций, которые могли возникнуть и закрепиться из-за неадекватного курса лечения. Необходимо отметить, что в рамках представленного исследования из-за особенностей использованной тест-системы будут описаны только компенсаторные мутации, направленные на повышение уровня лекарственной устойчивости к рифампицину.

Материал и методы исследования

Бактериальные штаммы. Исследовано 633 культуры МБТ, из которых 309 были получены от впервые выявленных, а 324 – от ранее леченных больных туберкулезом из клинических отделений Центрального НИИ туберкулеза.

Получение культур МБТ на жидкой среде в системе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, США) было проведено согласно стандартному протоколу изготовителя [10]. Все положительные культуры подвергали контролю на видовую специфичность (принадлежность к микобактериям туберкулеза). Для определения кислотоустойчивости выросшей культуры проводили микроскопию мазков по Цилю–Нельсену [1]. Если в «положительной» пробирке MGIT подтверждалось присутствие кислотоустойчивых бактерий, проводили иммунохроматографический экспресс-тест BD MGIT™ TBc ID для качественного определения антигена комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) MPT64. Тест проводили согласно инструкции изготовителя. При положительном результате теста делали вывод о присутствии в образце МБТ. При отрицательном результате теста и положительном результате микроскопии с окраской по Цилю–Нельсену делали вывод о наличии кислотоустойчивых бактерий, не относящихся к МБТ. Для контроля роста в системе BACTEC™ MGIT™ 960 неспецифической микрофлоры проводили посев культуры на кровяной агар. При наличии роста микроорганизмов на кровяном агаре через 24 часа инкубации при 37 °C делали вывод о контаминации исследуемого материала неспецифической микрофлорой.

Определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ с использованием автоматизированной системы BACTEC™ MGIT™ 960 к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда осуществляли согласно стандартному протоколу производителя [10].

Определение генотипической устойчивости к рифампицину проводили с использованием набора «ТБ-БИОЧИП» («Биочип-ИМБ», Россия) согласно инструкции изготовителя [2]. Выделение ДНК из культур МБТ проводили в роботизированной системе для автоматического раскапывания жидкостей EVO 150 (TECAN, Швеция) с набором реагентов «М-Сорб-Туб-Автомат» («Синтол», Россия) согласно инструкции изготовителя. Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклере «Терцик» («ДНК-Технология», Россия), инкубацию биочипов для осуществления гибридизации проводили в гибридизационной печи LabLine (LabLine, США), визуализацию результатов осуществляли с использованием Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов.

Результаты исследования и обсуждение

Спектр мутаций в гене *rpoB* ***у МЛУ МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом***. При анализе спектра мутаций в гене *rpoB* у МЛУ МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом, было показано, что практически во всех случаях (306 из 309 штаммов, 99,0%) регистрировали единичные замены в анализируемом регионе гена. У трех штаммов было выявлено сочетание одновременно двух мутаций в *rpoB*, в кодонах 511 (Leu → Pro) и 516 (Asp → Gly). Всего было выявлено 13 вариантов замен, затрагивающих четыре кодона (511 – один вариант замены, 516 – три варианта замен, 526 – семь вариантов замен, 531 – два варианта замен) (табл. 1).

Доминирующим вариантом была мутация в 531 кодоне, ведущая к замене Ser → Leu, ассоциированная с высоким уровнем

Таблица 1. Спектр мутаций в гене rpoB у МЛУ МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом

Кодон	Аминокислотная замена	Число штаммов с данной заменой (с учетом сочетанных мутаций) штаммов (*n* = 309)	
		абс.	%
511	Leu → Pro	7 *	2,3
516	Asp → Val	14	4,5
	Asp → Gly	3 **	1,0
	Asp → Tyr	1	0,3
526	His → Arg	2	0,7
	His → Asn	1	0,3
	His → Asp	3	1,0
	His → Cys	3	1,0
	His → Leu	3	1,0
	His → Pro	1	0,3
	His → Tyr	2	0,7
531	Ser → Leu	270	87,4
	Ser → Trp	2	0,7

Примечание:
* включая три штамма, несущих данную замену в сочетании с заменой 516 (Asp → Gly);
** только в виде сочетанных мутаций с 511 (Leu → Pro).

устойчивости к рифампицину, которая встретилась у 270 из 309 (87,4%) штаммов. Вторым по распространенности был вариант 516 (Asp → Val), также связанный с высоким уровнем устойчивости, который встретился у 14 (4,53%) штаммов. Мутация 516 (Asp → Gly), которая приводит к низкому уровню лекарственной устойчивости к рифампицину, встречалась только в сочетании с заменой 511 (Leu → Pro), которая также ассоциируется с низким уровнем ЛУ к рифампицину [8, 9, 11]. Интересно отметить, что мутация 511 (Leu → Pro) встречалась приблизительно с равной частотой как в виде единичных мутаций (четыре штамма), так и в сочетании с 516 (Asp → Gly) (три штамма). Остальные варианты замен в изучаемом регионе *rpoB*, встречавшиеся самостоятельно, регистрировали у 1–3 штаммов МБТ анализируемой выборки.

Спектр мутаций в гене rpoB у МЛУ МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом. В группе МЛУ МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом, у 304 из 324 (93,8%) штаммов были выявлены единичные мутации, ведущие к устойчивости к рифампицину. У 20 штаммов (6,2%) было показано сочетание двух ОНП в анализируемом регионе гена. Всего в данной выборке штаммов было зарегистрировано 17 вариантов замен, затрагивающих семь кодонов (табл. 2).

Как и в группе штаммов, выделенных от впервые выявленных больных, у МБТ, выделенных от ранее леченных пациентов, доминировал вариант 531 (Ser → Leu), который встретился у 231 из 324 (71,3%) штаммов. Также достаточно часто встречался мутантный вариант 516 (Asp → Val) – у 21 (6,5%) штамма, включая один штамм, несущий данную мутацию в сочетании с редкой заменой в 531 кодоне Ser → Gln. Замены 511 (Leu → Pro) и 533 (Leu → Pro), ассоциированные с низким уровнем устойчивости к рифампицину [8, 9, 11], встречались, каждая, у 14 штаммов, часто в сочетании с другими вариантами ОНП в анализируемом регионе *rpoB* (у 5 из 14 и 6 из 14, соответственно). Два ОНП в 526-м кодоне, приводящие к замене His → Asp и His → Tyr, ассоциированные с высоким уровнем устойчивости к рифампицину [11], встречались суммарно у 20 штаммов, причем всегда в виде единичной мутации.

Таблица 2. Спектр мутаций в гене rpoB у МЛУ МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом

Кодон	Аминокислотная замена	Число штаммов с данной заменой (*n* = 324):			
		единичная мутация	в сочетании с другими ОНП	всего	
				абс.	%
511	Leu → Pro	9	5	14	4,3
513	Gln → Leu	1	–	1	0,3
	Gln → Gly	–	2	2	0,6
515	Met → Ile	–	4	4	1,2
516	Asp → Val	20	1	21	6,5
	Asp → Gly	–	7	7	2,2
	Asp → Tyr	5	–	5	1,5
526	His → Asp	12	–	12	3,7
	His → Asn	4	3	7	2,2
	His → Arg	4	–	4	1,2
	His → Leu	4	–	4	1,2
	His → Pro	–	2	2	0,6
	His → Tyr	8	–	8	2,5
531	Ser → Leu	224	7	231	71,3
	Ser → Gln	1	2	3	0,9
	Ser → Tyr	–	1	1	0,3
	Ser → Trp	4	–	4	1,2
533	Leu → Pro	8	6	14	4,3

Заключение

Анализ спектра мутаций в *rpoB*, приводящих к устойчивости к рифампицину, показал, что в группе штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных, было представлено большее число мутантных вариантов по сравнению со штаммами МБТ, выделенными от впервые выявленных больных. Также для штаммов МБТ, выделенных от ранее леченных больных туберкулезом, были продемонстрированы компенсаторные механизмы, направленные на повышение ЛУ за счет возникновения дополнительных мутаций в анализируемом регионе *rpoB*. Однако складывается впечатление, что штаммы МБТ, несущие двойные мутации на уровне *rpoB*, имеют сниженный «фитнес», так как в группе штаммов, выделенных от впервые выявленных больных, как правило, встречаются штаммы с единичными мутациями.

В обеих группах преобладали штаммы с заменой 531 Ser → Leu (87,38% и 71,30%, соответственно), что однозначно свидетельствует о сохранении «фитнеса» штаммов, несущих данную мутацию, и согласуется с данными литературы [5, 6, 11].

Сопоставление частоты встречаемости наиболее распространенных мутантных вариантов у штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных и ранее леченных больных, представлено в таблице 3.

Таблица 3. Частота наиболее распространенных мутаций в rpoB у штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом

Кодон	Замена	Число (%) штаммов в группе:			
		впервые выявленных больных (*n* = 309)		ранее леченных больных (*n* = 324)	
		абс.	%	*абс.*	%
516	Asp → Val	14	4,5	21	6,5
526	His → Asp	3	1,0	12	3,7
	His → Tyr	2	0,6	8	2,5
531	Ser → Leu	270	87,4	231	71,3
533	Leu → Pro	–	–	14	4,3

Как следует из таблицы, у штаммов, несущих мутацию 516 (Asp → Val), «фитнес» сохраняется, так как их частота приблизительно одинакова в обеих группах. В отличие от них штаммы с мутациями в 526-м кодоне His → Asp и His → Tyr обладают сниженным «фитнесом», так как, являясь достаточно распространенными в группе штаммов от ранее леченных больных, крайне редко встречаются среди МБТ, выделенных от впервые выявленных больных. Штаммы, несущие мутацию 533 (Leu → Pro), характеризуются очень низким «фитнесом», так как в группе штаммов, выделенных от впервые выявленных больных, не было ни одного, несущего данный ОНП.

Моделирование динамики развития популяции МБТ в организме хозяина в процессе противотуберкулезной терапии показало, что «фитнес» штамма оказывает большое влияние на исход терапии, а также на вероятность активации латентного туберкулеза [7]. Знания о влиянии конкретных мутаций, ведущих к лекарственной устойчивости на «фитнес», крайне важны для прогнозирования долгосрочного исхода туберкулезного процесса и эпидемической значимости выделенного мутантного клона МБТ. Полученные в рамках проведенного исследования результаты показывают широкое распространение в популяции высоко-трансмиссивных штаммов МБТ с высоким уровнем устойчивости к рифампицину, что свидетельствует о неблагоприятной эпидемиологической ситуации, связанной с распространением туберкулеза с МЛУ МБТ в Российской Федерации.

Литература

1. *О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации / Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 109 от 21.03.2003.*
2. *Руководство по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду на биологических микрочипах «ТБ-БИОЧИП-1». Регистрационное удостоверение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития России № ФСР2011/ 10088 от 03.02.2011 г.*
3. *Borrell S., Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis. // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2009. - Vol. 13. – P. 1456-1466.*
4. *Böttger E.C., Springer B. Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. //Eur. J. Pediatr. – 2008. – Vol. 167. – P. 141-148.*
5. *Fenner L., Egger M., Bodmer T. et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2012. – Vol. 56. – P. 3047-3053.*
6. *Gagneux S., Long C., Small P. et al. The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Science. – 2006. – Vol. 312. – P. 1944-1946.*
7. *Lipsitch M., Levin B. Population dynamics of tuberculosis treatment: mathematical models of the roles of non-compliance and bacterial heterogeneity in the evolution of drug resistance. // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 1998. – Vol. 2. – P. 187-199.*
8. *Moghazeh S., Pan X., Arain T. et al. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates with known rpoB mutations. // Antimicrob. Agents. Chemother. – 1996. – Vol. 40. – P. 2655-2657.*
9. *Ohno H., Koga H., Kohno S. et al. Relationship between rifampin MICs and rpoB mutations of Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Japan. // Antimicrob. Agents. Chemother. – 1996. – Vol. 40. – P. 1053-1056.*
10. *Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960TB System. 2006.*

11. Zaczek A., Brzostek A., Augustynowicz-Kopec E. et al. Genetic evaluation of relationship between mutations in rpoB and resistance of Mycobacterium tuberculosis to rifampin. // BMC Microbiol. – 2009. – Vol. 9. – e10.
12. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13. – P. 1320-1330.

Сведения об авторах

Андреевская Софья Николаевна *– старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. + 7 (499) 785-90-91
e-mail: andsofia@mail.ru

Андриевская Ирина Юрьевна *– младший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. + 7 (499) 785-90-91
e-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Киселева Екатерина Андреевна *– лаборант-исследователь отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. + 7 (499) 785-90-91
e-mail: ekaterinka_kiseleva@mail.ru

Ларионова Елена Евгеньевна *– старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат биологических наук*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. + 7 (499) 785-90-91
e-mail: larionova_lena@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна *– старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. + 7 (499) 785-90-91
e-mail: s_tatka@mail.ru

Черноусова Лариса Николаевна *– руководитель отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор биологических наук, профессор*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. + 7 (499) 785-90-91
e-mail: lchernousova@mail.ru

Эргешов Атаджан Эргешович *– директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук, профессор*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Тел. + 7 (499) 785-90-91
e-mail: cniit@ramn.ru

УДК 57.083.1:579.871.9:615.03

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *M. TUBERCULOSIS* С ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ SENSITITRE MYCOTB

(предпосылки для внесения корректив в лечение больных туберкулезом с широкой лекарственной устойчивостью возбудителя)

М.В. Макарова, Л.Ю. Крылова, Е.Ю. Носова, В.И. Литвинов

ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

CHARACTERISTICS OF XDR *M. TUBERCULOSIS* STRAINS WITH SENSITITRE MYCOTB TEST-SYSTEM

(background to make corrections in antituberculosis therapy of XDR-TB patients)

M.V. Makarova, L.Yu. Krilova, E.Yu. Nosova, V.I. Litvinov

Исследовано 99 культур M. tuberculosis, выделенных от больных туберкулезом. Лекарственную чувствительность к химиопрепаратам определяли в автоматизированной системе Bactec MGIT 960 (Bactec960) и с помощью тест-системы Sensititre MycoTB. Все культуры были взяты для исследования в MycoTB на основании установления ШЛУ в системе Bactec 960.

В результате изучения культур M. tuberculosis в тест-системе Sensititre MycoTB установлено, что имеет место высокий уровень совпадения результатов определения чувствительности/резистентности в этой тест-системе и в Bactec 960. При этом важным является то обстоятельство, что при наличии данных (полученных в Bactec 960) о резистентности культур, в значительном числе случаев они обладают и промежуточной чувствительностью (в MycoTB). Это относится к таким важным для комплексной химиотерапии препаратам как этамбутол, моксифлоксацин, этионамид, канамицин, офлоксацин, ПАСК, амикацин.

Для такой сложной категории больных (M. tuberculosis с ШЛУ) получение сведений о промежуточной чувствительности имеет существенное практическое значение и создает возможности использования определенного резерва для химиотерапии.

***Ключевые слова**: широкая лекарственная устойчивость, Mycobacterium tuberculosis, тест-система Sensititre MycoTB.*

We investigated 99 M. tuberculosis clinical isolates obtained from TB patients. Bactec MGIT 960 (Bactec960) and Sensititre MycoTB test-system performed DST for antituberculosis drugs. All the investigated M. tuberculosis clinical isolates were XDR in Bactec960. The DST results performed by Sensititre MycoTB and Bactec960 showed a high rate of coincidence. On the other hand, the great number of investigated MTB isolates were detected as intermediately susceptible by Sensititre MycoTB test-system. It concerned to such useful drugs for combined chemotherapy as etambutol, maxifloxacin, ethionamide, kanamycin, ofloxacin, paraaminosalicylic acid, amikacin.

Information about intermediate susceptibility had a great practice value and gave a certain reserve for chemotherapy of such challenging category as XDR-TB patiens.

***Keywords**: XDR, Mycobacterium tuberculosis, Sensititre MycoTB test-system*

Введение

Устойчивость *M. tuberculosis* (МБТ) к препаратам, применяемым для лечения туберкулеза – сегодня одна из главных проблем фтизиатрии [5, 6, 16, 17, 18, 19].

Был довольно длительный период, когда решающее значение в отсутствии результата лечения имела множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) МБТ – одновременная устойчивость к двум наиболее эффективным и широко применявшимся противотуберкулезным препаратам – изониазиду и рифампицину. Сегодня серьезной проблемой становится уже широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) возбудителя – сочетание МЛУ и устойчивости хотя бы к одному фторхинолону и аминогликозиду. Описаны также случаи чрезвычайной устойчивости МБТ ко всем препаратам, применяемым для лечения туберкулеза [2, 7, 9, 12, 13].

Все это делает необходимым совершенствование методов определения лекарственной чувствительности МБТ (микробиологических и молекулярно-генетических) с целью получения

наиболее точной информации в возможно более короткие сроки для назначения адекватного лечения.

Многие десятилетия для определения лекарственной чувствительности применяли микробиологические методы (пропорций и абсолютных концентраций), основанные на использовании плотных питательных сред (Левенштейна-Йенсена, Миддлбрука 7H10, 7H11 и др.). Недостатками этих методов являются длительные сроки получения результатов и влияние на них ряда «субъективных моментов» (приготовление сред, препаратов и др.). Позже были разработаны различные методы с использованием жидких сред в автоматизированных системах, главным образом Bactec™ MGIT™ (460, 960), реже другие. Они лишены вышеуказанных недостатков и при этом сокращены сроки культивирования [5, 6, 7, 16, 17].

Серьезной проблемой, ограничивающей их использование в клинике, является принятый в этих тестах принцип оценки результатов – да/нет (чувствительные/устойчивые культуры). Вместе с тем сегодня понятно, что существуют вариации степени чувствительности/устойчивости. По крайней мере об этом свидетельствуют результаты молекулярно-генетических исследований [10, 15].

В настоящее время разработана также микробиологическая тест-система Sensititre MycoTB (MycoTB), которая позволяет оценивать «степень» чувствительности/устойчивости в результате использования разных концентраций большого набора препаратов, применяемых для лечения туберкулеза [2, 3, 4, 8, 11]. При этом, в частности, создаются предпосылки для того, чтобы получить антимикобактериальный эффект в случае повышения доз препарата при лечении больного, даже если результаты других методов свидетельствуют об «устойчивости» МБТ.

Цель работы

Изучение эффективности использования тест-системы Sensititre MycoTB в определении степени чувствительности/устойчивости *M. tuberculosis*, выделенных от больных в московском регионе, к ряду применяемых при лечении туберкулеза препаратов.

Материал и методы исследования

Исследовано 99 культур МБТ, выделенных из респираторного материала больных с хроническими формами туберкулеза. В Централизованной бактериологической лаборатории Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом (МНПЦ борьбы с туберкулезом) культуры были получены на плотной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) или в жидкой среде Миддлбрук 7H9 (7H9) в системе Bactec™ MGIT™ (Bactec 960). Принадлежность культур к *M. tuberculosis* подтверждена микробиологическими и молекулярно-генетическими методами.

Лекарственную чувствительность выделенных культур изучали в Bactec 960 и с помощью тест-системы Sensititre MycoTB.

Тестирование в Bactec 960 проводили согласно стандартной методике определения ЛЧ к химиопрепаратам основного и резервного ряда. Препараты использовали в критических концентрациях (КК), рекомендованных ВОЗ.

Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) препаратов в тест-системе Sensititre MycoTB суспензию из исследуемой культуры МБТ, приготовленную по 0,5 стандарту мутности McFarland, в количестве 100 мкл переносили в пробирку с обогащенной жидкой питательной средой Миддлбрук 7H9 и засевали по 100 мкл в лунки планшета, содержащие лиофилизированные химиопрепараты в двукратно увеличивающихся концентрациях, и инкубировали при 37 ° С. Рост *M. tuberculosis* оценивали через 7–14 дней, в зависимости от скорости роста микобактерий в контрольной лунке без препарата. МИК препарата считали наименьшую его концентрацию, подавляющую видимый рост микроорганизмов в лунке, и сравнивали ее со значениями КК, ранее установленными в МНПЦ борьбы с туберкулезом (изониазида – 0,25, рифампицина – 1,0, этамбутола – 4,0, стрептомицина – 2,0, амикацина – 1,0, канамицина – 5,0, моксифлоксацина – 0,25, офлоксацина – 2,0 мкг/мл) или предложенными S. Mpagama и соавт. [14] (аминосалициловой кислоты – 2,0, этионамида – 5,0, циклосерина – 32,0 мкг/мл).

Штаммы *M. tuberculosis*, для которых были определены значения МИК, равные значениям КК или на одно разведение выше либо ниже, оценивали как обладающие промежуточной чувствительностью/устойчивостью.

Наличие ШЛУ штаммов *M. tuberculosis* установили на основании предварительных результатов, полученных в Bactec 960 (поскольку лекарственную чувствительность всех культур в практической работе лаборатории МНПЦ борьбы с туберкулезом главным образом исследуют этим методом), затем культуры исследовали в Sensititre MycoTB.

Результаты и обсуждение

Сведения о степени чувствительности/устойчивости изученных (в MycoTB) культур *M. tuberculosis*, обладающих ШЛУ, представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, в MycoTB большинство культур были устойчивы к изониазиду, рифампицину, стрептомицину, офлоксацину, этамбутолу и моксифлоксацину, половина (или почти половина) – к канамицину, амикацину и этионамиду и лишь 21,2% – к аминосалициловой кислоте и 6,1% – к циклосерину.

Кроме того, определенное количество штаммов *M. tuberculosis* обладало промежуточной чувствительностью к химиопрепаратам (к разным в разной степени).

Несмотря на то что в литературе имеются сведения (немного) о высокой степени совпадения результатов, полученных

Таблица 1. Результаты изучения чувствительности в MycoTB штаммов M. tuberculosis, обладающих ШЛУ (n = 99)

Лекарственный препарат	Количество штаммов:					
	чувствительных		с промежуточной чувствительностью / устойчивостью		устойчивых	
	абс.	%	*абс.*	%	*абс.*	%
Изониазид	–	–	4	4,0	95	96,0
Рифампицин	3	3,0	4	4,0	92	93,0
Стрептомицин	10	10,1	10	10,1	79	79,8
Этамбутол	–	–	36	36,4	63	63,6
Амикацин	36	36,4	22	22,2	41	41,4
Канамицин	20	20,2	29	29,3	50	50,5
Моксифлоксацин	–	–	31	31,3	68	68,7
Офлоксацин	–	–	18	18,2	81	81,8
Аминосалициловая кислота	59	59,6	19	19,2	21	21,2
Циклосерин	90	90,9	3	3,0	6	6,1
Этионамид	18	18,2	37	37,4	44	44,4

в Sensititre MycoTB и другими методами [2, 3, 4, 8, 11], авторы сочли целесообразным также сопоставить соответствующие данные с таковыми в Bactec 960. Такое сопоставление имеет смысл, в частности, потому, что свойства *M. tuberculosis* могут отличаться в разных регионах мира.

Было установлено (табл. 2–5), что имеется высокая степень совпадения результатов двух методов при определении чувствительности/устойчивости к большинству химиопрепаратов: 90–100% – к изониазиду, рифампицину, стрептомицину, амикацину, циклосерину, около 80–85% – к этамбутолу, моксифлоксацину, офлоксацину, канамицину, аминосалициловой кислоте и около 70% – к этионамиду. Различия, в частности в отношении этионамида, связаны с тем, что для большинства штаммов были установлены МИК, близкие к значению КК. Поэтому при тестировании с использованием одной КК в Bactec 960 часть подобных штаммов была оценена как чувствительные, а часть – как устойчивые.

С практической точки зрения особое внимание имеет смысл обратить на культуры устойчивые в Bactec 960, но обладающие промежуточной чувствительностью в MycoTB (табл. 6).

Такой анализ важен потому, что промежуточные результаты при определении лекарственной чувствительности могут быть чрезвычайно полезны при назначении лечения больным из этого сложного контингента (ШЛУ МБТ).

Количество культур, показавших промежуточные результаты, было существенным при определении лекарственной

Таблица 2. Сопоставление результатов определения лекарственной чувствительности МБТ (n = 99) к препаратам основного ряда в MycoTB и Bactec 960

Препарат	Метод исследования				% совпадений
	MycoTB		Bactec 960		
Изониазид	чувствительные	2	чувствительные	–	98,0
			устойчивые	2	
	устойчивые	97	чувствительные	–	
			устойчивые	97	
Рифампицин	чувствительные	3	чувствительные	–	97,0
			устойчивые	3	
	устойчивые	96	чувствительные	–	
			устойчивые	96	
Стрептомицин	чувствительные	10	чувствительные	3	92,9
			устойчивые	7	
	устойчивые	89	чувствительные	–	
			устойчивые	89	
Этамбутол	чувствительные	36	чувствительные	17	80,8
			устойчивые	19	
	устойчивые	63	чувствительные	–	
			устойчивые	63	

Примечание: в таблицах 2–5 штаммы с промежуточной чувствительностью/устойчивостью, в отношении которых в Sensititre MycoTB установлены МИК, равные КК или ниже на одно разведение, в этих таблицах отнесены к чувствительным, а на одно разведение выше – то к устойчивым

Таблица 3. Сопоставление результатов определения лекарственной чувствительности МБТ (n = 99) к фторхинолонам в MycoTB и Bactec 960

Препарат	Метод исследования				% совпадений
	MycoTB		Bactec 960		
Моксифлоксацин	чувствительные	17	чувствительные	5	83,8
			устойчивые	12	
	устойчивые	82	чувствительные	4	
			устойчивые	78	
Офлоксацин	чувствительные	18	чувствительные	4	85,9
			устойчивые	14	
	устойчивые	81	чувствительные	0	
			устойчивые	81	

Таблица 4. Сопоставление результатов определения лекарственной чувствительности МБТ (n = 99) к аминогликозидам в MycoTB и Bactec 96

Препарат	Метод исследования				% совпадений
	MycoTB		Bactec 960		
Амикацин	чувствительные	56	чувствительные	47	90,9
			устойчивые	9	
	устойчивые	43	чувствительные	0	
			устойчивые	43	
Канамицин	чувствительные	20	чувствительные	0	79,8
			устойчивые	20	
	устойчивые	79	чувствительные	0	
			устойчивые	79	

Таблица 5. Сопоставление результатов определения лекарственной чувствительности МБТ (n = 99) к препаратам резервного ряда в MycoTB и Bactec 960

Препарат	Метод исследования				% совпадений
	MycoTB		Bactec 960		
Аминосалициловая кислота	чувствительные	78	чувствительные	63	79,8
			устойчивые	15	
	устойчивые	21	чувствительные	5	
			устойчивые	16	
Циклосерин	чувствительные	94	чувствительные	92	97,0
			устойчивые	2	
	устойчивые	5	чувствительные	1	
			устойчивые	4	
Этионамид	чувствительные	48	чувствительные	25	69,7
			устойчивые	23	
	устойчивые	51	чувствительные	7	
			устойчивые	44	

чувствительности к аминосалициловой кислоте, этионамиду, циклосерину, канамицину, несколько меньше – к офлоксацину, этамбутолу, еще меньше – к амикацину, моксифлоксацину и стрептомицину; единичные штаммы имели промежуточную чувствительность к изониазиду и рифампицину. Кроме того, по данным MycoTB к некоторым препаратам исследованные штаммы в значительном числе случаев сохраняли чувствительность (большинство – к циклосерину, $^2/_3$ – к аминосалициловой кислоте, почти половина – к амикацину, $^1/_3$ – к этионамиду). То есть подсчет процентов промежуточной чувствительности/устойчивости к каждому препарату осуществляли для разного количества устойчивых штаммов, и, если суммировать показатели чувствительности и промежуточной чувствительности/устойчивости, становится понятным, что все-таки имеются существенные резервы для лечения этого тяжелого контингента больных.

Конечно, в отношении, например, изониазида и циклосерина, речь идет только об отдельных культурах, но следует иметь в виду, что у этого контингента больных чрезвычайно важно иметь сведения о каждом препарате, который может быть дополнительно назначен (возможно, с коррекцией дозы). Что касается остальных препаратов, к которым культуры микобактерий были чувствительны или пограничнo чувствительны, то эти сведения, бесспорно, должны быть учтены при назначении химиотерапии. Разумеется, в данной ситуации особенно важно также учитывать и результаты молекулярно-генетических исследований [1, 2, 10, 15].

Таким образом, ШЛУ микобактерий туберкулеза ставит перед клинической практикой чрезвычайно сложные задачи выбора препаратов для замены основных схем лечения. Поскольку в такие схемы сегодня входят пять и более препаратов – это далеко не просто. Конечно, в тот период,

когда для успешного лечения туберкулеза было достаточно одного препарата (эра стрептомицина), а затем – двух-трех, лекарственная устойчивость не создавала столь сложных проблем, но со временем, благодаря эпидемиологическим и биологическим процессам, а в немалой степени неправильному применению имеющихся препаратов, эта проблема стала ключевой. Ситуацию усугубляет и то, что новые противотуберкулезные препараты создают крайне редко, вслед за стрептомицином были созданы изониазид, рифампицин, а затем стали широко использовать препараты широкого спектра действия – такие как фторхинолоны, аминогликозиды и др. Сегодня и к этим препаратам у МБТ нередко развивается лекарственная устойчивость. При этом на одно из первых мест выходит взаимная ответственность фтизиатров и лабораторных работников: правильный выбор и четкая интерпретация результатов небольшого набора имеющихся сегодня лабораторных методов, с одной стороны, и правильное и своевременное их использование в процессе лечения – с другой.

Можно также отметить, что сегодня имеются тест-системы Sensititre для определения лекарственной чувствительности и нетуберкулезных микобактерий: SloMyco (для медленнорастущих) и RapMyco (для быстрорастущих) [1, 2]. Учитывая постоянное увеличение количества больных микобактериозами, которые, как правило, обращаются к фтизиатру и затем попадают во фтизиатрическую клинику, наличие таких методов определения лекарственной чувствительности немаловажно для лечения этой патологии (его принципы существенно отличаются от таковых при туберкулезе). Сегодня это реальная ситуация, которая пока не решена в организационном плане.

Следует иметь в виду, что в панели Sensititre MycoTB довольно большое количество антибактериальных препаратов и нет никаких препятствий для ее расширения и включения любых других препаратов.

Исходя из всех вышеуказанных положений, использование количественного метода, позволяющего определять степень лекарственной чувствительности микобактерий к большому спектру противотуберкулезных препаратов, создает предпосылки для определенного «маневра» в клинике у постели больных из этого тяжелого контингента.

Таблица 6. Промежуточная лекарственная чувствительность/устойчивость в MycoTB штаммов M. tuberculosis, устойчивых при исследованиях в Bactec 960 (n = 99)

Лекарственный препарат	Результаты изучения лекарственной чувствительности МБТ:			
	устойчивость в Bactec 960		из них в MycoTB промежуточная чувствительность/устойчивость	
	абс.	%	*абс.*	%
Изониазид	99	100,0	4	4,0
Рифампицин	96	97,0	4	4,2
Стрептомицин	96	97,0	10	10,4
Этамбутол	82	82,8	19	23,2
Амикацин	52	52,3	9	17,3
Канамицин	99	100,0	29	29,3
Моксифлоксацин	90	90,9	14	15,5
Офлоксацин	95	96,0	22	23,2
Аминосалициловая кислота	31	31,3	15	48,4
Циклосерин	6	6,1	2	33,3
Этионамид	67	67,7	23	34,3

Заключение

В результате изучения культур *M. tuberculosis* в тест-системе Sensititre MycoTB установлено, что имеет место высокий уровень совпадения результатов определения чувствительности/устойчивости в этой тест-системе и в Bactec™ MGIT™ 960. Следует подчеркнуть, что к ряду препаратов (например, циклосерину, аминосалициловой кислоте и др.) чувствительность сохранялась в большом числе случаев, то есть определенный резерв для химиотерапии имеется. При этом важным является то обстоятельство, что культуры МБТ при наличии данных Bactec™ MGIT™ 960 об их лекарственной устойчивости, в значительном числе случаев обладают и промежуточной чувствительностью/устойчивостью (по данным MycoTB). Это относится к таким важным для комплексной химиотерапии препаратам, как этамбутол, моксифлоксацин, этионамид, канамицин, офлоксацин, аминосалициловая кислота, амикацин.

Для такой сложной категории больных туберкулезом – с ШЛУ возбудителя, получение сведений о промежуточной чувствительности/устойчивости имеет существенное практическое значение и создает предпосылки использования определенного резерва для химиотерапии.

Литература

1. *Лабораторная диагностика туберкулеза / под ред. В.И. Литвинова, А.М. Мороза. – М.: МНПЦБТ. – 2001. – 176 с.*
2. *Литвинов В.И., Макарова М.В., Краснова М.А. Нетуберкулезные микобактерии // М.: МНПЦБТ. – 2008. – 255 с.*
3. *Abuali M., Katariwala R., LaBombardi V. A comparison of the Sensitive® MycoTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 31. – N. 5. – P. 835-839.*
4. *Banu S., Rahman S., Khan M. et al. Discordance across several methods for drug susceptibility testing of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in a single laboratory. // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52. – N. 1. – P. 156-163.*
5. *Chiang C., Centis R., Migliori G. Drug-resistant tuberculosis: past, present, future. // Respirology. – 2010. – Vol. 15. – N. 3. – P. 413-432.*
6. *Daley C., Caminero J. Management of multidrug resistant tuberculosis. // Semin. Respir. Crit. Care Med. – 2013. – Vol. 34. – N. 1. – P. 44-59.*

7. Giinther G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges. // Clin. Med. – 2014. – Vol. 14. – N. 3. – P. 279-285.
8. Hall L., Jude K., Clark S. et al. Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtitre plate format. // J. Vis. Exp. – 2011. – Vol. 24. – N. 52. – P. 3094.
9. Heifets L. Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections. – CRC press, 1991. – 212 p.
10. Kalokhe A., Shafiq M., Lee J. et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing. // Am. J. Med. Sci. – 2013. – Vol. 345. – N. 2. – P. 143-148.
11. Lee J., Armstrong D., Ssengooba W. et al. Sensititre MycoTB MIC plate for testing Mycobacterium tuberculosis susceptibility to first- and second-line drugs. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2014. – Vol. 58. – N. 1. – P. 11-18.
12. Lynch J. Multidrug-resistant Tuberculosis. // Med. Clin. North. Am. – 2013. – Vol. 97. – N. 4. – P. 553–579.
13. Matteelli A., Roggi A., Carvalho A. Extensively drug-resistant tubercu-losis: epidemiology and management. // Clin. Epidemiol. – 2014. – Vol. l. – N. 6. – P. 111-118.
14. Mpagama S., Houpt E., Stroup S. et al. Application of quantitative second-line drug susceptibility at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. // BMC Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 432-441.
15. Smith T., Wolff K., Nguyen L. Molecular biology of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2013. – Vol. 374. – P. 53-80.
16. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. / Summary report of the Expert Group Meeting on the Use of Liquid Culture Media. – Geneva: WHO, 2007.
17. WHO Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis: 2011 update. – Geneva: WHO, 2011.
18. WHO Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. / Companion Handbook. – Geneva: WHO, 2014.
19. Zignol M. Drug-resistant tuberculosis in the WHO European Region: an analysis of surveillance data. // Drug Resist. Updat. – 2013. – Vol. 16. – N. 6. – P. 108-15.

Сведения об авторах

Макарова Марина Витальевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (916) 688-98-25, факс + 7 (495) 964-86-37
e-mail: makarova75@yandex.ru

Крылова Людмила Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: mika_200417@yahoo.com

Носова Елена Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33, факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: rna68@rambler.ru

Литвинов Виталий Ильич *– научный руководитель ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор, академик РАН*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 268-04-15
e-mail: mnpcbtlv@yandex.ru

УДК 616.24-002.5:616.05.8

БАКТЕРИАЛЬНАЯ НАГРУЗКА РЕСПИРАТОРНОГО И ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ С СОХРАНЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ, МНОЖЕСТВЕННОЙ И ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Б.И. Вишневский, О.А. Маничева, Н.Н. Мельникова, М.З. Догонадзе, Л.Н. Стеклова, А.И. Иноземцева
ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

THE BACTERIAL BURDEN OF THE RESPIRATORY AND OPERATIVE SAMPLES FROM PATIENTS WITH DRUG-SENSITIVE, MULTIDRUG-RESISTANT AND EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT PULMONARY TUBERCULOSIS

B.I. Vishnevskiy, O.A. Manicheva, M.Z. Dogonadze, N.N. Melnikova, L.N. Steklova, A.I. Inozemtseva

Исследована бактериальная нагрузка в сопоставлении с лекарственной чувствительностью (ЛЧ) МБТ из респираторного (РМ) и операционного материала (ОМ) у ранее леченных больных (клиники СПб НИИФ, 2010–2014 гг.): I – неоперированные пациенты (153 штамма), II – оперированные, с хроническим и гиперхроническим процессом (546 штаммов), III – контроль, неоперированные пациенты с сохраненной ЛЧ МБТ (79 штаммов). При МЛУ и ШЛУ ростовые свойства МБТ не отличаются от таковых при сохранении ЛЧ. Подтверждена известная закономерность, что частота высокой бактериальной нагрузки (КОЕ ≥ 100) РМ значимо выше, чем ОМ – 63,7% против 41,9%. В ОМ высокая и средняя степень бактериальной нагрузки при ШЛУ выявлялась значимо чаще, чем при МЛУ – суммарно 71,7% против 53,7%. В группе оперированных больных преобладают пациенты с высокой степенью обсемененности РМ, что свидетельствует о сохранении высокой жизнеспособности возбудителя как при МЛУ, так и ШЛУ.

***Ключевые слова**: бактериальная нагрузка, респираторный материал, операционный материал, лекарственная чувствительность, множественная лекарственная устойчивость, широкая лекарственная устойчивость*

It were investigated the drug sensitivity (DS) of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) and the bacterial burden of respiratory (RS) and surgery (OS) samples derived from previously treated patients (clinics of SPb Institute for Phthisiopulmonology, 2010-2014): I group – patients without surgery treatment (153 strains), II – operated patients, mainly with chronic and hyperchronic disease (546 strains), III – reference group, non-operated patients with MTB DS (79 strains). It was found that the growth properties of MTB with MDR and XDR have no differences with the growth properties of MTB with drug sensitivity. The known regularity was confirmed that in the cases of MDR the frequency of MTB burden in RS is much higher than in OS – 63.7% vs 41,9%. In OS high and medium degree of MTB burden in the cases of XDR was observed much more frequently than in MDR cases – totally 71.7% vs 53.7%. Persons with the high degree of MTB burden in RS had dominated in the group of operated patients. This confirms that the high viability of MTB is retained both in MDR cases as in XDR cases.

***Keywords**: MTB burden, respiratory sample, operative sample, drug sensitivity, multidrug resistance (MDR), extensively drug resistance (XDR).*

Введение

Проблема лекарственной устойчивости (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) и особенно множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) признана ВОЗ глобальной угрозой [7]. Происходит не только возрастание суммарной ЛУ, но и утяжеление ее структуры за счет роста множественной и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) [2, 4, 8]. В последние годы причиной смерти больных туберкулезом в 98% случаев являются штаммы МБТ с МЛУ/ШЛУ [3].

Помимо этого, особую актуальность исследованиям ЛУ придают выявленные компенсаторные мутации лекарственной устойчивости МБТ («secondary mutations»), в результате

Таблица 1. Сводные данные исследованного диагностического материала и определения лекарственной чувствительности МБТ

Диагностический материал	Число штаммов МБТ					
	чувствительных		МЛУ		ШЛУ	
	абс.	%	*абс.*	%	*абс.*	%
Респираторный материал неоперированных больных	79	34,1	86	37,1	67	28,9
Респираторный материал оперированных больных	–	–	146	40,3	216	59,7
Операционный материал оперированных больных	–	–	67	36,4	117	63,6

которых сохраняется не только скорость роста, часто замедленная у лекарственно-устойчивых штаммов, но даже и показатели вирулентности [6].

Изменение профиля фенотипической лекарственной устойчивости в сторону увеличения ШЛУ в популяции возбудителя туберкулеза может сопровождаться изменением и других фенотипических свойств Mycobacterium tuberculosis. Некоторое время бытовало мнение, что устойчивость к противотуберкулезным препаратам (ПТП) приводит к уменьшению жизнеспособности МБТ, проявляющемуся, в частности, в снижении ростовых свойств.

Однако в широкомасштабном исследовании (полногеномное секвенирование 1000 штаммов МБТ, полученных от больных туберкулезом Самарской области) N. Casali и соавт. [5] показали особенности именно российских мультирезистентных штаммов. В 65% у мультирезистентных изолятов была выявлена ранее неизвестная компенсаторная мутация, позволяющая микобактериям преодолевать связанный с развитием устойчивости эффект снижения способности к быстрому размножению. Поэтому дальнейшие исследования взаимоотношения лекарственной устойчивости и ростовых свойств МБТ являются актуальными.

Цель исследования

Оценить жизнеспособность МБТ по массивности бактериовыделения из операционного и респираторного материала при туберкулезе органов дыхания с сохраненной лекарственной чувствительностью, множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя.

Материал и методы исследования

Исследовали 79 лекарственно-чувствительных и 699 МЛУ/ШЛУ штаммов МБТ, выделенных из диагностического материала больных туберкулезом органов дыхания, находившихся на лечении в клиниках Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии в 2010–2014 гг. Сформированы группы: I – неоперированные ранее леченные больные (только респираторный материал: мокрота, промывные воды бронхов, смывы при фибробронхоскопии и т. п., 153 штамма), II – оперированные больные с хроническим и гиперхроническим процессом (респираторный и операционный материал: ткань легкого, содержимое и стенка каверны, содержимое очага, туберкулема и т. п., 546 штаммов), III – контрольная группа – 79 штаммов от неоперированных пациентов с сохраненной лекарственной чувствительностью МБТ (табл. 1).

Для культивирования МБТ использовали плотные яичные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-II, приготовленные в бактериологической лаборатории в соответствии с Инструкцией № 11 Приказа № 109 Минздрава России и сертифицированные наборы реагентов для работы с автоматизированной системой BACTEC™MGIT™ 960 (Becton Dickinson, США).

Чувствительность культур МБТ к противотуберкулезным препаратам (стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу, пиразинамиду, этионамиду, офлоксацину, канамицину, амикацину, капреомицину, циклосерину, аминосалициловой кислоте) определяли непрямым методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена (Приказ № 109 Минздрава России), а также тестированием в автоматизированной системе BACTEC™MGIT™ 960 согласно инструкции производителя.

Бактериальную нагрузку оценивали по числу КОЕ (колониеобразующие единицы): как высокую при КОЕ ≥ 100, умеренную – при числе КОЕ от 21 до 99, скудную – при КОЕ ≤ 20. В каждой группе вычисляли процент посевов с высокой, умеренной и скудной бактериальной нагрузкой. Различия между группами оценивали с помощью критерия χ^2, используя программу VassarStats.

Результаты исследования и обсуждение

При анализе частоты встречаемости множественной и широкой лекарственной устойчивости МБТ в респираторном материале оперированных и неоперированных больных (рис. 1) выявлено, что ШЛУ у оперированных больных наблюдается достоверно чаще (59,7% против 43,8%, $p = 0{,}001$), и это абсолютно логично, поскольку, как указано выше, среди оперированных преобладали больные с хроническим и гиперхроническим процессом. Что касается МЛУ, то здесь зависимость обратная.

На рисунке 2 представлены сравнительные данные о массивности бактериовыделения из респираторного материала при сохраненной лекарственной чувствительности МБТ (контроль), МЛУ и ШЛУ МБТ.

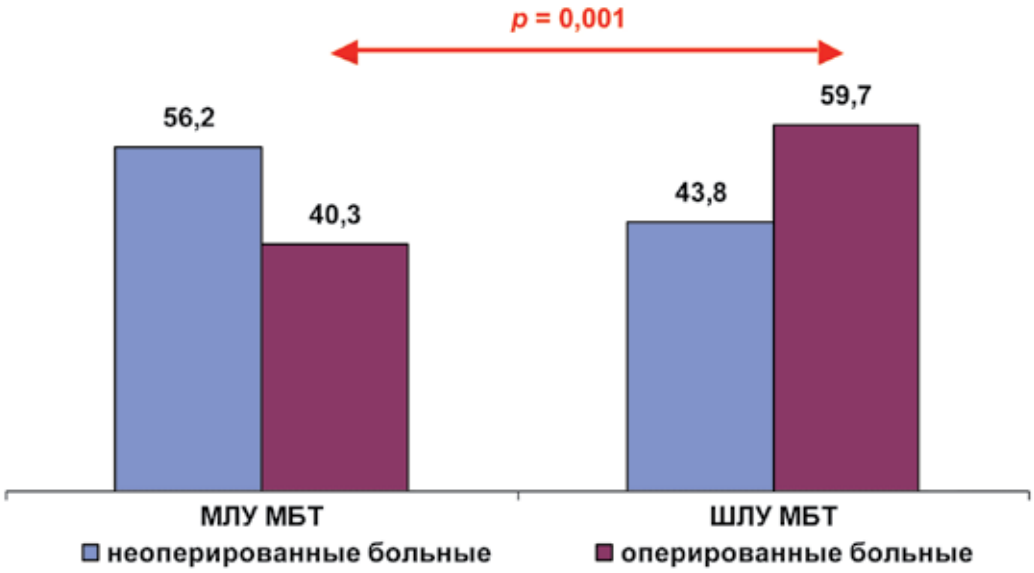


Рис. 1. Частота МЛУ и ШЛУ у МБТ, выделенных из респираторного материала оперированных и неоперированных больных (%)

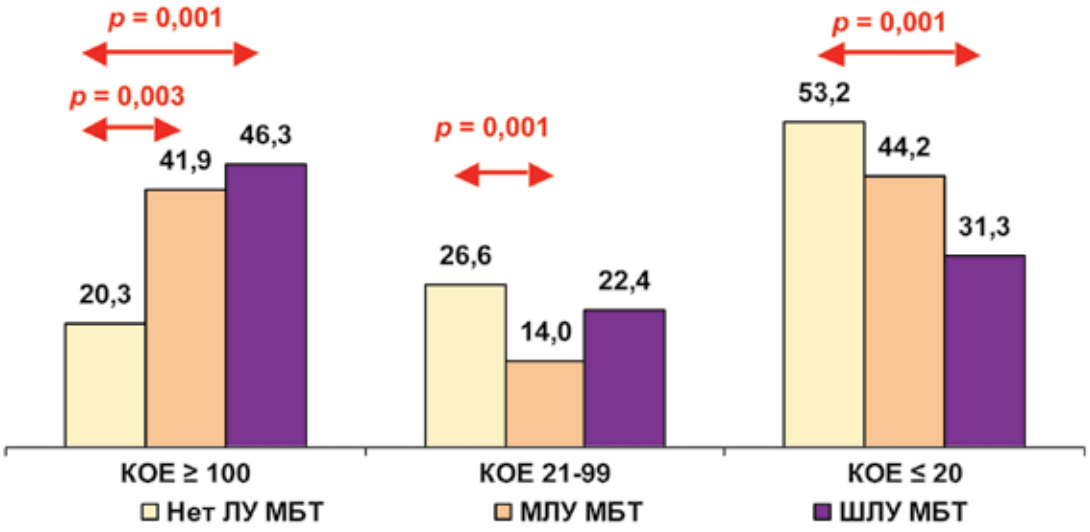


Рис. 2. Массивность бактериовыделения из респираторного материала неоперированных больных при сохраненной лекарственной чувствительности, МЛУ и ШЛУ МБТ (%)

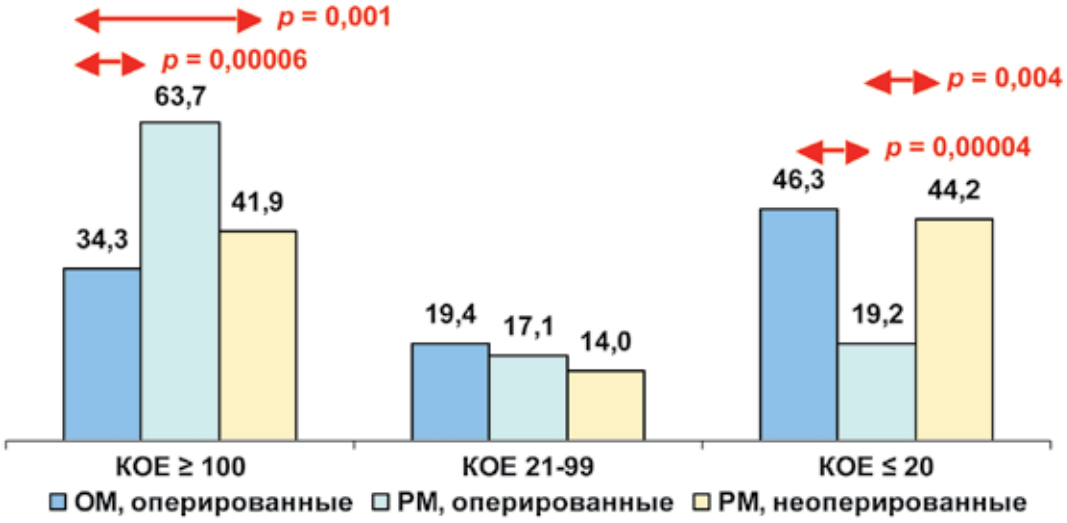


Рис. 3. Бактериальная нагрузка диагностического материала оперированных и неоперированных больных при МЛУ МБТ (ОМ – операционный материал, РМ – респираторный материал) (%)

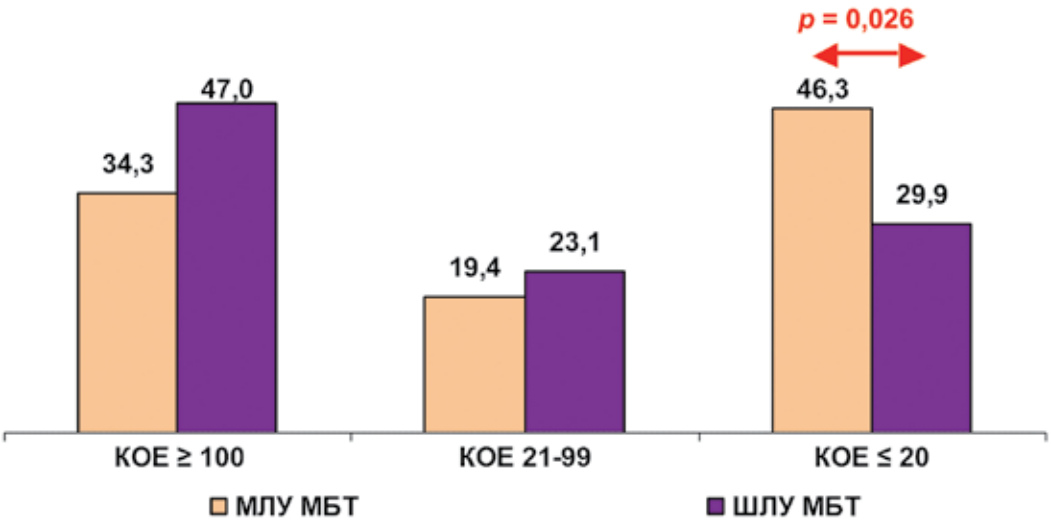


Рис. 4. Бактериальная нагрузка операционного материала больных при ШЛУ и МЛУ МБТ (%)

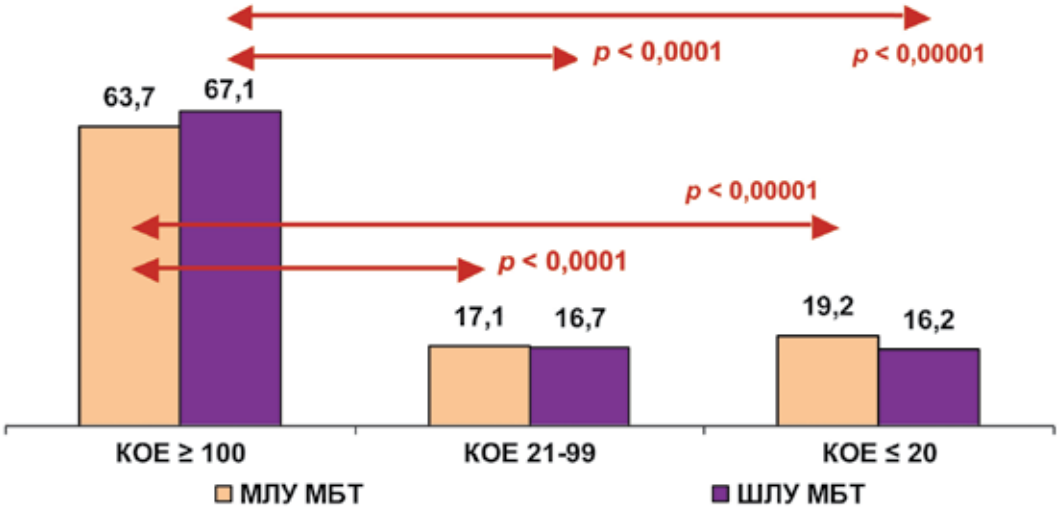


Рис. 5. Массивность бактериовыделения из респираторного материала оперированных больных при МЛУ и ШЛУ МБТ (%)

Высокая бактериальная нагрузка респираторного материала в контрольной группе отмечена вдвое реже, чем при МЛУ и ШЛУ: соответственно, 20,3% против 41,9% ($p = 0,003$) и против 46,3% ($p = 0,001$). При низкой бактериальной нагрузке наблюдается обратная зависимость.

Выявлено, что при МЛУ частота выделения МБТ с КОЕ ≥ 100 из респираторного материала больных II группы была статистически достоверно более высокой в сравнении с I группой: 63,7% против 41,9% ($p = 0,001$) (рис. 3). Сходная картина наблюдалась и в случае ШЛУ МБТ.

Однако, как показано на рисунке 4, при посеве операционного материала пациентов II группы высокая и умеренная бактериальная нагрузка имели место чаще в случае ШЛУ, чем при МЛУ (суммарно 71,1% и 53,7%, $p = 0,026$).

В респираторном материале оперированных больных превалировали изоляты МБТ с КОЕ ≥ 100 (63,7% – МЛУ, 67,1% – ШЛУ), и здесь различия между множественной и широкой лекарственной устойчивостью не было (рис. 5).

Таким образом, подтвержден известный в клинической фтизиобактериологии феномен, что бактериальная нагрузка в респираторном материале выше, чем в операционном. Как видно из приведенных данных, в операционном материале штаммы с высокими ростовыми свойствами встречались достоверно реже (34,3% – МЛУ, $p = 0,00006$; 47,0% – ШЛУ, $p = 0,0004$), и это распределение не зависело от типа лекарственной устойчивости.

Теоретически можно предположить, что адаптивные способности возбудителя туберкулеза в респираторном материале более высокие, поскольку микобактерии уже попали во внешнюю среду и при посеве на питательную среду имеют преимущество перед находящимися внутри макроорганизма-хозяина. Известно, что МБТ избегают ответной реакции макроорганизма, выживая в инфекционных гранулемах, локализованных в организме. Естественная эконишa клетки хозяина для МБТ – фагоциты [1].

Заключение

Проведенные исследования показали, что при МЛУ и ШЛУ ростовые свойства как показатель жизнеспособности МБТ не снижаются по сравнению с таковыми при сохранении ЛЧ. Более того, высокая степень массивности бактериовыделения в респираторном материале при МЛУ и ШЛУ наблюдается в два раза чаще, чем при сохранении ЛЧ, что говорит о высокой эпидемиологической опасности мультирезистентных штаммов МБТ. Подтверждена известная в клинической фтизиобактериологии закономерность, что при МЛУ массивность бактериовыделения из респираторного материала значимо выше, чем бактериальная нагрузка операционного – его высокая степень отмечена в 63,7% и 41,9%, соответственно. Однако в операционном материале высокая и средняя степень бактериальной нагрузки при ШЛУ МБТ выявляли достоверно чаще, чем при МЛУ – суммарно 71,7% против 53,7%, что также подчеркивает эпидемиологическую опасность этих штаммов МБТ, вызывающих наибольшие трудности в лечении туберкулеза.

Литература

1. *Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий / под ред. О.В. Бухарина // М.: Медицина. – 2005. – 364 с.*
2. *Вишневский Б.И., Маничева О.А, Вишневская Е.Б., Мельникова Н.Н., Оттен Т.Ф. Особенности бактериовыделения и лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза при внелегочном туберкулезе. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2006. – № 11. – С. 18-21.*
3. *Прозоров А.А., Даниленко В.Н. Микобактерии туберкулезного комплекса: геномика, молекулярная эпидемиология, пути эволюции. // Успехи современной биологии. – 2011. – № 3. – С. 227-243.*
4. *Тестов В.В., Стерликов С.А., Васильева И.А. и др. Результаты химиотерапии у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в регионах Российской Федерации. // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 4. – С. 9-14.*
5. *Casali N., Nikolaevsky V., Balabanova Y. et.al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. // Nat. Genet. – 2014. – Vol. 46 – N. 3. – P. 279-286.*
6. *Cohen T., Becerra M., Murray M. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. // Microb. Drug. Resist. – 2004. – Vol. 10. – N. 4. – P. 280-285.*
7. *Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs. // Ann. Pharmacother. – 2006. – Vol. 40. – N. 5. – P. 1007-1008.*
8. *Yablonskii P., Vizel A., Galkin V., Shulgina M. Tuberculosis in Russia. Its history and its status today // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2015. – Vol. 191. – N. 4. – P. 372-376.*

Сведения об авторах

Вишневский Борис Израилевич *– главный научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России», доктор медицинских наук, профессор*

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 32
Тел. + 7 (812) 297-86-31, факс + 7 (812) 237 16 26
e-mail: bivish@rambler.ru

Маничева Ольга Алексеевна *– ведущий научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России», доктор биологических наук*

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 32
Тел. + 7 (812) 297-86-31, факс + 7 (812) 237 16 26
e-mail: olgamanicheva@rambler.ru

Мельникова Наталья Николаевна *– старший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России», кандидат медицинских наук*

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 32
Тел. + 7 (812) 297-86-31, факс + 7 (812) 237 16 26
e-mail: melnikovanatalii@mail.ru

Догонадзе Марине Зауриевна *– старший научный сотрудник ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России», кандидат биологических наук*

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 32
Тел. + 7 (812) 297-86-31, факс + 7 (812) 237 16 26
e-mail: marine-md@mail.ru

Стеклова Лидия Николаевна *– врач-бактериолог ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России»*

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 32
Тел. + 7 (812) 297-86-31, факс + 7 (812) 237 16 26

Иноземцева Александра Игоревна *– врач-бактериолог ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России»*

Адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 32
Тел. + 7 (812) 297-86-31, факс + 7 (812) 237-16-26

УДК 616.24-002.5:615.035:579.61

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ: АЛГОРИТМ ИССЛЕДОВАНИЙ И КРИТЕРИИ ИНТЕРПРЕТАЦИИ ПОЛУЧАЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

А.Б. Кулько

ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

LABORATORY DIAGNOSIS OF PULMONARY ASPERGILLOSIS IN TUBERCULOSIS PATIENTS: ALGORITHM AND CRITERIA OF LABORATORY STUDY RESULTS

A.B. Kulko

Описан алгоритм лабораторной диагностики аспергиллеза легких у больных туберкулезом органов дыхания. Изложены и обоснованы критерии интерпретации результатов микологических (культуральное исследование, микроскопия) и иммунологических исследований.

***Ключевые слова**: лабораторная диагностика аспергиллеза легких, туберкулез легких*

The algorithm of laboratory diagnosis of pulmonary aspergillosis in patients with various forms of pulmonary tuberculosis is described. The diagnostic criteria of results of mycological (microscopy and cultural studies) and immunological laboratory investigations are represented.

***Keywords**: laboratory diagnosis of pulmonary aspergillosis, pulmonary tuberculosis*

Введение

Диагностика вторичного аспергиллеза у больных туберкулезом легких остается одной из актуальных проблем во фтизиатрической клинике. Поражения бронхолегочной системы грибами *Aspergillus spp.* отличаются значительным клинико-морфологическим разнообразием (аспергиллема легких, аллергический бронхолегочный аспергиллез – АБЛА, аспергиллезный трахеобронхит, аспергиллез плевры, инвазивный аспергиллез легких, другие клинические формы аспергиллеза), зачастую протекая под маской туберкулеза и других заболеваний легких [1-3, 8]. Вызывать инфекции бронхов и легких, в том числе у пациентов с различными формами туберкулеза, способны не только четыре основных возбудителя аспергиллеза – *Aspergillus fumigatus* (главный возбудитель всех форм заболевания), *A. flavus, A. niger* и *A. terreus*, но и некоторые редко встречающиеся возбудители, проводить идентификацию которых в практике микробиологических лабораторий значительно сложнее [4, 6, 14]. Колонизация дыхательных путей грибами *Aspergillus spp.* и тем более развитие аспергиллеза может сопровождаться токсическим (*A. flavus, A. fumigatus, A. niger, A. ochraceus, A. terreus, A. versicolor* и другие *Aspergillus spp.*) и аллергенным действием (*A. flavus, A. fumigatus, A. niger, A. oryzae, A. versicolor*) гриба на пациента. Следует учитывать, что основной возбудитель аспергиллеза гриб *A. fumigatus* обладает выраженными аллергенными свойствами (способен вызывать аллергические реакции, включая развитие бронхиальной астмы, АБЛА, аллергических риносинусита и альвеолита), а гриб *A. Flavus* (второй по частоте выявления) – вид с сильными токсическими свойствами (образует высокотоксичные метаболиты афлатоксины и ряд других микотоксинов) [4, 9, 10, 16].

Сходство клинической симптоматики и рентгенологических характеристик легочных форм туберкулеза и аспергиллеза существенно затрудняет диагностику вторичного аспергиллеза во фтизиатрической клинике [5, 7]. Решающее значение в диагностике и дифференциальной диагностике легочного аспергиллеза имеют данные лабораторных методов исследования, позволяющие обнаруживать возбудитель непосредственно в диагностическом материале (микологические и иммунологические исследования).

Вместе с тем диагностическая ценность положительных результатов лабораторных исследований различна, часто

вариабельна и определяется рядом показателей: методом исследования [выявление культур грибов рода *Aspergillus* при посеве, обнаружение клеток и клеточных структур гриба при первичной (прямой) микроскопии образцов исследуемого материала, выявление антигенов грибов *Aspergillus* и антител к ним в сыворотке крови при серологических исследованиях]; характером материала (респираторные биосубстраты, образцы легочной ткани, материалы из полостных образований легких и плевральных полостей, кровь); повторностью обнаружения возбудителя аспергиллеза при культуральных и серологических исследованиях.

Цель исследования

Обоснование критериев интерпретации результатов микологических и серологических исследований, получаемых при обследовании больных туберкулезом с подозрением на вторичный аспергиллез.

Материалы и методы исследования

Предлагаемый алгоритм лабораторной диагностики аспергиллеза и изложенные критерии оценки клинической значимости полученных результатов основываются на собственных многолетних исследованиях, проводимых с 2000 г. в микробиологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», и подходах, описанных в ряде отечественных и зарубежных руководств по диагностике микозов [1–3, 6, 8, 11, 14].

Алгоритм лабораторной диагностики аспергиллеза легких в клинике туберкулеза

Рекомендуемая для использования во фтизиатрических клиниках схема лабораторной диагностики бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом включает микологические исследования (микроскопия, культуральное исследование с количественной оценкой) двух и более проб мокроты в динамике и пробы материала, полученного при фибробронхоскопии (ФБС) (жидкость бронхоальвеолярного лаважа – БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв).

У пациентов с полостными образованиями в легких, входящих в группу высокого риска развития вторичного аспергиллеза, при подозрении на микоз исследуют (микроскопия, культуральное исследование) высокоспецифичные материалы из легочных полостей (резекционный материал, пункционный биоптат, аспираты, смывы). На микологическое исследование поступает также диагностический материал из плевральных полостей неясной этиологии (аспираты, экссудаты, мазки). При обнаружении роста гриба *Aspergillus spp.* в легочной или плевральной полости следует провести у пациента дополнительное микологическое исследование мокроты и, если возможно, иммунологическую диагностику аспергиллеза.

Все выделенные при культуральном исследовании на пневмомикоз штаммы грибов рода *Aspergillus* необходимо идентифицировать до вида с использованием общепринятых в медицинской микологии методов [4, 6, 14]. Подробные описания 14 видов клинически значимых грибов рода *Aspergillus*, способных вызывать поражения бронхов и легких, и методика их видовой идентификации были изложены нами в иллюстрированном атласе [4]. Видовая идентификация выделенных штаммов *Aspergillus spp.* важна как для окончательной интерпретации результатов диагностики, так и для выбора противогрибкового препарата для лекарственной терапии аспергиллеза. Так, необходимо учитывать, что один из основных возбудителей аспергиллеза – вид *A. terreus* обладает природной устойчивостью к амфотерицину В [1–3, 8, 12]. В ряде случаев (при выделении вида возбудителя аспергиллеза с вариативной или сниженной чувствительностью к одному или нескольким широко распространенным системным антимикотикам и в случае клинической неэффективности терапии) целесообразно исследовать культуру возбудителя на чувствительность к противогрибковым препаратам, используя стандартизованную методику. Следует отметить установленную нами более низкую по сравнению с иными видами активность итраконазола (МПК от 0,12 до 16 мкг/мл), вориконазола (МПК от 0,25 до 8 мкг/мл) и позаконазола (МПК от 0,12 до 8 мкг/мл) в отношении клинических штаммов *A. ustus*, причем у некоторых штаммов *A. ustus* была выявлена низкая чувствительность одновременно к нескольким препаратам группы азолов; установлена сниженная активность амфотерицина В против *A. flavus* (МПК 2–8 мкг/мл) и *A. ochraceus* (МПК 2–8 мкг/мл). Полученные нами данные, характеризующие уровни чувствительности *A. flavus* к амфотерицину В и *A. ustus* к азоловым препаратам, в целом согласуются со сведениями, имеющимися в специальной микологической литературе [14], а для редкого возбудителя *A. ochraceus* подобные сведения практически отсутствуют. Тестирование чувствительности клинических штаммов грибов *Aspergillus spp.* к противогрибковым препаратам мы рекомендуем проводить методом микроразведений в бульоне со средой RPMI 1640 с определением минимальных подавляющих концентраций (МПК) в мкг/мл, используя систему Sensititre (колориметрический тест YeastOne), TREK Diagnostics Systems. Система Sensititre соответствует международным стандартам тестирования чувствительности плесневых грибов [12, 13] и включает все распространенные противогрибковые препараты, активные *in vitro* в отношении грибов рода *Aspergillus*: амфотерицин В и препараты группы азолов (вориконазол, итраконазол, позаконазол, кетоконазол). В систему Sensititre включены также препараты группы эхинокандинов (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин), которые, не обладая фунгицидной активностью, способны проявлять фунгистатическое действие на рост мицелия грибов рода *Aspergillus*.

Активность эхинокандинов *in vitro* оценивают не по значениям МПК препаратов, а по показателям минимальной эффективной концентрации (МЭК) [12].

При дифференциальной диагностике инвазивного аспергиллеза легких и аспергиллемы (положительные культуральные и/или клинические и рентгенологические данные) в алгоритм лабораторных исследований целесообразно включать диагностические некультуральные тесты на определение в сыворотке крови антигенов *Aspergillus* и антител к ним.

Интерпретация результатов микологических исследований

Основным клинически значимым (классическим) методом лабораторной диагностики бронхолегочного аспергиллеза остается культуральное исследование необходимого диагностического материала (мокрота, различные материалы, полученные при ФБС, биоптаты легочной ткани из очагов поражения, а также материалы из полостных образований легких и плевральных полостей) с предварительным проведением первичной микроскопии [1–3, 8, 11]. Специальное микологическое исследование, включающее микроскопию и посев, позволяет не только обнаружить возбудитель аспергиллеза в диагностическом материале, но и выделить его в чистой культуре с последующим проведением видовой идентификации и тестирования чувствительности *in vitro* к противогрибковым препаратам. Однако следует учитывать, что чувствительность микологического исследования мокроты и любых диагностических материалов, полученных инвазивными методами, ограничена, что может приводить к ложноотрицательным результатам, в частности, в случаях несвоевременной доставки материала в лабораторию или взятия пробы после начала лечения противогрибковыми препаратами. Таким образом, не следует исключать развитие бронхолегочного аспергиллеза при отсутствии роста грибов рода *Aspergillus* в диагностическом материале, особенно при однократном исследовании.

Рассмотрим подробнее диагностические характеристики различного материала, поступающего в лабораторию на микологическое исследование от больных туберкулезом органов дыхания с подозрением на бронхолегочный аспергиллез (мокрота, полученный при ФБС материал, содержимое полостных образований легких, содержимое плевральных полостей, образцы легочной ткани).

Мокрота – основной и наиболее доступный для исследования диагностический материал при подозрении на пневмомикоз, в том числе и аспергиллезной этиологии. Исследования мокроты менее специфичны и информативны в сравнении с БАЛ, так как мокрота в значительно большей степени подвержена контаминации микробиотой (микобиотой) верхних дыхательных путей. Однако доступность материала позволяет проводить повторные культуральные исследования для диагностики и контроля лечения аспергиллеза. Выделение гриба рода *Aspergillus* из мокроты – критерий колонизации нижних дыхательных путей данным видом и признак «вероятного» легочного аспергиллеза. Для более достоверного подтверждения колонизации и исключения контаминации образца целесообразно повторное выделение возбудителя аспергиллеза данного вида из образца мокроты. Важно учитывать, что обнаружение в посеве мокроты болезнетворных грибов рода *Aspergillus* может свидетельствовать не только о колонизации слизистых оболочек дыхательных путей (что также является значимым результатом лабораторного исследования), но и о вероятном развитии у больного туберкулезом вторичной аспергиллезной инфекции [3, 5, 8].

Образцы БАЛ и бронхиального секрета, полученные при ФБС – основной диагностический материал, высокоспецифичный при диагностике различных клинических форм бронхолегочного аспергиллеза [1–3, 8]. Выделение гриба рода *Aspergillus* при посеве данного материала расценивается как признак «вероятного» легочного микоза, но не является диагностическим критерием развития инвазивной инфекции [8, 11]. Таким образом, выделение *Aspergillus spp.* из материала, полученного при ФБС – важный признак «вероятного» легочного микоза и наиболее значимый критерий колонизации грибом нижних дыхательных путей.

Обнаружение клеток и клеточных структур плесневых грибов в образцах мокроты и БАЛ методом прямой микроскопии не имеет решающего диагностического значения при верификации аспергиллеза бронхов и легких. Кроме того, результаты микроскопии в большинстве случаев не позволяют дифференцировать грибы *Aspergillus spp.* от плесневых грибов *Acremonium, Fusarium, Paecilomyces, Penicillium* и многих других родов. Однако результаты микроскопического исследования материала важны для подтверждения и окончательной интерпретации результатов посева. Для грибов рода *Aspergillus* характерны следующие элементы, обнаруживаемые при проведении прямой микроскопии образцов мокроты, БАЛ и других материалов: септированные гифы мицелия, конидии и конидиальные головки (структуры бесполого спороношения *Aspergillus spp.*).

При диагностике и лечении больных с деструктивными полостными образованиями в легких (каверны, туберкулемы, кисты, аспергиллемы) на микологическое исследование поступают высокоспецифичные ***материалы из легочных полостей*** (резекционный материал, пункционный биоптат, аспираты, смывы). Выделение гриба рода *Aspergillus* из содержимого полостного образования легких имеет диагностическое значение при верификации аспергиллеза, локализованного в легочной полости (аспергиллема) [15] и сочетанных инфекций данной локализации, а также может свидетельствовать о развитии инвазивного аспергиллеза [8]. В случае обнаружения возбудителя аспергиллеза в легочной полости целесообразно

исследовать у пациента пробы мокроты и иной доступный диагностический материал для дифференциальной диагностики вероятного инвазивного аспергиллеза легких.

От больных туберкулезом с заболеваниями плевры на микологическое исследование поступает высокоспецифичный материал (аспираты, экссудаты, мазки) из патологических плевральных полостей неясной этиологии. Выделение возбудителя аспергиллеза из данного материала имеет диагностическое значение при выявлении аспергиллезной или смешанной этиологии хронических заболеваний плевры у больных туберкулезом.

Обнаружение при прямой микроскопии материала из полостных образований легких и плевры элементов грибов, характерных для *Aspergillus spp.*, не только подтверждает результат культурального исследования, но и является одним из показателей активности гриба в деструктивной полости.

При диагностике инвазивного аспергиллеза легких наиболее ценным диагностическим материалом являются ***образцы легочной ткани***, в норме стерильной. Обнаружение гриба рода *Aspergillus* в биоптате легочной ткани имеет диагностическое значение при верификации инвазивных форм аспергиллеза легких. Диагностическое значение (инвазивный микоз легких) имеют также и положительные результаты прямой микроскопии легочной ткани [2, 8, 11].

Интерпретация результатов иммунологических исследований

Серологические методы исследования позволяют проводить экспресс-диагностику аспергиллеза легких, быстрое развитие инвазивных форм которого сопряжено с риском осложнений, опасных для жизни пациента. Общепринятый эффективный метод ранней диагностики инвазивного аспергиллеза – обнаружение в сыворотке крови циркулирующих галактоманнановых антигенов грибов *Aspergillus* (иммуноферментный анализ, латекс-агглютинация). Вместе с тем выявление *Aspergillus* антигенемии относят к признакам «вероятного» инвазивного аспергиллеза, а при интерпретации результатов следует учитывать вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. [2, 11]. С учетом этого положения диагностическая значимость выявления антигена *Aspergillus spp.* возрастает при повторном обнаружении галактоманнана и подтверждении положительного результата иммунологического исследования методом посева. При дифференциальной диагностике аспергиллемы и аллергических форм заболевания (АБЛА и др.) целесообразно определять в сыворотке крови и наличие специфических антител к грибам *Aspergillus spp.*; данное исследование обычно не рекомендуют проводить при диагностике инвазивных форм аспергиллеза, предполагая, что иммунный ответ у пациентов может быть недостаточно выражен [2, 8]. Выявление в сыворотке крови антител к грибам рода *Aspergillus* также относят к признакам «вероятного» аспергиллеза.

Заключение

Все существующие прямые и непрямые лабораторные методы диагностики аспергиллеза легких имеют ограничения по чувствительности и специфичности и могут приводить как к ложноотрицательным, так и ложноположительным результатам. Культуральное исследование остается основным клинически значимым и наиболее распространенным методом лабораторной диагностики пневмомикозов, однако его чувствительность также ограничена. Не следует исключать развитие у пациента легочного аспергиллеза при отсутствии роста болезнетворного гриба, особенно при однократном исследовании материала. При интерпретации результатов микологического исследования важно учитывать характер материала, из которого были выделены грибы рода *Aspergillus* и данные, полученные методом прямой микроскопии. К результатам, имеющим диагностическое значение, относят выделение гриба рода *Aspergillus* из легочной ткани (инвазивный аспергиллез) и из содержимого легочной или плевральной полости (аспергиллез, локализованный в полости). В сравнении с мокротой культуральные исследования материалов, полученных при ФБС (БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв) значительно более специфичны. Информативность микологического исследования мокроты при диагностике пневмомикоза возрастает при двух- и трехкратном заборе материала.

Выявление антигенов грибов *Aspergillus* и антител к ним в сыворотке крови следует интерпретировать как признак «вероятного» аспергиллеза; диагностическая значимость положительного результата серологического исследования существенно возрастает при выделении гриба рода *Aspergillus* из посева. Серологические тесты на выявление антигенов *Aspergillus spp.* в сыворотке крови – достаточно высокочувствительные и специфичные некультуральные методы ранней диагностики системного аспергиллеза.

Окончательную интерпретацию результатов лабораторной диагностики вторичного бронхолегочного аспергиллеза у пациентов фтизиатрического профиля следует проводить по совокупности всех полученных микологических и серологических данных. В целом наиболее информативны повторные микологические исследования различных диагностических материалов, полученных от больного, причем в алгоритм культурального исследования целесообразно включать видовую идентификацию всех выделенных штаммов *Aspergillus spp.*, а в ряде случаев и определение их чувствительности к противогрибковым препаратам.

Литература

1. *Гролл А.Х., Уолш Т.Д. Аспергиллез : атлас грибковых заболеваний / под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – С. 133-159.*
2. *Диагностика и лечение микозов / под ред. Д. Р. Хоспентала, М. Дж. Ринальди. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 448 с.*
3. *Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение: руководство для врачей. – 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Ви Джи Групп, 2008. – 336 с.*
4. *Кулько А. Б. Атлас условно-патогенных грибов рода Aspergillus – возбудителей бронхолегочных инфекций. – М.: МНПЦБТ, 2012. – 160 с.*
5. *Кулько А.Б., Древаль П.А., Воробьев А.А., Трусов В.Н. Лабораторная диагностика бронхолегочного аспергиллеза у больных туберкулезом с полостными образованиями в легких. // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10. – № 4. – С. 25-28.*
6. *Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.) Определитель патогенных и условно патогенных грибов / пер. с англ. – М.: Изд-во Мир. – 2001. – 468 с.*
7. *Свирщевская Е.В., Митрофанов В.С., Шендерова Р.И., Чужова Н.М. Иммунитет при туберкулезе и аспергиллезе (обзор). // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 3-13.*
8. *Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции: руководство для врачей. – М.: Изд-во Бином, 2008. – 480 с.*
9. *ALLERGEN NOMENCLATURE IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. [Электронный ресурс] URL: // http://www.allergen.org/index.php. (Дата обращения 25.04.2016).*
10. *Alonso V., Aminahuel C., Díaz Vergara L. et al. Ecophysiology of environmental Aspergillus fumigatus and comparison with clinical strains on gliotoxin production and elastase activity // Lett Appl Microbiol. – 2016. – Vol. 62. – N. 2. – P. 160-168.*
11. *Ascioglu S., Rex J.H., de Pauw B. et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus // Clin. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 34. – P. 7-14.*
12. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. – 2nd ed. – SLCI document M38-A2. CLSI: Wayne, PA, 2008. – 40 p. [Электронный ресурс] URL: http://shop.clsi.org/microbiology-documents/M38.html. (Дата обращения 25.04.2016).*
13. *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): EUCAST Definitive Document E.DEF 9.1. – 2008. – 13 p. [Электронный ресурс] URL: http://www.indabook.org/preview/9iBO7-QTGRpRgsj0SNwnWIjFD2efZmtu0u53KnLIGA4,/EUCAST-DEFINITIVE-DOCUMENT-E-DEF-9-1-Method-for.html?query=EUCAST-definitions. (Дата обращения 25.04.2016).*
14. *Hoog de G., Guarro J., Gene J., Figueras M. Atlas of clinical fungi: electronic version 3.1. – 3th ed. – Netherlands: CBS-KNAW FUNGAL BIODIVERSITY CENTRE, 2011.*
15. *Kulko A. The fungi of the genus Aspergillus in lung cavities of tuberculosis patients: a species spectrum and susceptibility to antimycotics. / 6th Advances against aspergillosis conference: abstract book. – P. 87.*
16. *The Aspergillus Website. [Электронный ресурс] URL: http://www.aspergillus.org.uk/. (Дата обращения 25.04.2016)*

Сведения об авторе

Кулько Александр Борисович *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (499) 268-70-33

e-mail: kulko-fungi@yandex.ru

УДК 616-002.5

К МЕХАНИЗМАМ РЕГУЛЯЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛЕНИЯ

В.Я. Гергерт, В.В. Еремеев

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва

TO THE MECHAMISNS OF REGULATION OF TIBERCULOSIS INFLAMMATION

V. Ya. Herhert, V.V. Eremeev

В настоящем исследовании рассматривается влияние одного из механизмов регуляции туберкулезного воспаления, а именно сигнала, передаваемого через рецептор (IFNAR1) для интерферонов I типа на течение экспериментального туберкулеза у мышей. На основании изучения особенностей течения заболевания у мышей дикого типа линии 129S2 и Ifnar1-/- мышей на той же генетической основе показано, что сигнал, передаваемый через IFNAR1-рецептор, ухудшает течение экспериментального туберкулеза; не препятствует размножению микобактерий туберкулеза в легких; не оказывает существенного влияния на формирование иммунного ответа на вакцинацию BCG; усиливает приток нейтрофилов в легкие с перераспределением микобактерий в эти клеточные элементы; способствует ускоренному развитию патологии и гибели зараженных мышей.

***Ключевые слова**: интерферон I типа, экспериментальный туберкулез у мышей, хроническое воспаление*

The present study reviewed the role of one of the mechanisms of regulation of tuberculous inflammation, namely, a signal transmitted through the receptor (IFNAR1) for type I interferons in the course of experimental tuberculosis in mice. On the basis of studying of the characteristics of the course of TB in wild-type mice of 129S2 line and Ifnar1-/- mice on the same genetic basis we have shown that the signal transmitted through the IFNAR1-receptor worsens the course of experimental tuberculosis; It don't prevent the proliferation of Mycobacterium tuberculosis in the lungs; It has no impact on the formation of an immune response to the BCG vaccine; It enhances the influx of neutrophils into the lungs with the redistribution of mycobacteria in these cellular elements; It serves to the accelerated development of the pathology and death of infected mice.

***Keywords**: type 1 interferon, experimental tuberculosis in mice, chronic inflammation*

Введение

Известно, что проникновение микобактерий туберкулеза в организм человека вызывает широкий спектр клинических проявлений: от бурно прогрессирующих форм до вяло текущих и ограниченных поражений. Однако в ряде случаев клинические проявления отсутствуют вовсе, и нередко подобные индивидуумы на всю жизнь остаются инфицированными. Необходимо отметить, что последних большинство, и, следовательно, организм человека имеет достаточное количество средств для противостояния репликации микобактерий и развитию заболевания.

Взаимоотношения микро- и макроорганизма при инфицировании микобактериями туберкулеза многогранны и зависят, с одной стороны, от микобактерий, которые имеют множество генов, контролирующих, в частности, факторы вирулентности, биосинтез клеточной стенки и липидный метаболизм, что обеспечивает их выживание в макрофагах хозяина [2]. С другой стороны, генетический контроль чувствительности и резистентности к микобактериальным инфекциям у человека и животных также носит полигенный характер [4, 9] и затрагивает различные механизмы естественной резистентности и адаптивного иммунного ответа.

Находясь под прессом механизмов врожденного (естественного) иммунитета, а если их оказывается недостаточно, то и развивающегося адаптивного, микобактерии в организме хозяина отчасти погибают, замедляют свой рост, но, по-

видимому, не элиминируются совсем, а переходят в то самое состояние «дормантности», когда они становятся мало восприимчивыми к внешним угнетающим факторам. Механизмы этого перехода до конца неясны, но известно, что в данном процессе участвует множество генов микобактерий: регулона *dosR, hspX, relA*, ответственные за синтез Rpf-белков и др.

В свою очередь, несмотря на то что механизмы иммунного ответа изучены довольно подробно, хотя, видимо, и не в полной мере, остается все же неизвестным, какое именно сочетание их позволяет сдерживать рост микобактерий в организме и как долго они способны обеспечивать высокий уровень защиты от развития патологических поражений.

Апоптоз зараженных *M. tuberculosis* макрофагов влияет на жизнеспособность микобактерий. Так, индуцированный Fas-лигандом (Fas-L) апоптоз резко уменьшает жизнеспособность вирулентных *M. tuberculosis* $H_{37}Rv$ [1, 3]. В то же время гибель зараженных макрофагов в результате некроза не оказывает существенного влияния на жизнеспособность микобактерий. Более того, у зараженных макрофагов усиливается устойчивость к Fas-L-индуцированному апоптозу и уменьшается экспрессия самого Fas-лиганда. В таких случаях вирулентные микобактерии уходят от этого вида защиты, индуцируя некроз, приводящий к их неконтролируемому размножению в некротизированной ткани.

Следовательно, взаимодействие макрофагов и микобактерий на этом этапе может быть различным. Это было показано в ряде работ: у зараженных макрофагов целостность митохондриальной мембраны, низкая активность каспаз и пониженный выброс митохондриального цитохрома С сопряжены с апоптозом и эффективной антимикобактериальной защитой. Напротив, повреждение митохондриальной мембраны и активация каспаз происходят при некрозе и способствуют размножению микобактерий [8]. Нейтрофилы также способны к апоптозу. Заражение нейтрофилов микобактериями туберкулеза $H_{37}Rv$ и $H_{37}Ra$ вызывает их быструю гибель через апоптоз [5]. Тем не менее нейтрофилы, вошедшие в апоптоз, могут фагоцитироваться макрофагами, что приводит в свою очередь к повышению продукции, например, фактора некроза опухоли – α.

Вместе с тем отмечается существенная роль нейтрофилов во врожденной резистентности к туберкулезной инфекции, и она связана с их способностью продуцировать антимикробные пептиды [7]. Однако было показано также [5], что нейтрофилы сверхчувствительных к туберкулезу мышей линии I/St после заражения микобактериями живут дольше и гораздо менее подвержены Fas-опосредованному апоптозу, чем нейтрофилы резистентных мышей линии A/Sn или C57BL/6. Принимая во внимание слабую способность нейтрофилов подавлять рост микобактерий, оказалось, что в этом случае накопление нейтрофилов в очаге туберкулезного воспаления приводит к развитию прогрессирующей патологии. Именно у генетически сверхчувствительных к туберкулезу мышей линии I/St после заражения микобактериями происходит повышенное накопление нейтрофилов в легочной ткани, в отличие от резистентных линий, у которых приток клеток в зону поражения более сбалансирован за счет значительного присутствия макрофагов.

Следовательно, у генетически сверхчувствительных к туберкулезу мышей происходит преимущественное накопление полиморфонуклеаров в легочной ткани с утраченной способностью к апоптозу, что приводит к неконтролируемой репликации микобактерий, некрозу, усилению реакций воспаления и распространению патологических поражений с ускоренной гибелью животных.

В настоящем исследовании рассматривается еще один из механизмов, способствующих подобным изменениям, а именно сигнал, передаваемый через рецептор (IFNAR1) для интерферонов I типа. Этот рецептор присутствует на ряде гемопоэтических и резидентных тканевых клеток и запускает каскад процессов с продукцией провоспалительных цитокинов и хемокинов и привлечением клеток в зону воспаления.

Цель исследования

Оценить влияние интерферонов I типа на структуру и интенсивность воспаления при экспериментальном туберкулезе.

Материал и методы

Исследование проводили на мышах линии 129S2 (129S2 WT), высокочувствительной к туберкулезной инфекции, и мышах той же линии, но с нокаутированным геном продукции IFNAR1 – рецептора, воспринимающего сигнал интерферонов I типа (мыши Ifnar1-/-). В части экспериментов использовали мышей устойчивой линии – C57BL/6. Животных аэрогенно заражали низкой дозой (200 CFU) микобактерий туберкулеза $H_{37}Rv$.

Мышей вакцинировали подкожно 106 КОЕ БЦЖ. Заражение производили через 5 недель после вакцинации.

Через четыре недели после заражения у 5 мышей из группы после умерщвления цервикальной дислокацией забирали легкие. Полученные органы тщательно растирали в стеклянных гомогенизаторах и серийные разведения в стерильном PBS высеивали на агар Дюбо. Растущие колонии подсчитывали визуально под бинокулярной лупой через 3 недели после высева на твердый агар.

Для гистологического исследования использовали легкие мышей через 4 недели после заражения. Левую часть легкого фиксировали в 4% параформальдегиде и заключали в парафин. Срезы толщиной 2–3 микрона окрашивали гематоксилин-эозином или по Цилю-Нельсену, как это описано ранее [6]. Для иммуногистологического окрашивания фиксированные и регидратированные срезы обрабатывали раствором для экспозиции антигенов, блокировали белком и инкубировали с

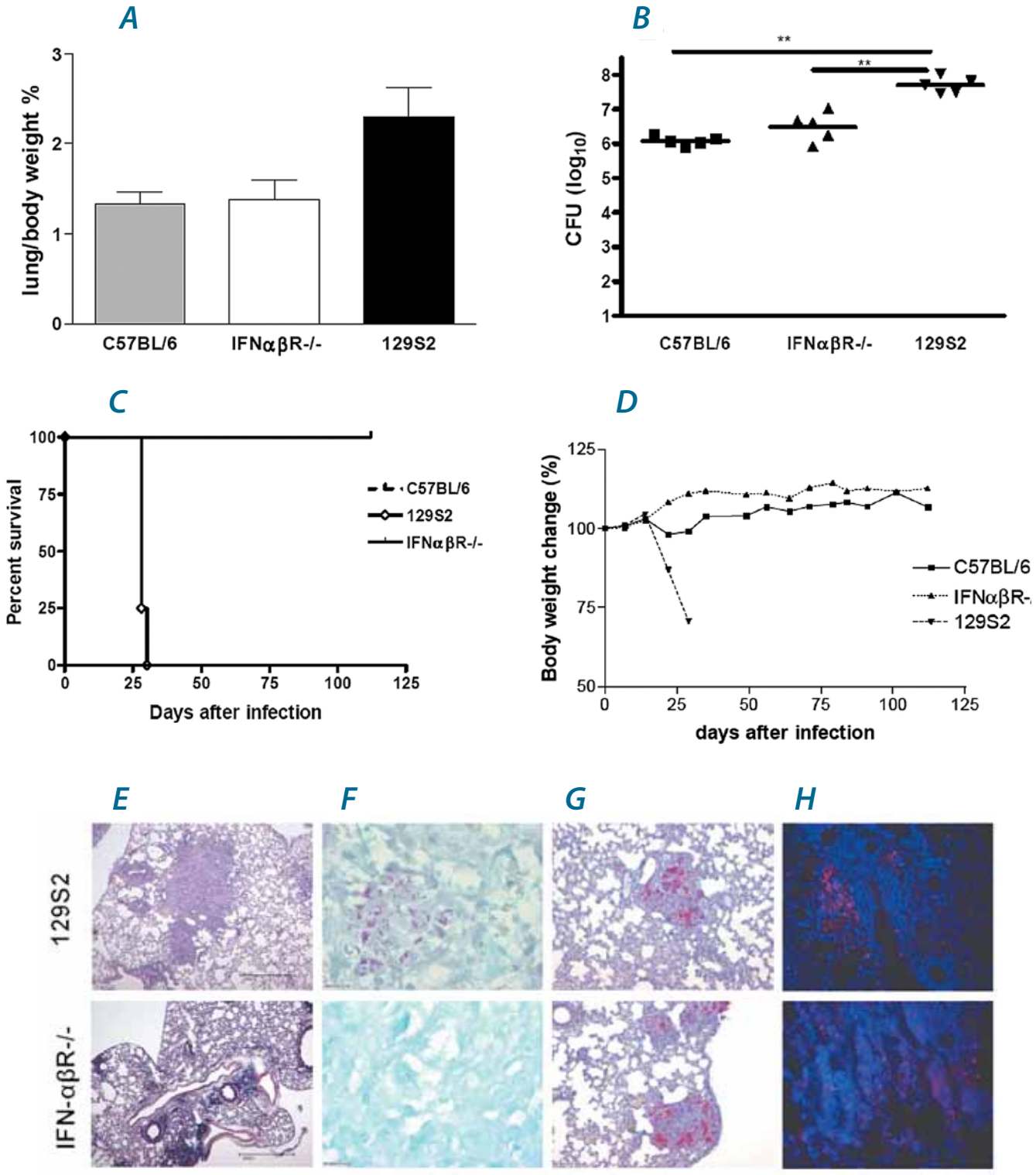


Рис. 1. Сигнал, передаваемый через IFNAR1, ухудшает течение экспериментального туберкулеза.
A – относительный вес легких через 3 недели после заражения.
B – высеваемость МБТ из легких мышей на 21-й день после заражения.
C – кривая выживаемости мышей после аэрозольного заражения вирулентным лабораторным штаммом МБТ $H_{37}Rv$ (200 КОЕ).
D – динамика относительного изменения веса зараженных мышей.
E – гистопатология легких – окрашивание по Гимзе на 21-й день после заражения.
F – окраска на кислотоустойчивые микобактерии в те же сроки.
G – окраска на iNOS – NO-синтетаза (оксиды азота) в те же сроки.
H – иммуноокрашивание на миелопероксидазу.
WT – дикий тип (линия129S2) и Ifnar (-/-) – мыши основой линии 129S2, но с отсутствием гена продукции IFNAR1

первичными антителами, а затем с меченными щелочной фосфатазой козьими антителами против кроличьего иммуноглобулина. Для визуализации щелочной фосфатазы использовали фусцин (DAKO).

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в подушечках лапок мышей определяли, как это описано ранее [6]. Для инъекции использовали 125 IU PPD (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark).

Результаты исследования и обсуждение

На рис. 1 представлены характеристики течения специфического воспалительного процесса в трех группах мышей после аэрогенного заражения низкими дозами микобактерий туберкулеза $H_{37}Rv$ (200 CFU): I группа – высокочувствительной линии 129S2 (WT – дикий тип), II – той же линии, но с нокаутированным геном продукции IFNAR1 (Ifnar1-/-) и III – относительно резистентной – C57BL/6. Анализ полученных данных показал, что мыши I группы высокочувствительной линии постепенно теряли вес (рис. 1D), и большинство из них погибли от инфекции в течение 30 дней (рис. 1C). Мыши II и III групп оставались живыми после 100 дней наблюдения (результаты подтверждены в трех независимых экспериментах).

Более высокая сопротивляемость к туберкулезу мышей, нокаутированных по гену продукции IFNAR1, подтверждается и результатами высеваемости МБТ из легких через три недели после заражения по показателям КОЕ на твердых питательных средах, а также гистологическими исследованиями (рис. 1B, E, F) (данные достоверны и подтверждены в пяти независимых экспериментах). У мышей Ifnar1-/- зарегистрирована меньшая выраженность воспалительных поражений в легочной ткани и на срезах легких (рис. 1A, E), а также при окраске на iNOS (NO-синтетаза) (рис. 1G). Последний факт в совокупности с представленными выше данными говорит в этом случае о роли других факторов контроля репликации микобактерий туберкулеза. Иммуногистохимическая окраска на миелопероксидазу (рис. 1H) демонстрирует существенную нейтрофильную инфильтрацию, сопровождающую воспалительный процесс в легочной ткани мышей чувствительной линии. У мышей, нокаутированных по гену продукции IFNAR1, нейтрофильная инфильтрация в легких выражена в существенно меньшей степени.

Следовательно, в условиях отсутствия сигнала через IFNAR1-рецептор Ifnar1-/- мыши приобретали большую степень устойчивости к туберкулезу.

На следующем этапе исследований изучали возможность защиты высокочувствительных к туберкулезу мышей с помощью вакцинации BCG и влияние на этот процесс сигнала через IFNAR1-рецептор (рис. 2).

Как видно на рисунке 2A, подкожное введение живой БЦЖ успешно индуцирует иммунный ответ у мышей дикого типа,

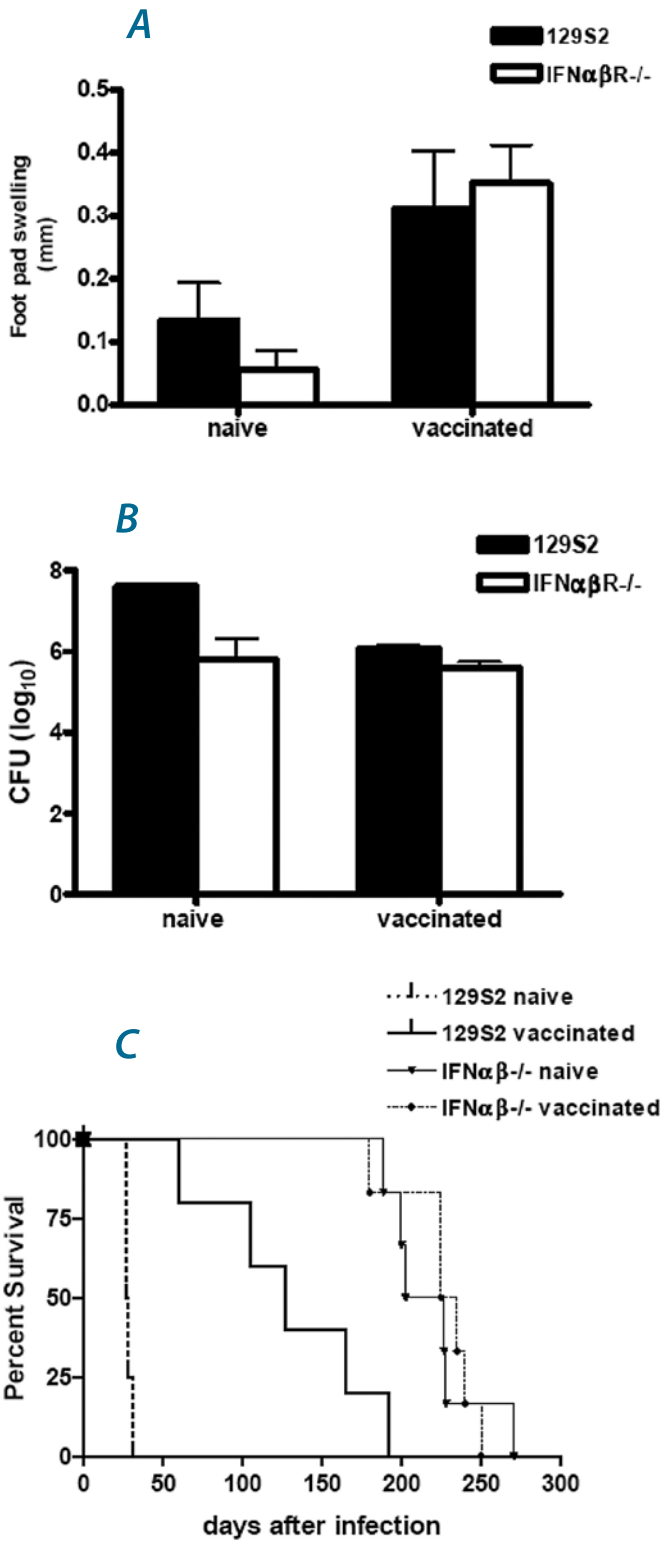


Рис. 2. Вакцинация BCG защищает от туберкулеза мышей чувствительной линии и не влияет на длительность жизни резистентных мышей.
A – реакция ГЗТ (набухание подушечки лапки) на альттуберкулин у вакцинированных и контрольных мышей.
B – высеваемость МБТ из легких мышей на 21-й день после заражения.
C – кривая выживаемости мышей после аэрозольного заражения вирулентным лабораторным штаммом МБТ $H_{37}Rv$ (200 КОЕ).

и отсутствие рецептора IFNAR1 не способно повлиять на этот процесс. В то же время, несмотря на то что вакцина БЦЖ существенно повышает устойчивость мышей 129S2 к туберкулезу (рис. 2B, C), выживаемость вакцинированных мышей дикого типа после заражения уступает таковой мышей, дефицитных по рецептору к интерферонам первого типа. Наряду с этим вакцинация резистентных Ifnar1-/- мышей не увеличивает их выживаемость после заражения (рис. 2C).

Таким образом, представленные результаты подчеркивают негативную роль неконтролируемого воспаления при туберкулезной инфекции.

Выводы

Сигнал, передаваемый через ***рецептор для интерферонов 1 типа***:

– ухудшает течение экспериментального туберкулеза;

– не препятствует размножению микобактерий туберкулеза в легких;

– не оказывает существенного влияния на формирование иммунного ответа на вакцинацию BCG;

– усиливает приток нейтрофилов в легкие с перераспределением микобактерий в эти клеточные элементы;

– способствует ускоренному развитию патологии и гибели зараженных мышей.

Литература

1. *Behar S., Martin C., Booty M. et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. // Mucosal. Immunol. – 2011. – Vol. 4. – P. 279-287.*
2. *Bellamy R., Hill A. Genetic susceptibility to mycobacteria and other infectious pathogens in humans. // Current Opinion in Immunology. – 1998. – Vol. 10. – P. 483-487.*
3. *Briken V., Miller J. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by Mycobacterium tuberculosis. // Future Microbiol. – 2008. – Vol. 3. – P. 415-422.*
4. *Comas I., Chakravartti J., Small P. et al. Human T-cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis are evolutionarily hyperconserved. // Nat. Genet. – 2010. – Vol. 42. – P. 498-503.*
5. *Eruslanov E., Lyadova I., Kondratieva T. et al. Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. – P. 1744-1753.*
6. *Fremond C., Yeremeev V., Nicolle D. et al. Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. // J. Clinical. Investigations. - 2004.*
7. *Fu L. The potential of human neutrophil peptides in tuberculosis therapy. // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2003. – Vol. 7. – P. 1027-1032.*
8. *Oberst A., Pop C., Tremblay A. et al. Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – P. 16632-16642.*
9. *Sanchez F., Radaeva T., Nikonenko B. et al. Multigenic control of disease severity after virulent Mycobacterium tuberculosis infection in mice. // Infect. Immun. – 2003. – Vol. 71. – P. 126-131.*

Сведения об авторах

Гергерт Владислав Яковлевич *– заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, доктор медицинских наук, профессор*

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-72

e-mail: hergertv@yandex.ru

Еремеев Владимир Витальевич *– заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, доктор медицинских наук*

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-90-72

УДК 615.281.9-015.8:616-002.5

ВОЗМОЖНОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МОНОЦИТАРНЫХ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК К РИФАМПИЦИНУ

М.В. Ерохина[1, 2], Л.Н. Лепеха[1], А.Э. Эргешов[1]

FORMATION OF RESISTANCE TO RIFAMPICIN IN MONOCYTE-MACROPHAGIC AND EPITHELIAL CELL LINES

M.V. Erokhina, L.N. Lepekha, A.E. Ergeshov

Установлена возможность формирования лекарственной устойчивости моноцитарно-макрофагальных и эпителиальных клеток к рифампицину. Устойчивость соматических клеток к этому препарату формируется в присутствии его субтоксичной концентрации: индекс цитотоксичности IC50 (выживаемость 50% клеток) в течение трех месяцев возрастает в 1,5–2,5 раза. Клетки, устойчивые к рифампицину, отличаются повышенной функциональной активностью одного из основных белков, обуславливающих развитие МЛУ соматических клеток – Pgp. В макрофагах с фенотипом лекарственной устойчивости к рифампицину фагоцитарная активность возрастает, по сравнению с исходными клетками: индекс фагоцитоза M.bovis-GFP увеличивается в 1,5 раза. Феномен устойчивости соматических клеток к рифампицину зависит от времени воздействия препарата и является обратимым.

***Ключевые слова**: устойчивость эпителиальных и моноцитарно-макрофагальных клеток, рифампицин, изониазид, белок Pgp*

Our data demonstrate that drug resistance to subtoxic concentrations of rifampicin can form in monocyte-macrophagic and epithelial cell lines. The index of cytotoxicity IC50 (50% cell survival) increased 1.5–2.5 times during the first 3 months of drug administration. Rifampicin resistant cells were characterized by high functional activity of Pgp, one of the major MDR proteins mediating resistance to multiple structurally diverse drugs. In drug resistant macrophages, phagocytic activity increased. Thus, the index of phagocytosis of M. bovis-GFP increased 1.5 times after 3 month of drug administration. The phenomenon of resistance of monocytic and epithelial cell lines to rifampicin depended on the time of exposure to the drug and was reversible.

***Keywords**: drug resistance of epithelial and monocytic cells, rifampicin, isoniazid, Pgp*

Введение

Известно, что активация и формирование механизмов лекарственной устойчивости могут происходить на двух уровнях организации живого: микроорганизма (возбудителя) и клеток макроорганизма [11]. Если условия и механизмы развития резистентности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам активно изучаются, то возможность активации механизмов лекарственной устойчивости соматических клеток к этим препаратам до сих пор остается неясной. Следует отметить, что лекарственная устойчивость (ЛУ) соматических клеток может развиваться при участии как специфических механизмов, так и общеуниверсальных, которые известны как механизмы «множественной лекарственной устойчивости» (МЛУ) [3]. Последние обеспечиваются работой специальных транспортных белков (МЛУ-белков), локализованных на плазматической мембране и снижающих внутриклеточное накопление препарата за счет его постоянного выведения во внеклеточную среду. Характерной особенностью таких белков является их широкая субстратная «всеядность»: функциональная активность одного такого белка обеспечивает ЛУ клеток к целому спектру лекарственных препаратов [4, 5].

[1] ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва.
[2] ФГБОУВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», г. Москва.

[3] Здесь речь идет об универсальных механизмах устойчивости клеток, во фтизиатрии термин МЛУ используют для характеристики штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к изониазиду и рифампицину (*прим. автора*).

Феномен МЛУ соматических клеток впервые был описан для опухолевых клеток, что привело к открытию целого ряда белков-транспортеров, ответственных за его формирование. Первым из них был открыт P-glycoprotein (Pgp) – наиболее универсальный из всех белков семейства МЛУ [10, 11]. Белок Pgp (170kDa) кодируется геном MDR1, в нормальных клетках и тканях он осуществляет транспорт ксенобиотиков, липидов, коротких пептидов и гормонов. Высокая экспрессия Pgp характерна для «барьерных клеток» – эпителия и эндотелия [8,9], умеренное присутствие Pgp наблюдается в макрофагах [12]. В этой связи особую актуальность приобретает исследование возможности формирования ЛУ в моноцитарно-макрофагальных и эпителиальных клетках к противотуберкулезным препаратам основного ряда, длительно применяемым при лечении туберкулеза.

Цель исследования

Изучить возможность формирования ЛУ в клетках разного происхождения к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда и участие в данном процессе белка Pgp.

В связи с этим поставлены следующие задачи: 1) определить возможность формирования ЛУ в клетках моноцитарного и эпителиального происхождения к основным противотуберкулезным препаратам – рифампицину и изониазиду; 2) получить устойчивые к противотуберкулезным препаратам клеточные линии; 3) определить функциональную активность белка Pgp в клетках с феноменом ЛУ; 4) определить фагоцитарную активность макрофагальных клеток с феноменом ЛУ.

Материал и методы исследования

Клеточные линии. Эксперименты проводили на клетках линии THP-1 (острая моноцитарная лейкемия человека, суспензионная культура) и линии SPEV (СПЭВ, эпителий эмбриона почки свиньи). Культивирование моноцитарных клеток осуществляли с использованием среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в атмосфере, обогащенной 5% углекислого газа. Для дифференцировки моноцитов в макрофаги *in vitro* использовали препарат форболового эфира (PMA) в концентрации 10^{-7} M (Sigma). Для культивирования линии SPEV использовали стандартную среду 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. При проведении экспериментов дополнительные антибиотики в среду культивирования не вводили. Миелолейкозная линия клеток человека K562 и ее производная сублиния K562-Is9 с трансфецированным геном MDR1 использовали для дополнительной оценки участия белка-транспортера Pgp в развитии устойчивости к рифампицину. Получение устойчивых к рифампицину сублиний происходило путем поэтапной селекции исходных клеток возрастающими дозами рифампицина в течение первых двух недель с последующим культивированием в присутствии субтоксичных концентраций препарата.

Лекарственные препараты. В качестве лекарственных препаратов были использованы рифампицин в виде чистой субстанции (Sigma), изониазид (10% раствор для инъекций, ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко).

МТТ-тест. Выживаемость клеток в среде с рифампицином определяли по стандартной методике МТТ-теста и подсчета жизнеспособных клеток, окрашенных 0,1% раствором трипанового синего, в камере Горяева. Данные оптической плотности среды для МТТ-теста получены на спектрофотометре «Униплан» (Россия) при длине волны 530 нм [7].

Оценка выброса родамина 123. Активность Pgp определяли по выбросу флуоресцентного красителя родамина 123 (Rh123, Sigma) по стандартной методике [13]. 100 мкл клеточной суспензии инкубировали в присутствии 5 мкг красителя в течение 15 мин при 37 °C. После отмывания красителя и регистрации флуоресценции суспензию разделяли на две пробирки, в одну из которых добавляли ингибитор Pgp верапамил (10 мкМ, 30–60 мин, Sigma). Измерение выброса родамина 123 проводили на проточном цитометре «FACSCalibur» (Becton Dickinson), укомплектованном воздухоохлаждаемым аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, с применением программного обеспечения CellQwest. Гистограммы строили на основе результатов трех опытов по соотношению интенсивности средней флуоресценции на клетку сразу и через 1 час после окрашивания.

Бактериальная культура. *M. bovis BCG-GFP* были выращены на среде *Middlebrook 7H9* (Difco) с добавлением 10% OADC, глицерина 0,02% и 0,05% твина-80 до экспоненциальной фазы роста при 37 °C.

Фагоцитарная активность. Индекс фагоцитарной активности анализировали путем подсчета макрофагов линии THP-1, содержащих в цитоплазме *M. bovis BCG-GFP*.

Статистический анализ. Все эксперименты были повторены трижды. Результаты представлены как «среднее значение» ± «среднее отклонение». Для статистической обработки использовали t-тест Стьюдента. Данные проточной флуориметрии оценивали с применением Фактора Активности МЛУ (*MDR Activity Factor* – MAF) по следующей формуле:

$$MAF = 100 \times [(MFI_{inh} - MFI_0) / MFI_{inh}],$$

где MFI_{inh} и MFI_0 являются показателями среднего значения флуоресценции в присутствии и отсутствии ингибитора.

Результаты исследования и обсуждение

Определение чувствительности клеток моноцитарного и эпителиального происхождения к рифампицину и изониазиду

Для определения чувствительности клеток к действию изониазида выбран широкий диапазон его концентраций: от

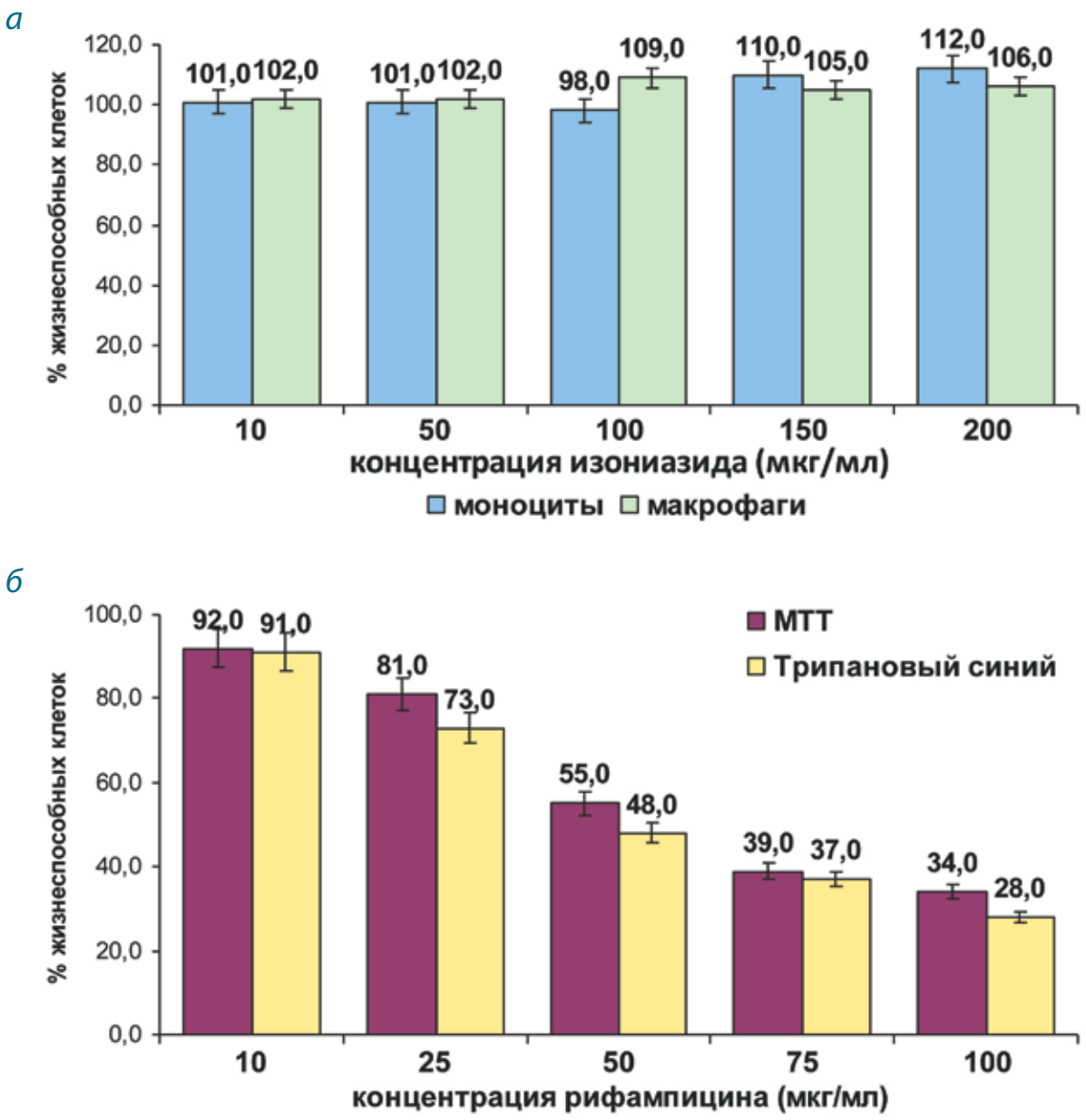


Рис. 1. Выживаемость клеток моноцитарного происхождения линии THP-1 в присутствии возрастающих концентраций: а) изониазида; б) рифампицина

10 мкг/мл до 200 мкг/мл. Вместе с тем проведенные исследования показали, что моноцитарно-макрофагальные клетки практически нечувствительны к действию этого противотуберкулезного препарата даже при достаточно высоких его концентрациях (рис. 1а). Аналогичные результаты получены в экспериментах с изониазидом и для клеток линии SPEV.

В отличие от изониазида присутствие рифампицина в среде культивирования приводит к уменьшению процента жизнеспособных моноцитарных клеток, по сравнению с контролем. В исследованные сроки эксперимента гибель 50% клеточной популяции (IC_{50}) наблюдается при концентрации рифампицина 50 мкг/мл. Наименьшая же концентрация рифампицина (10 мкг/мл) приводит к уменьшению клеточной популяции на 10–15% (рис. 1б).

Ранее нами было показано, что рифампицин индуцирует апоптоз в моноцитарных клетках человека уже при низких концентрациях [2]. Известно, что при пероральном приеме у взрослых концентрация рифампицина в плазме крови составляет от 4 до 32 мкг/мл и 9–17 мкг/мл – при внутривенном. У детей при внутривенном введении концентрация рифампицина в крови доходит до 26 мкг/мл [1].

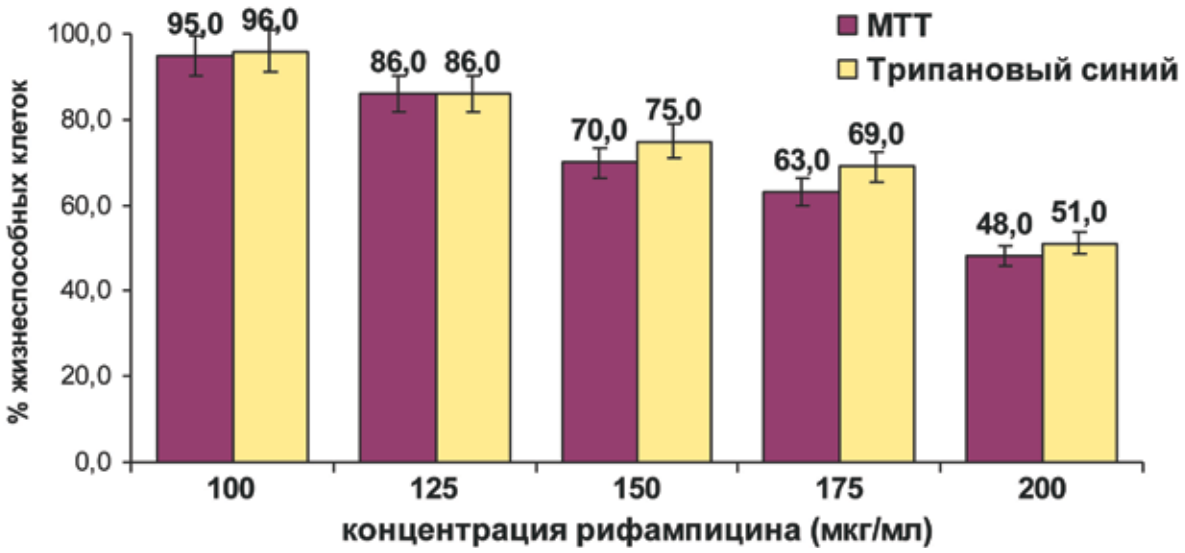


Рис. 2. Выживаемость клеток эпителиального происхождения линии SPEV в присутствии возрастающих концентраций рифампицина

В культуре эпителиальных клеток при концентрациях рифампицина 100–160 мкг/мл через 72 часа воздействия процент выживших клеток постепенно уменьшается в среднем на 20–25%, достигая значений IC_{50} при концентрации 200 мкг/мл (рис. 2).

Уменьшение доли жизнеспособных эпителиальных клеток связано с развитием окислительного стресса и индукцией апоптотического пути их гибели [3]. Известно, что в клетках бактерий рифампицин связывается с β-субъединицей РНК-полимеразы [6], тогда как в клетках человека он оказывает воздействие на митохондрии [3].

Получение устойчивых к рифампицину линий клеток

Проведенные исследования показали, что формирование ЛУ (изменение уровня IC_{50}) можно регистрировать только для одного из изученных препаратов – рифампицина. Для получения устойчивых линий культивирование клеток проводили в присутствии субтоксичных концентраций рифампицина (10 мкг/мл – для моноцитарных клеток, 100 мкг/мл – для эпителиальных клеток) в течение 3 месяцев. Устойчивость к рифампицину определяли методом оценки выживаемости 50% клеточной популяции в возрастающих концентрациях препарата на разных сроках культивирования: происходило постоянное повышение уровня устойчивости культуры (IC_{50}) к токсическим концентрациям препарата (от 1,5 до 2,5 раз) (рис. 3). Это свидетельствует о развитии механизмов устойчивости моноцитарных клеток к рифампицину, зависящем от времени воздействия препарата.

Эпителиальные клетки демонстрируют более выраженное развитие устойчивости: IC_{50} возрастает в 2–2.5 раза и увеличивается с 190 до 450 мкг/мл (рис. 4).

При удалении препарата из среды культивирования происходит нивелирование эффекта «устойчивости», и через

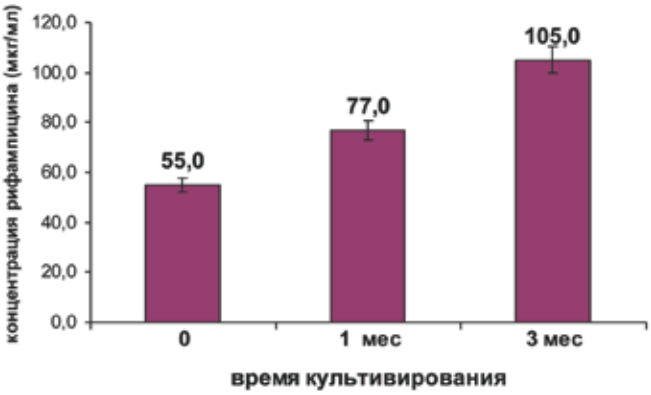


Рис. 3. Увеличение индекса цитотоксичности IC_{50} к рифампицину моноцитарных клеток линии THP-1 в присутствии субтоксичной (10 мкг/мл) концентрации рифампицина

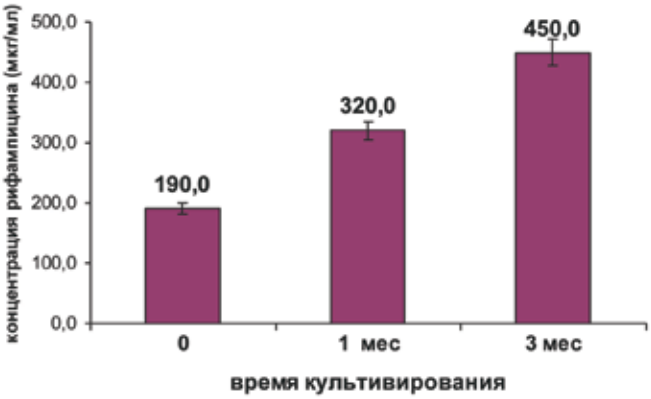


Рис. 4. Увеличение индекса цитотоксичности IC_{50} к рифампицину эпителиальных клеток линии SPEV в присутствии субтоксичной (100 мкг/мл) концентрации рифампицина

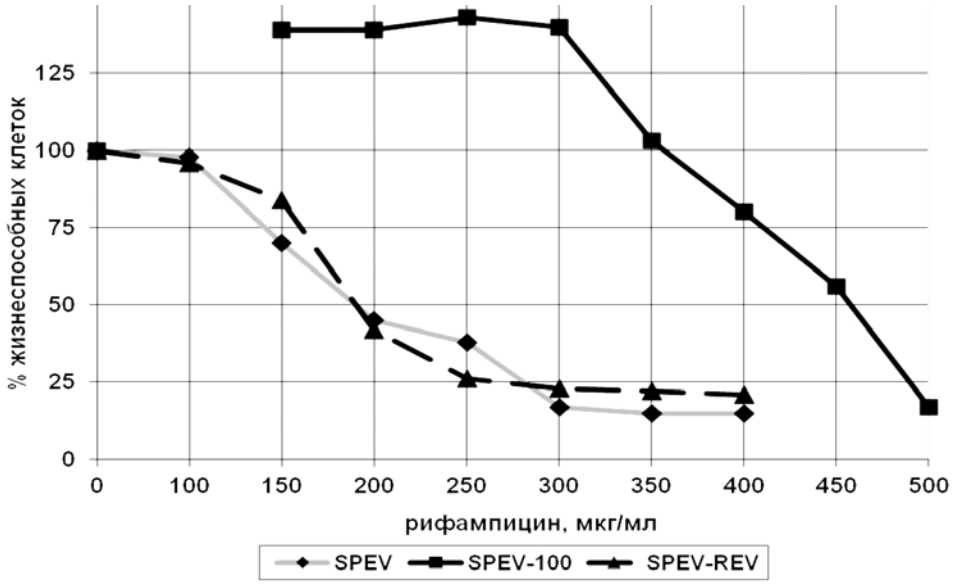


Рис. 5. Снижение устойчивости к рифампицину в эпителиальных клетках линии SPEV-100 при удалении препарата из среды культивирования. SPEV – исходная линия клеток; SPEV-100 – устойчивая к рифампицину линия клеток; SPEV-REV – линия клеток, утратившая устойчивость к рифампицину

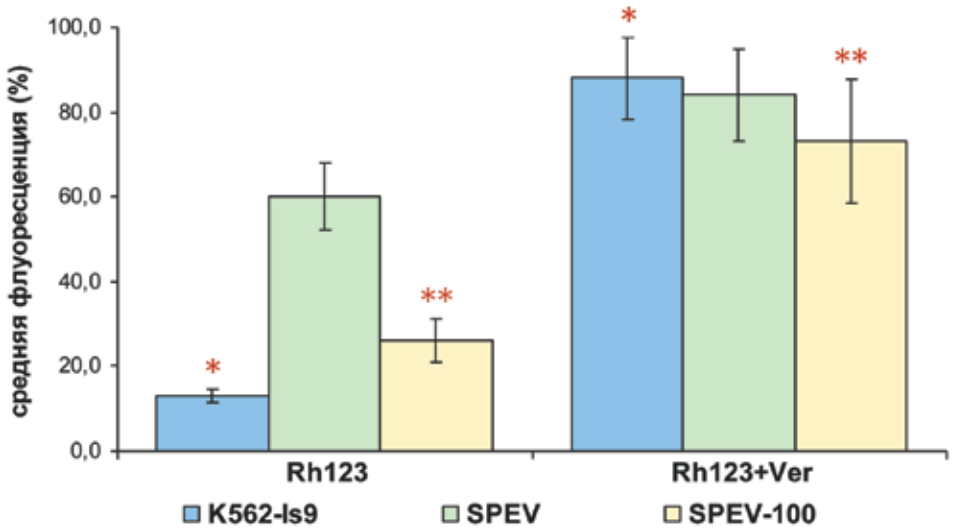


Рис. 6. Увеличение выброса родамина 123 (Rh123) в клетках линии SPEV, устойчивых к рифампицину. Верапамил (Ver) – специфический блокатор Pgp – ингибирует выброс красителя. Звездочками отмечены достоверные различия (p < 0,05)

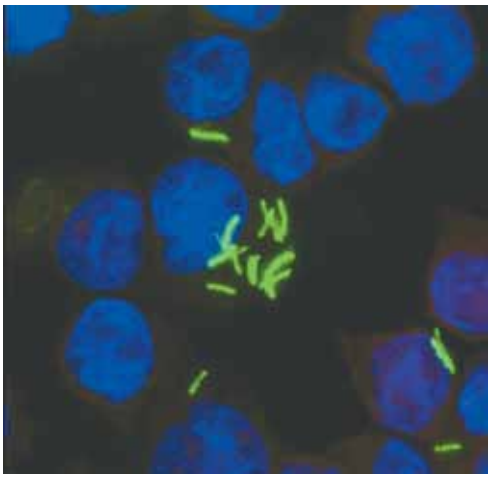
1 месяц клетки возвращаются к исходному уровню чувствительности к рифампицину (рис. 5).

Таким образом, показана возможность формирования ЛУ клеток моноцитарного и эпителиального ряда к рифампицину. Устойчивость формируется в присутствии субтоксичных концентраций препарата и зависит от времени его воздействия. Эффект «устойчивости» является обратимым, в отсутствие рифампицина данный механизм утрачивается, клетки демонстрируют исходный уровень чувствительности к препарату.

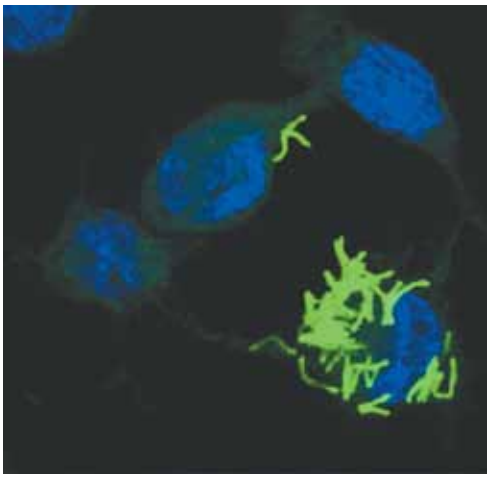
Определение функциональной активности белка Pgp в клетках с феноменом лекарственной устойчивости к рифампицину

Классическим субстратом для Pgp является флуоресцентный краситель родамин 123. Его выброс из внутриклеточной среды (снижение накопления красителя внутри клеток) является функциональным тестом на активность Pgp при действии различных лекарственных препаратов – клетки активно выбрасывают краситель в том случае, если на мембране присутствует Pgp [4]. При этом уровень флуоресценции будет снижаться, отражая степень активности этого белка. Если принять уровень свечения культуры в точке *0 час* (сразу после инкубации красителя) за 100%, то можно составить сравнительную гистограмму изменения средней флуоресценции культуры через 1 час эксперимента.

В клетках культуры SPEV-100 выброс родамина 123 идет значительно активнее, чем в клетках исходной линии (рис. 6): через 1 час интенсивность флуоресценции снижается в 4–5 раз и составляет около 25% от первоначальной,



а



б

Рис. 7. Разное содержание M. bovis-GFP в цитоплазме макрофагальных клеток линий THP-1 (а) и THP-1-10 (б). Конфокальная лазерная микроскопия; голубой цвет – ядра, зеленый цвет – M. bovis-GF

тогда как в исходной линии – только в 1,5–2 раза (составляет 60% от первоначального).

Для сравнения приведен выброс родамина 123 клетками линии K562-Is9, которые содержат функционально-активный Pgp и способны активно выбрасывать родамин 123: через 1 час интенсивность флуоресценции в этих клетках снижается до 12% от первоначального уровня. Верапамил (R(+)-verapamil hydrochloride) – специфический блокатор Pgp и в его присутствии происходит ингибирование выброса красителя. Как в моноцитарных, так и в эпителиальных клетках инкубация с верапамилом приводит к достоверному уменьшению выброса красителя: в клетках культуры K562-Is9 уровень флуоресценции увеличивается с 12 до 86% и в клетках культуры SPEV-100 – с 25 до 72%, то есть выявленные отличия достоверны. Для клеток культуры SPEV получен достаточно вариабельный диапазон данных: большой разброс значений в этом случае не позволяет сделать вывод о достоверности отличий. Таким образом, длительное культивирование эпителиальных клеток в среде с рифампицином приводит к достоверному увеличению активности одного из основных белков множественной лекарственной устойчивости – Pgp и сопровождается развитием устойчивости клеток к рифампицину.

Определение фагоцитарной активности макрофагальных клеток, устойчивых к рифампицину

Макрофагальные клетки человека линии THP-1 были получены при дифференцировке моноцитов в макрофаги при помощи форболового эфира. Оценку фагоцитарной активности клеток проводили в присутствии штамма *M. bovis-GFP*. Данный штамм микобактерий характеризуется наличием трансфецированного гена флуоресцентного зеленого белка (GFP), что позволяет их визуализировать внутри макрофагов при светооптическом исследовании. Метод конфокальной лазерной микроскопии позволяет в оценке фагоцитарного индекса учитывать только те клетки, в которых *M. bovis-GFP* располагаются непосредственно в цитоплазме. Макрофаги THP-1 демонстрируют индекс фагоцитарной активности в пределах 17–18% (18,4 ± 1,2%), тогда как клетки устойчивые к рифампицину (линия THP-1-10) характеризуются его увеличением до 29,0 ± 0,8%. При этом в популяции встречаются клетки с высоким содержанием микобактерий, что не характерно для исходной клеточной линии THP-1 (рис. 7).

Выводы

1. Установлена возможность формирования лекарственной устойчивости к рифампицину на уровне соматических клеток разного происхождения – моноцитарно-макрофагальных и эпителиальных.
2. Устойчивость соматических клеток к рифампицину формируется в присутствии субтоксичной концентрации препарата: IC_{50} в первые 3 месяца возрастает в 1,5–2,5 раза.
3. Клетки, устойчивые к рифампицину, отличаются повышенной функциональной активностью одного из основных белков МЛУ – Pgp.
4. В макрофагах с фенотипом лекарственной устойчивости фагоцитарная активность возрастает: индекс фагоцитоза *M. bovis-GFP* увеличивается в 1,5 раза.
5. Феномен устойчивости соматических клеток к рифампицину зависит от времени воздействия препарата и является обратимым, что свидетельствует о наличии в клетках механизмов, его обуславливающих.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда (проект № 14-50-00029).

Литература

1. *Визель А.А., Гурылева М.Э. Туберкулез. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 208 с.*
2. *Ерохина М.В., Александрова Е.А., Прокопенко А.В., Лепеха Л.Н., Онищенко Г.Е. Особенности влияния рифампицина на механизмы гибели моноцитарных клеток. // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 11. – С. 49-55.*
3. *Ерохина М. В., Курынина А. В., Онищенко Г. Е. Митохондрии являются мишенью для противотуберкулезного препарата рифампицина в культивируемых эпителиальных клетках. // Биохимия. – 2013. – Т. 78. – № 10. – С. 1473-1484.*
4. *Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток (обзор). // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 112-126.*
5. *Borst P., Oude Elferink R. Mammalian ABC transporteres in health and disease. // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – Vol. 71. – P. 537-592.*
6. *Campbell E., Korzheva N., Mustaev A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. // Cell. – 2001. – Vol. 104. – P. 901-912.*
7. *Carmichael J., De Graff W., Gazdar A. et al. Evaluation of a teirazoilium-based semiautomated colorimetrie assay: assessment of chemosensitivity testing. // Cancer. Res. – 1987. – Vol. 47. – P. 936-942.*
8. *Florea B., van der Sandt I., Schrier S. et al. Evidence of P-glycoprotein mediated apical to basolateral transport of flunisolide in human broncho-tracheal epithelial cells (Calu-3). // Br. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 134. – N. 7. – P. 1555-1563.*
9. *Hamilton K., Backstrom G., Yazdanian M. et.al. P-glycoprotein efflux pump expression and activity in Calu-3 cells. // J. Pharm. Sci. – 2001. – Vol. 90. – N. 5. – P. 647-658.*
10. *Ling V. Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian calls // Can. J. Genet. Cytol. – 1975. – Vol. 17. – P. 503-515.*
11. *Sheps J., Ling V. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. // Eur. J. Physiol. – 2007. – Vol. 453. P. 545-553.*
12. *Scheffer G., Pijnenborg A., Smit E. et al. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. // J. Clin. Pathol. – 2002. – Vol. 55. – P. 332-339.*
13. *Stromskaya T., Rybalkina E., Shtil A. et al. Influence of exogenous RAR alpha gene on MDR1 expression and P-glycoprotein function in human and rodent cell lines. // Br. J. Cancer. – 1998. – Vol. 77. – N. 11. – P. 1718-1725.*

Сведения об авторах

***Ерохина Мария Владиславовна** – старший научный сотрудник отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат биологических наук*

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-91-79

e-mail: erokhinam@bk.ru

***Лепеха Лариса Николаевна** – руководитель отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор биологических наук, профессор*

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-91-79

e-mail: lep3@yandex.ru

***Эргешов Атаджан Эргешович** – директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук, профессор*

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-91-79

e-mail: cniit@ramn.ru

УДК 571:[616-002.5:614.446:57.083.1]

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА *IN VIVO* И *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Т.В. Ванеева[1], Н.В. Куликовская[1], М.А. Краснова[1], Г.В. Бондаренко[2], И.В. Рыманова[2], А.Л. Собкин[2], С.Г. Сафонова[1]

THE RESULTS OF APPLICATION OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* IMMUNOLOGICAL METHODS OF TUBERCULOSIS DIAGNOSTICS IN HIV-PATIENTS

T.V. Vaneeva, N.V. Kulikovskaya , M.A. Krasnova, G.V. Bondarenko, I.V. Rimanova., A.L. Sobkin, S.G. Safonova

Проанализированы результаты применения кожной пробы с препаратом Диаскинтест® и лабораторного теста T-SPOT®.TB у 75 больных ВИЧ-инфекцией с туберкулезом легких. Показано, что при использовании T-SPOT®.TB доля положительных результатов в целом составляет 60,0% (95% ДИ 48,7–70,4%), при применении кожной пробы – 22,7% (95%ДИ 14,6–33,4%). Выявлена умеренная корреляционная связь результатов обоих тестов и количеством CD4⁺ Т-клеток. Процент положительных результатов T-SPOT®.TB у больных с количеством CD4⁺ Т-клеток от 50 кл/мкл и более достоверно выше таковых у пациентов с содержанием CD4⁺ Т-клеток менее 50 кл/мкл (81,1% против 9,1%, по критерию χ^2, $p < 0,01$). Результаты двух тестов совпали в 48,0% случаев и были дискордантны в 52,0%, согласованность тестов была низкой (к = 0 ,17; $p < 0,05$). Представленные результаты позволяют сделать заключение о высокой эффективности применения теста T-SPOT®.TB у больных сочетанной патологией ВИЧ-туберкулез. Ограничением для использования этого теста является выраженная иммуносупрессия с количеством CD4⁺ Т-клеток менее 50 кл/мкл.

***Ключевые слова**: иммунодиагностика, туберкулез, ВИЧ-инфекция, CD4⁺ Т-клетки, Диаскинтест, T-SPOT®.TB*

We analized the results of application of skin test with Diaskintest® and T-SPOT®.TB laboratory test in 75 HIV-patients with lung TB. It was found, that percentage of positive results consisted of 60.0% (95%CI 48.7–70.4%) using T-SPOT®.TB test and 22.7% (95%CI 14.6–33.4%) using skin test. Moderate correlation relationship of results of both tests and number of CD4⁺ T-cells was shown. The percentage of positive results using T-SPOT®.TB in patients with number of CD4⁺ T-cells from 50 cells/µl and more was significantly higher than those one in patients with number of CD4⁺ T-cells lower than 50 cells/µl (81.1% against 9.1%, according to χ^2, $p < 0,01$). The results of both tests coincided in 48.0% of cases and were discordant in 52.0%, coherence of the tests was low (к = 0.17; $p < 0.05$). The given results allow us to conclude that using T-SPOT®.TB test was highly effective in HIV-patients with lung TB. The limitation for the test application was severe immunosuppression with number of CD4⁺ T-cells lower than 50 cells/µl.

***Keywords**: immunodiagnostics, tuberculosis, HIV-infection, CD4⁺ T-cells, Diaskintest, T-SPOT®.TB*

Введение

В последние годы в России, как и во всем мире, отмечается существенный рост распространения сочетанной инфекции туберкулез – ВИЧ (ТБ-ВИЧ) [6]. Учитывая сложности диагностики вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией на поздних стадиях, поиск наиболее эффективных методов диагностики и показаний к их использованию остается актуальным.

В настоящее время возможности для диагностики активного туберкулеза широки – наличие клинических симптомов,

[1] ГБУЗ «Московский городской научно-практический Центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».
[2] ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница №3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы».

результаты инструментальных (в первую очередь рентгенологических) исследований, бактериологическая и молекулярно-биологическая идентификация *M. tuberculosis*, кожные пробы с туберкулином и аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР – препарат ДИАСКИНТЕСТ®). Однако при выраженных нарушениях клеточного иммунитета, наблюдающихся у больных ВИЧ-инфекцией, характерная клиническая и рентгенологическая картина туберкулеза становится стертой [7, 8, 14, 21], а частота обнаружения *M. tuberculosis* в диагностическом материале, по данным ряда авторов, снижается до 30–40% [1]. В этих условиях диагностическая ценность иммунологических методов может возрасти, особенно когда результаты других вышеуказанных исследований противоречивы или недостаточно убедительны. Кроме того, в условиях отсутствия ясного понимания сущности латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ) как клинического состояния, исследование диагностических возможностей этих тестов у больных активным туберкулезом является единственным способом оценить их потенциал и в диагностике ЛТИ.

Основным иммунологическим методом выявления туберкулеза многие годы служили кожные пробы с туберкулином. Сегодня их место (в разных странах в большей или меньшей степени) занимают коммерческие тесты IGRA (*Interferon-Gamma Release Assays*), основанные на оценке высвобождения интерферона-гамма (ИФН-γ) мононуклеарными клетками крови в результате их взаимодействия со специфическими белками *M. tuberculosis* (ESAT-6 и CFP-10). В России в последние несколько лет наряду с туберкулиновыми применяют кожные пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР), который также включает в себя специфические белки ESAT-6 и CFP-10. Была продемонстрирована его эффективность в диагностике активного туберкулеза, особенно при применении у детей и подростков [2, 4].

Исследование с помощью кожной пробы с АТР у больных ВИЧ-инфекцией выявило меньшую (по сравнению с пациентами при отсутствии ВИЧ-инфекции) чувствительность теста [5].

В данной ситуации может оказаться целесообразным использование IGRA, в частности коммерческой тест-системы T-SPOT®.*TB*. Следует отметить, что взгляды на возможности использования IGRA для диагностики туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц противоречивы, в ряде национальных программ рекомендуется их применение, в других – нет [13, 16, 19, 22].

На основании утвердившегося мнения о том, что чувствительность тестов, основанных на оценке клеточного иммунного ответа, у больных ВИЧ-инфекцией снижена, предполагалось, что дефицит $CD4^+$ Т-клеток будет иметь серьезное отрицательное влияние на результаты IGRA. Однако ряд работ свидетельствует о том, что тесты IGRA обладают более высокой чувствительностью у ВИЧ-инфицированных, чем кожная проба с туберкулином [17, 20, 23]. Было показано также, что число $CD4^+$ Т-лимфоцитов влияет на результаты IGRA у ВИЧ-инфицированных лиц только при очень низком их уровне [12, 15].

Цель исследования

Анализ чувствительности кожной пробы с АТР и коммерческого лабораторного теста, основанного на определении продукции (ИНФ-γ) в ответ на взаимодействие со специфическими белками *M. tuberculosis*, у больных сочетанной инфекцией ТБ/ВИЧ при различной степени иммуносупрессии.

Материал и методы

В исследование включены 75 больных туберкулезом легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией, поступивших в ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы» с мая по декабрь 2015 года. Диагноз туберкулеза легких был установлен на основании клинико-рентгенологического обследования. В 46,7% случаев диагноз был подтвержден бактериологическим исследованием мокроты и другого диагностического материала. Всем больным были проведены кожная проба с АТР и тест T-SPOT®.*TB*.

Иммунологические исследования *in vitro* были выполнены в Московском городском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом.

Среди обследованных были 51 мужчина и 24 женщины в возрасте от 24 до 62 лет. У всех пациентов туберкулез был диагностирован впервые: в 80,0% случаев длительность процесса не превышала трех месяцев, в 15,0% – 6 месяцев, в 5,0% – 9 месяцев. В подавляющем большинстве случаев (97,3%) процесс был охарактеризован как активный туберкулез. Среди клинических форм преобладал диссеминированный туберкулез – 38,7%. Доля больных инфильтративным туберкулезом составила 28,0%, туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов (ВГЛУ) – 20,0%, очаговым – 5,3%, милиарным – 4,0%, генерализованным – 2,7%, плевритом – 1,2%. Распространенность туберкулезного процесса в пределах одного-двух сегментов легкого была отмечена у 26,7% больных, в пределах доли – у 18,7%, в пределах двух долей – у 1,3%, легкое целиком было поражено у 6,7% больных, оба легких – у 46,0%. У 16,0% больных были обнаружены полости распада в легких (не превышающие 3 см).

У всех больных была поздняя стадия ВИЧ-инфекции: в 40,0% случаев – 4Б, а в 60,0% – 4В. У большинства больных отмечено прогрессирование процесса (77,3%), антиретровирусные препараты на момент исследования принимали 57,3% больных.

Кожную пробу с АТР проводили согласно рекомендациям [2] и оценивали как положительную, отрицательную и сомнительную (последний вариант не был зарегистрирован ни у одного из 75 пациентов).

Таблица 1. Результаты теста T-SPOT®.TB у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ с разной выраженностью иммуносупрессии

Количество CD4+ (клеток в мкл)	Количество больных (*абс.*)	Результаты теста					
		положительный		отрицательный		неопределенный	
		абс.	%	*абс.*	%	*абс.*	%
< 50	22	2	9,1	15	68,2	5	22,7
50-199	27	20	74,1	5	18,5	2	7,4
200-499	17	14	82,4	3	17,7	–	–
≥ 500	9	9	100,0	–	–	–	–
Всего	75	45	60,0	23	30,7	7	9,3

Определение содержания CD4+ Т-клеток проводили методом проточной цитометрии на цитофлуориметре FC500 с использованием моноклональных антител CD45/CD4/CD8/CD3 и частиц для определения абсолютного подсчета FLOW-COUNT FLUOROSPHERES по методике производителя (Beckman Coulter, США).

Сенсибилизацию к антигенам *Mycobacterium tuberculosis* определяли *in vitro* с помощью тест-системы T-SPOT®.*TB* (Oxford Immunotec Limited, Великобритания) согласно инструкции и обучающему руководству производителя. Для этого из гепаринизированной венозной крови выделяли мононуклеарные клетки, помещали их в лунки микротитровального планшета в количестве 250 000 в каждой лунке из расчета четыре лунки на одного пациента: одна контрольная лунка, одна лунка с добавлением митогена, одна лунка с добавлением ESAT-6, одна лунка с добавлением CFP-10. Планшет инкубировали при 37 °C и 5% CO_2 в течение 18–20 часов. Затем проводили процедуру визуализации Т-клеток, продуцирующих ИФН-γ, методом ELISPOT. Подсчет Т-клеточных точек-«отпечатков» осуществляли с использованием цифрового USB-микроскопа. Результат исследования оценивали как положительный, отрицательный или неопределенный (согласно инструкции производителя).

Межгрупповые различия оценивали с помощью критерия χ^2. Взаимосвязь между количеством CD4+ Т-клеток и результатами других тестов оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмана (ρ). Для оценки согласованности результатов тестов рассчитывали коэффициент каппа Коэна (к). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$.

Результаты исследования и обсуждение

У обследованных больных с сочетанной инфекцией ВИЧ/ТБ количество CD4+ Т-клеток находилось в пределах от 0 до 870 кл/мкл, (медиана – 112 кл/мкл, межквартильный размах 36,0–284,0). По выраженности иммуносупрессии больные были разделены на четыре группы: менее 50 клеток/мкл, от 50 до 199, от 200 до 499 и от 500 и более кл/мкл. В I группу вошли 22 больных с количеством CD4+ Т-клеток от 0 до 47 кл/мкл, во II – 27 (от 54 до 191 кл/мкл), в III – 17 (от 203 до 482 кл/мкл), в IV – 9 (от 509 до 870 кл/мкл).

В целом положительные результаты теста T-SPOT®.*TB* отмечены у 45 больных, что составило 60%, 95% доверительный интервал (95%ДИ) 48,7–70,4%) (табл. 1).

В I группе (22 больных) было два положительных результата T-SPOT®.*TB* (9,1%; 95%ДИ 1,3–29,0%), во II – у 20 из 27 больных (74,1%; 95%ДИ 55,1–87,1%), в III – у 14 из 17 больных (82,4%; 95%ДИ 58,2–94,6%), а в IV – у 9 из 9 пациентов (100%; 95%ДИ 65,5–100%). Общая доля положительных результатов у больных с количеством CD4+ Т-клеток от 50 кл/мкл и более составила 81,1% (95%ДИ 68,4–89,6%).

Неопределенные результаты были отмечены у семи из 75 пациентов (9,3%; 95%ДИ 4,3–18,3%), из них у пяти больных с количеством CD4+ менее 50 кл/мкл (22,7%; 95%ДИ 9,7–43,9%) и у двух из 27 с числом Т-клеток от 50 до 199 кл/мкл (7,4%; 95%ДИ 1,0–24,5%). В III и IV группах не было зафиксировано ни одного неопределенного результата. В шести случаях результаты теста были оценены как неопределенные в связи с отсутствием реакции на Т-клеточный митоген (положительный контроль), что не позволило интерпретировать отрицательные результаты в лунках с антигенами как отсутствие специфически сенсибилизированных Т-клеток. У одного больного выраженная спонтанная продукция ИФН-γ (отрицательный контроль) не дала возможности трактовать положительный ответ в лунках с антигенами как специфический.

Приведенные данные демонстрируют зависимость характера результатов T-SPOT®.*TB* у больных ВИЧ-инфекцией с наличием активного туберкулеза от степени иммуносупрессии: по мере снижения Т-хелперов в крови количество положительных результатов снижалось со 100% до 9,1% (несомненно, что увеличение числа наблюдений внесет коррективу в первую цифру), и напротив, число неопределенных результатов увеличилось с 7,4% до 22,7% при снижении CD4+ Т-клеток в первых двух группах и полностью отсутствовало у больных с числом CD4+-клеток 200 кл/мкл и более. Корреляционная связь результатов, полученных в тесте T-SPOT®.*TB* у больных ВИЧ/ТБ, и количества CD4+ Т-клеток в крови была умеренной (коэффициент корреляции $\rho = 0{,}28$; $p \leq 0{,}01$). Также выявлено, что доля положительных результатов достоверно различалась у больных с количеством CD4+ Т-клеток менее 50 кл/мкл и пациентов с количеством этих клеток от 50 кл/мкл и более (9,1% и 81,1%, соответственно; по критерию χ^2, $p < 0{,}01$).

Таблица 2. Результаты кожной пробы с АТР у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ с разной выраженностью иммуносупрессии

Количество CD4+ (клеток/мкл)	Количество больных (*абс.*)	Результаты теста			
		положительный		отрицательный	
		абс.	%	*абс.*	%
< 50	22	–	–	22	100,0
50-199	27	6	22,2	21	77,8
200-499	17	5	29,4	12	70,6
≥ 500	9	6	66,7	3	33,3
Всего	75	17	22,7	58	77,3

Полученные результаты согласуются с данными других авторов в отношении общей доли положительных результатов у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ [10, 11, 18] и низкой чувствительности теста T-SPOT®.*TB* у больных ВИЧ-инфекцией с содержанием CD4+ Т-клеток ниже 50 кл/мкл [9]. В то же время эти исследователи не отметили различий в частоте положительных результатов T-SPOT®.*TB* у больных с разной степенью выраженности иммуносупрессии, но подтвердили наши наблюдения о высоком проценте неопределенных результатов у больных с иммуносупрессией ниже 50 кл/мкл [9, 10].

В целом положительные результаты при проведении кожной пробы с АТР отмечены у 17 больных, что составило 22,7% (95%ДИ 14,6–33,4%) (табл. 2).

В I группе (22 пациента) не было отмечено ни одного положительного результата пробы с АТР, во II – положительные результаты теста были зафиксированы у шести больных (22,2%; 95% ДИ 10,3–41,1%), в III – у пяти из 17 больных (29,4%; 95% ДИ 13,9–53,4%), в IV – у шести из девяти пациентов (66,7%; 95% 35,1–88,3%).

Полученные результаты демонстрируют низкую чувствительность кожной пробы с АТР у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ. Показана зависимость результатов пробы с АТР от степени иммуносупрессии: по мере снижения числа CD4+ Т-клеток в крови количество положительных результатов снижалось с 66,7% при их содержании более 500 кл/мкл до полного отсутствия таковых у пациентов с их числом менее 50 кл/мкл. Корреляционная связь результатов, полученных в пробе с АТР, и количества CD4+ Т-клеток в крови была более выраженной по сравнению с T-SPOT®.*TB* (коэффициент корреляции $\rho = 0{,}46$; $p \leq 0{,}01$).

В других работах было отмечено снижение доли положительных результатов пробы с АТР у пациентов сочетанной инфекцией ВИЧ/ТБ по сравнению с не инфицированными ВИЧ больными туберкулезом [2, 3], однако эти изменения были менее выражены, чем в нашем исследовании. Так, в одном исследовании общий процент положительных результатов пробы с АТР у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ составил 63,9% [3], а в другом – 40% [2], и в одной, и в другой работе была отмечена зависимость числа положительных результатов кожной пробы от количества CD4+ Т-клеток.

Поскольку большинством исследователей отмечена прямая зависимость доли положительных результатов иммунологических тестов на туберкулез от содержания CD4+ Т-клеток в крови, вероятная причина таких расхождений кроется в различиях доли больных с выраженным дефицитом Т-хелперов. В нашем исследовании процент больных с дефицитом CD4+ Т-клеток менее 200/мкл составил 65,3% (49 из 75 пациентов), почти у половины из них (22 из 49) содержание Т-хелперов было менее 50 кл/мкл. В двух упомянутых выше работах такие больные (менее 200 Т-хелперов/мкл) составили 46,6% и 52,8%, при этом в последнем исследовании лишь у 58,3% больных была диагностирована ВИЧ-инфекция 4-й стадии. Как было отмечено выше, в наше исследование были включены только больные ВИЧ-инфекцией на поздней стадии (4Б и 4В).

Совпадения результатов кожной пробы с АТР и теста T-SPOT®.*TB* были отмечены у 36 больных (48,0%), из них у 15 (20,0%) результаты обоих тестов были положительными, у 21 (28,0%) – отрицательными (табл. 3). Результаты тестов оказались дискордантными у 39 пациентов (52,0%), из них у 30 (40,0%) наблюдалась отрицательная кожная проба с АТР при положительном результате T-SPOT®.*TB*, у двух (2,7%) – положительная кожная проба при отрицательном результате T-SPOT®.*TB*, у семи (9,3%) больных с неопределенными результатами теста T-SPOT®.*TB* кожные пробы с АТР были отрицательными. Результаты двух тестов не были согласованны между собой

Таблица 3. Сопоставление результатов кожной пробы с АТР и теста T-SPOT®.TB у больных коинфекцией ВИЧ/ТБ

Кожная проба с АТР	Результат теста T-SPOT®.TB					
	положительный		отрицательный		неопределенный	
	абс.	%	*абс.*	%	*абс.*	%
положительная	15	20,0	2	2,7	–	–
отрицательная	30	40,0	21	28,0	7	9,3

(к = 0,17; $p < 0,05$) и не коррелировали ни с одной из клинических характеристик туберкулезного процесса и ВИЧ-инфекции.

Ввиду того, что в обоих исследованных тестах используются специфические для *M. tuberculosis* белки ESAT-6 и CFP-10, столь выраженные расхождения в их результатах оказались неожиданными. Сходство механизмов межклеточного взаимодействия, задействованных в кожной реакции на антигены *M. tuberculosis* и в реакции *in vitro* предполагало их бóльшую согласованность. Можно допустить, что высокий процент положительных результатов в тесте T-SPOT®.*TB* (за исключением больных с содержанием $CD4^+$ Т-клеток менее 50/мкл) связан с возможностью концентрировать Т-клетки до определенного (стандартного) уровня в необходимом объеме и минимизировать влияние неизвестных факторов на процесс активации и продукции ИФН-γ сенсибилизированными Т-лимфоцитами. В то же время иммунный ответ на внутрикожное введение АТР является, с одной стороны, более зависимым от количества Т-хелперов в циркулирующей крови, с другой – более комплексным и длительным, что позволяет влиять на него факторам, сопутствующим ВИЧ-инфекции.

Заключение

Представленные результаты позволяют сделать заключение о высокой эффективности применения теста T-SPOT®.*TB* у больных сочетанной патологией ВИЧ-туберкулез. Ограничением для использования этого теста является выраженная иммуносупрессия с количеством $CD4^+$ Т-клеток менее 50 кл/мкл. Несмотря на скептицизм международных рекомендаций относительно использования тестов IGRA в диагностике активного туберкулеза и учитывая сложности диагностики вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией на поздних стадиях, можно полагать, что его применение поможет расширить возможности лабораторной диагностики в выявлении активного туберкулеза у данной категории пациентов.

Литература

1. *Зимина В.Н. Совершенствование диагностики и эффективность лечения туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией при различной степени иммуносупрессии: автореф. дис. … д-ра мед. наук. – М., 2012. – 44 с.*
2. *Кожная проба с препаратом «ДИАСКИНТЕСТ®» – новые возможности идентификации туберкулезной инфекции/ под ред. М.А. Пальцева. – М.: Медицина, 2010. – 176 с.*
3. *Поддубная Л.В., Чикурова Т.Н., Федорова М.В. и др. Чувствительность кожной пробы с аллергеном туберкулезом у больных туберкулезом и ВИЧ-инфекцией. // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 11. – С. 16-20.*
4. *Слогоцкая Л.В., Кочетков Я.А., Синчихина О.Ю. и др. Динамика кожной пробы (Диаскинтест) у детей при оценке активности туберкулезной инфекции/ // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 2. – С. 59-63.*
5. *Слогоцкая Л.В., Филиппов А.В., Кочетков Я.А., и др. Чувствительность и специфичность Диаскинтеста при внелегочной локализации туберкулеза у больных с ВИЧ-инфекцией и без нее. // Иммунология. – 2011. – № 3. – С. 116-119.*
6. *Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – М., 2015. – 312 с.*
7. *Фролова О.П., Кравченко А.В., Мартынов А.А., Батыров Ф.А. Организация противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией: пособие для врачей. – М., 2007. – 120 с.*
8. *Burman W., Jones B. Clinical and radiographic features of HIV-related tuberculosis. // Semin. Respir. Infect. – 2003. – Vol. 18. – N. 4. – P. 263-271.*
9. *Cai R., Chen J., Guan L. et al. Relationship between T-Spot.TB responses and numbers of circulating $CD4^+$ T-cells in HIV infected patients with active tuberculosis. // Biosci. Trends. – 2014. – Vol. 8. – N. 3. – P. 163-168.*
10. *Cattamanchi A., Ssewenyana I., Davis J. et al. Role of interferon-gamma release assays in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients whis advanced HIV infection // BMC Infect. Dis. – 2010. – Vol. 10. – P. 75.*
11. *Chen J., Zhang R., Wang J. et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis. // PloS One. – 2011. – Vol. 6. – N. 11. – e26827.*
12. *Clark S., Martin S., Pozniak A. et al. Tuberculosis antigen-specific immune responses can be detected using enzyme-linked immunospot technology in human immunodeficiency virus (HIV)-1 patients with advanced disease. // Clin. Exp. Immunol. – 2007. – Vol. 150. – N. 2. – P. 238-244.*
13. *Denkinger C.M., Dheda K., Pai M. Guidelines on interferon-γ release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? // Clin. Microbiol. Infect. – 2011. – Vol. 17. – P. 806-814.*
14. *Garcia G., Moura A., Ferreira C., Rocha M. Clinical and radiographic features of HIV-related pulmonary tuberculosis according to the level of immunosuppression. // Rev. Soc. Bras. Med. Trop. – 2007. – Vol. 40. – N. 6. – P. 622-626.*
15. *Kabeer B., Sikhamani R., Swaminathan S. et al. Role of interferon gamma release assay in active TB diagnosis among HIV infected individuals. // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – N. 5. – e5718.*
16. *Kaplan J.E., Benson C., Holmes K.K. et al. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. // MMWR Recomm. Rep. – 2009. – Vol. 58 (RR–4). – P. 1-207.*
17. *Mandalakas A., Hesseling A., Chegou N. et al. High level of discordant IGRA results in HIV-infected adults and children. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2008. – Vol. 12. – N. 4. – P. 417-423.*

18. Metcalfe J., Everett C., Steingart K. et al. Interferon-γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. //J. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 204. – N. 4. – P. 1120-1129.
19. Pozniak A.L., Coyne K.M., Miller R.F. et al. British HIV Association guidelines for the treatment of TB/HIV coinfection 2011. // HIV Med. – 2011. – Vol. 12. – N. 9. – P. 517-524.
20. Rangaka M., Diwakar L., Seldon R. et al. Clinical, Immunological, and epidemiological importance of antituberculosis T cell responses in HIV-infected Africans. // Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 44. – P. 1639-1646.
21. Schutz C., Meintjes G., Almajid F. et al. Clinical management of tuberculosis and HIV-1 co-infection. // Eur. Respir. J. – 2010. – Vol. 36. – N. 6. – P. 1460-1481.
22. Sester M., Sotqiu G., Lanqe C. et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. // Eur. Respir. J. – 2011. – Vol. 37. – N. 1. – P. 100-111.
23. Stephan C., Wolf T., Goetsch U., et al. Comharing QuantiFERON-tuberculosis gold, T-SPOT tuberculosis and tuberculin skin test in HIV-infected individu from a low prevalence tuberculosis country. // AIDS. – 2008. – Vol. 22. – N. 18. – P. 2471-2479.

Сведения об авторах

Ванеева Татьяна Валерьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
e-mail: vaneevatv@rambler.ru

Куликовская Наиля Вафиновна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
e-mail: nailya-2009@yandex.ru

Краснова Мария Александровна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
e-mail: dna77@mail.ru

Бондаренко Галина Борисовна *– заведующая бактериологической лабораторией ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 125466, г. Москва, Куркинское ш., д. 29
Тел. + 7 (495) 571-40-87

Рыманова Ирина Вячеславовна *– заведующая туберкулезным легочным отделением для ВИЧ-инфицированных пациентов ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 125466, г. Москва, Куркинское ш., д. 29
Тел. + 7 (495) 571-22-47

Собкин Александр Лазаревич *– главный врач ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. профессора Г.А. Захарьина Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 125466, г. Москва, Куркинское ш., д. 29
Тел. + 7 (495) 571-71-45

Сафонова Светлана Григорьевна *– заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33
e-mail: safonova.s.g.@inbox.ru

УДК 616.24-002.5:616-03.-08-06:616.34

ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОАССОЦИИРОВАННЫХ ПОРАЖЕНИЙ КИШЕЧНИКА ПРИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ТЕРАПИИ

Ю.Р. Зюзя

ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

PATHOANATOMICAL CHARACTERIZATION OFANTIBIOTIC-INDUSED AFFECTIONS OF INTESTINAL TRACT CAUSED BY ANTITUBERCULOSIS THERAPY

Yu.R. Zuzya

Проанализированы антибиотикоассоциированные осложнения по секционным случаям за период 2013–2015 гг. На материале 46 аутопсий и биопсийном материале (17 исследований) проведено комплексное патологоанатомическое исследование антибиотикоассоциированных поражений толстой кишки. В секционном материале отмечен ежегодный рост антибиотикоассоциированных колитов, сыгравших роль в танатогенезе (0,98%, 4,83% и 6,18%). Констатирована тенденция к росту бактериальных и микотических суперинфекций с поражением не только кишечника, но и развитием генерализованных форм (генерализованная анаэробная инфекция – соответственно, 0%, 0,25%, 1,1%; генерализованные микозы – 1,2%, 2,5%, 3,9%). Во всех секционных случаях выявлен псевдомембранозный колит III типа (по классификации A. Price и D. Devis, 1977). Большую роль в развитии патологии играют такие факторы, как неосведомленность населения о высоком риске неконтролируемого использования антибактериальных средств; недооценка опасности врачами некорректной антибактериальной терапии для здоровья и жизни пациентов.

***Ключевые слова**: антибиотикоассоциированный колит, псевдомембранозный колит, противотуберкулезная терапия, генерализованные инфекции*

We analyzed the antibiotic-induced complications in a period of 2013–2015. We investigated 46 autopsies and material of biopsy (17 cases) to carry out a comprehensive pathological study of antibiotic-induced complications of large bowel. Investigation of autopsy material showed the annual growth of antibiotic-associated colitis, which played a role in tanatogenesis (1.0%, 4.8% and 6.2%). We stated a tendency to the growth of bacterial and mycotic superinfection, which caused not only enteropathy, but also the development of generalized forms (generalized anaerobic infection in 0%, 0.25%, and 1.1% of cases and generalized mycosises in 1.2%, 2.5%, and 3.9% of cases respectively). In all the cases, we revealed pseudomembranous colitis of type 3 according to the classification of A. Price and D. Devis, 1977. A great role in pathology development play such factors as lack of information about the high risk of uncontrolled receiving of antibacterial agents among people and doctors' underestimation of the danger of incorrect antibiotic therapy for the health and life of patients.

***Keywords**: antibiotic-induced colitis, pseudomembranous colitis, antituberculosis therapy, generalized infections*

Введение

Массивная антибактериальная противотуберкулезная терапия может иметь тяжелые неблагоприятные последствия даже при обоснованном и рациональном применении препаратов, что обусловлено побочными токсическими реакциями. Антибактериальные препараты нарушают функции органов, одним из которых является кишечник, естественный резервуар микрофлоры. Нарушение динамического равновесия микроорганизмов, вегетирующих в кишечнике, приводит к выраженным патологическим изменениям. Наиболее часто развиваются токсико-аллергические реакции с дисбиотическими нарушениями кишечника (дисбактериозами), микотические поражения, а также имеет место формирование антибиотикоустойчивых штаммов патогенных микроорганизмов. Понятие антибиотикоассоциированного колита включает все колиты, возникающие после назначения антибактериальной терапии и вплоть до четырех недель после отмены антибиотика, в тех случаях, когда не выявлено иных причин [4, 5, 7, 8].

В результате нарушения биоценоза в кишечнике могут развиваться анаэробные бактерии *Clostridium difficile*, что приводит к развитию колитов, ассоциированных с *C. difficile* (КДАК), в зарубежной литературе такие нозологические формы получили название нозокомиальных колитов, антибиотикоассоциированных колитов (ААК).

C. difficile представляет собой крупную неспорообразующую грамотрицательную облигатно-анаэробную бациллу. *C. difficile* выявляют при бактериологическом исследовании у 1–3% здоровых лиц и более чем у 20% пациентов, получающих антибактериальную терапию. Количество *C. difficile* в составе нормальной микрофлоры кишечника здорового взрослого человека не превышает 0,01–0,001 %, но при приеме антибиотиков количество увеличивается до 15–40%.

Основным фактором в развитии КДАК является нарушение микробной экологии в толстой кишке, угнетение резидентной анаэробной микрофлоры, формирование метаболической ниши для размножения *C. difficile* и перехода в токсинобразующую форму. Токсинобразующие штаммы являются основным возбудителем наиболее тяжелого поражения кишечника – псевдомембранозного колита (ПМК). Антибиотикотерапия предшествует развитию ПМК в 60–85% наблюдений [2, 3, 5].

C. difficile продуцирует несколько различных токсинов, наиболее известными являются токсин А (энтеротоксин), вызывающий повреждение колоноцитов и, как следствие этого, диарею, а также токсин В (цитотоксин), ответственный за цитопатогенное действие и развитие энцефалопатии, он же, по мнению ряда авторов, приводит к потере калия и развитию электролитных нарушений. Кроме того, есть мнение, что данный микроорганизм синтезирует белок, угнетающий перистальтику кишечника [2, 5].

ПМК может осложниться развитием реактивного перитонита, инфекционно-токсического шока, токсического мегаколона, перфорацией толстого кишечника с развитием перитонита.

Цель исследования

Проанализировать кишечные осложнения массивной антибактериальной терапии и оценить морфологическую картину антибиотикоассоциированных поражений кишечника.

Материал и методы исследования

Проанализирован материал централизованного патологоанатомического отделения ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр туберкулеза Департамента здравоохранения города Москвы» за 2013–2015 гг.

На материале 46 аутопсий и биопсийном материале (17 исследований) изучена морфологическая картина антибиотикоассоциированных поражений толстой кишки. При изучении материала использовали гистологический, гистохимический, гистобактериоскопический и иммуногистохимический методы исследования. Полученные кусочки толстой кишки фиксировали в 10%-ном забуференном формалине, обрабатывали по стандартной методике и получали гистологические срезы толщиной 3–5 микрон. Проводили обзорную окраску гематоксилином и эозином, по Ван Гизону – для выявления фиброзных изменений, по Цилю-Нельсену – для определения кислотоустойчивых бактерий, по Броун-Хоппсу и ШИК-реакцию – для визуализации микотических структур. Иммуногистохимическое исследование выполняли в соответствии с протоколом, использовали моноклональные антитела *Monoclonal Mouse Anti-Cytomegalovirus, clone CCH2+DDG9, DAKO*. Статистическая обработка материалов исследования проводилась с помощью прикладных программ BIOSTAT и STATISTICA, за величину уровня статистической значимости принимали значение $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

На материале 1156 аутопсий за период 2013–2015 гг. (соответственно, 407, 393 и 356 вскрытий), тяжелый антибиотикоассоциированный колит, сыгравший роль в танатогенезе, выявлен в 46 случаях, что составило 4,0%. Анализ показал статистически достоверный рост данного заболевания за трехлетний период – соответственно, 4, 19 и 22 умерших, что в процентном соотношении соответствовало 1,0%, 4,8% и 6,2%. Роль *C. difficile* в качестве возбудителя была подтверждена прижизненно у 10 умерших.

Наиболее часто встречающееся антибиотикоассоциированное поражение кишечника при массивной противотуберкулезной терапии – псевдомембранозный колит. Выделяют несколько этапов развития этой формы поражения кишечника: катаральное воспаление, эрозивно-геморрагическое воспаление, псевдомембранозное поражение.

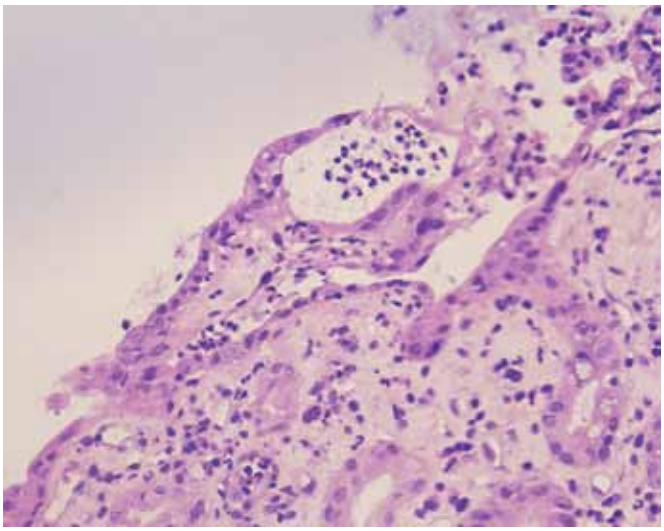


Рис. 1. Катаральный колит с участком эпителизирующегося поверхностного микродефекта слизистой оболочки; микропрепарат, окраска гематоксилином и эозином (× 200)

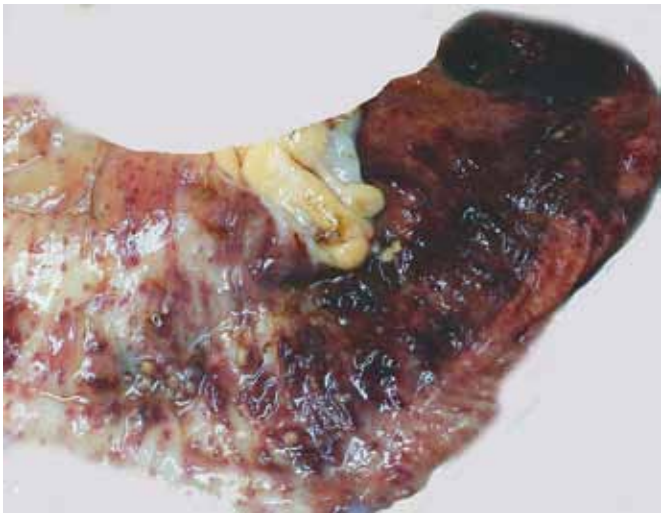


Рис. 2. Колит с выраженным геморрагическим компонентом; нефиксированный макропрепарат

Катаральное воспаление макроскопически характеризовалось умеренным отеком и гиперемией слизистой оболочки толстой кишки. При гистологическом исследовании: собственная пластинка слизистой оболочки, подслизистый слой – с отеком, полнокровием сосудов, полиморфной клеточной инфильтрацией различной выраженности, количество бокаловидных клеток уменьшено (рис. 1).

По мере дальнейшего развития процесса в кишке констатировалось формирование поверхностных дефектов слизистой оболочки с присоединением геморрагического компонента. Визуально стенка кишки утолщалась, слизистая оболочка была резко гиперемирована, могли быть изменения по типу выраженной имбибиции стенки кишки кровью (рис. 2).

Микроскопическое исследование выявляло участки деструкции слизистой оболочки с развитием поверхностных дефектов (эрозий). Сосуды резко полнокровные, с признаками повышенной проницаемости сосудистой стенки (отек и плазматическое пропитывание стенки, набухание и гидропическая дистрофия эндотелиоцитов, периваскулярный отек). В слизистой оболочке и подслизистом слое выраженные свежие кровоизлияния. Геморрагические изменения обычно нивелируются после отмены антибактериальных препаратов, но в тяжелых случаях может развиться диффузное кишечное кровотечение.

Псевдомембранозный колит характеризовался обильными очаговыми или массивными налетами фибриновых пленок (мембран), плотно фиксированных к слизистой оболочке, при отторжении которых выявлялись эрозивные и язвенные дефекты (т. е. имел место дифтеритический колит, разновидность фибринозного воспаления). Стенка кишки уплотнена, утолщена, отечная, на серозной оболочке могут быть нити фибрина (рис. 3, 4).

Микроскопически на стадии псевдомембранозного поражения сначала определяются ранние признаки в виде формирования фокального эпителиального некроза поверхностного эпителия в мезжелезистом пространстве. Далее

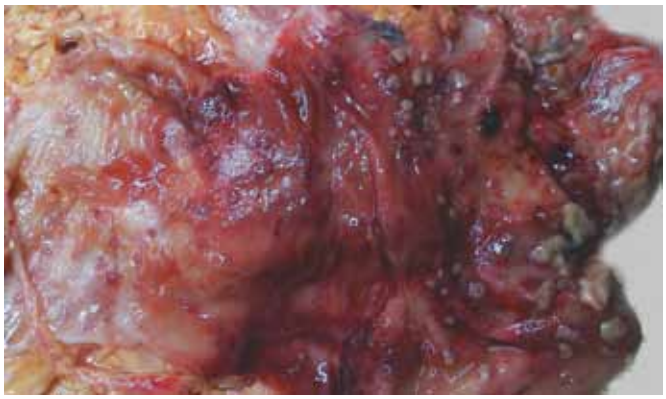


Рис. 3. Псевдомембранозный колит с очаговыми наложениями фибриновых пленок; нефиксированный макропрепарат

Рис. 4. Псевдомембранозный колит с массивными фибриновыми наложениями и мелкими язвенными дефектами; нефиксированный макропрепарат

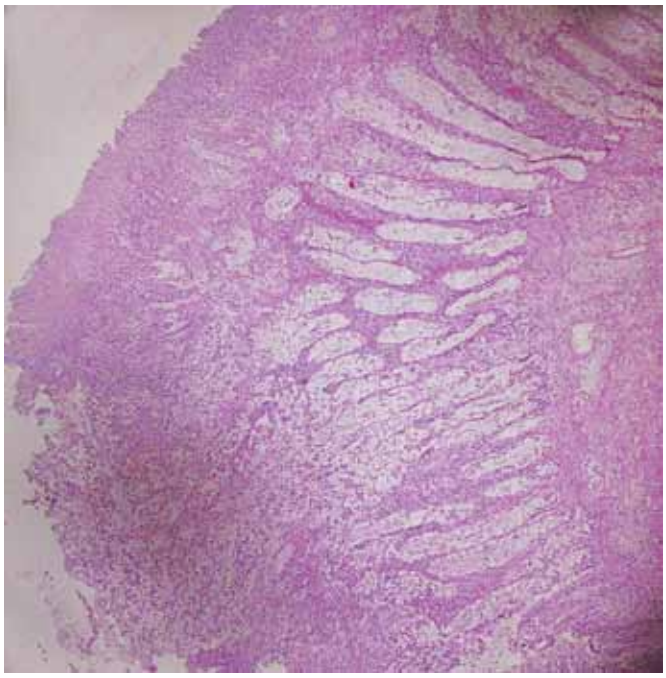


Рис. 5. Пседомембранозный колит. Расширенные крипты, на поверхности псевдомембрана из фибрина, слизи, погибшего и десквамированного эпителия, лейкоцитов; микропрепарат, окраска гематоксилином и эозином (× 100)

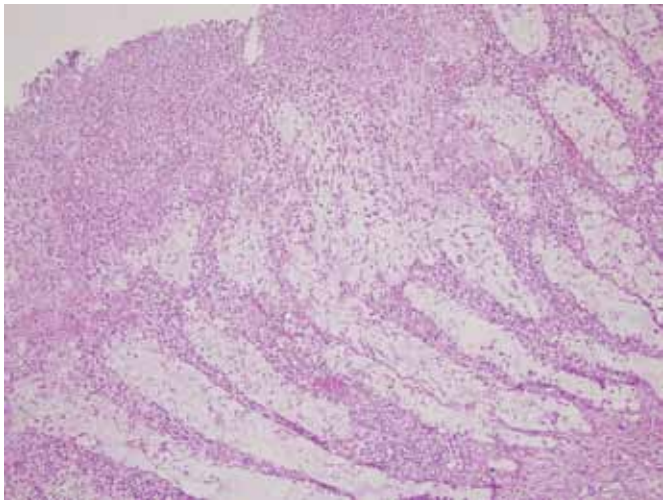


Рис. 6. Псевдомембранозный колит (фрагмент предыдущего микропрепарата), окраска гематоксилином и эозином (× 200)

происходит формирование псевдомембран, представляющих собой пленки фибрина, некротического детрита, слизи, клеток воспалительного инфильтрата, колоний микроорганизмов. При полном структурном некрозе слизистой оболочки сохраняются единичные крипты, покрытые псевдомембраной, «врастающей» в подлежащие слои слизистой оболочки. Крипты под псевдомембраной резко дилатированы, в просвете фибрин со слизью и десквамированным эпителием, образующий на поверхности так называемые «фибриновые шапочки». Просвет крипт расширен за счет закупорки их пленкой фибрина (рис. 5, 6). Собственная пластинка отечная, инфильтрирована лейкоцитами, лимфоидными клетками, плазматическими клетками. В подслизистом слое воспалительные изменения выражены значительно меньше. При отторжении поврежденной слизистой с псевдомембранами формируются язвы. При выздоровлении отмечаются признаки регенерации эпителия с восстановлением слизистой оболочки из сохранившихся крипт [1, 5, 6].

A. Price и D. Devis (1977) предложили выделять три типа микроскопических изменений при ПМК. При I типе между криптами развиваются мелкие эрозии, имеются очаговые наложения фибрина со слизью, небольшие лейкоцитарные скопления. II тип характеризуется образованием бляшковидных наложений фибрина на слизистой оболочке, некроз эпителия верхних отделов крипт, покрытых слоем фибрина с лейкоцитами. Просвет крипт расширен вследствие закупорки их пленками фибрина, но эпителий нижних отделов крипт сохранен. При III типе поражения отмечаются крупные бляшки в участках некроза слизистой оболочки с единичными сохранившимися участками донных отделов крипт [1, 5].

Одним из проявлений антибиотикоассоциированных осложнений является развитие бактериальной суперинфекции, в том числе генерализованной ее формы. В нашем исследовании констатировано четверо умерших с генерализованной анаэробной инфекцией. Распределение по годам выявило тенденцию к увеличению частоты встречаемости данной патологии: в 2013 г. таких случаев не было, в 2014 г. – один случай (0,25%), в 2015 г. – четыре случая (1,1%), что является неблагоприятным фактором. При морфологическом исследовании в этих случаях в различных органах выявляли пиемические очажки с обильными скоплениями анаэробной бациллярной флоры, причем кишечник был вовлечен в патологический процесс во всех случаях (рис. 7).

Кроме того, интенсивное применение антибактериальных препаратов может спровоцировать массивный рост грибковой

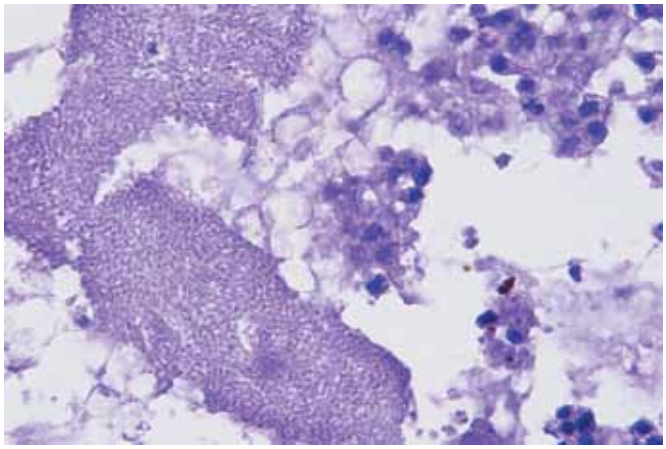


Рис. 7. Пиемический очажок со скоплениями анаэробной бациллярной флоры; микропрепарат, окраска гематоксилином и эозином (× 1000)

Рис. 8. Микотический колит с множественными эрозиями и язвами; нефиксированный макропрепарат

Рис. 9. Большая микотическая язва кишечника; нефиксированный макропрепарат

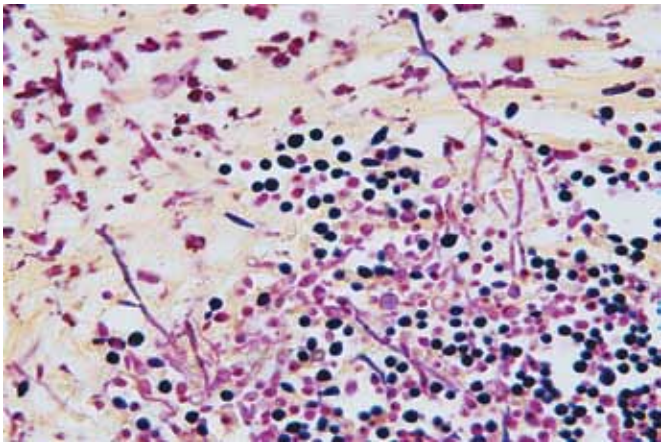


Рис. 10. Микотический колит. Мицелий и споры гриба, молодые и старые формы (грамположительные – фиолетовые, грамотрицательные – красноватые); микропрепарат, окраска по Броун-Хоппсу (× 400)

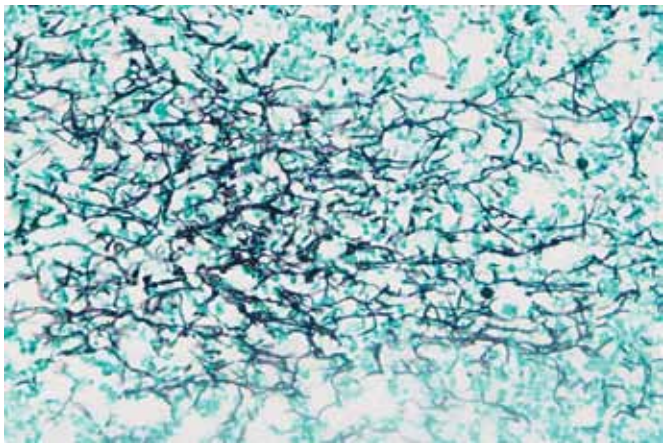


Рис. 11. Микотический колит; микропрепарат, окраска по Грокотту (× 400)

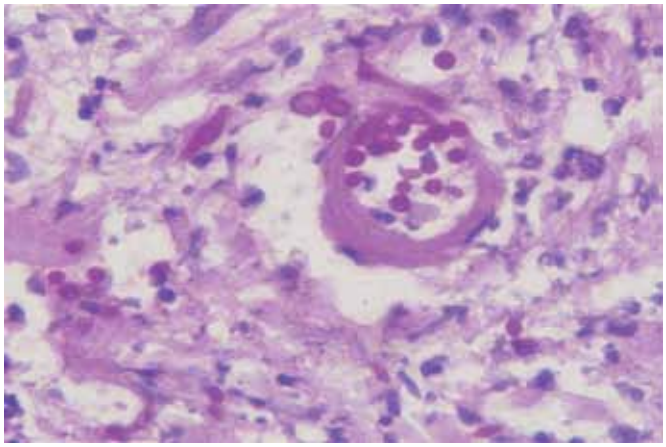


Рис. 12. Инвазивный микоз. Структуры гриба в стенке и просвете сосуда стенки кишки; микропрепарат, положительная ШИК-реакция (структуры гриба окрашены в малиновый цвет) (× 400)

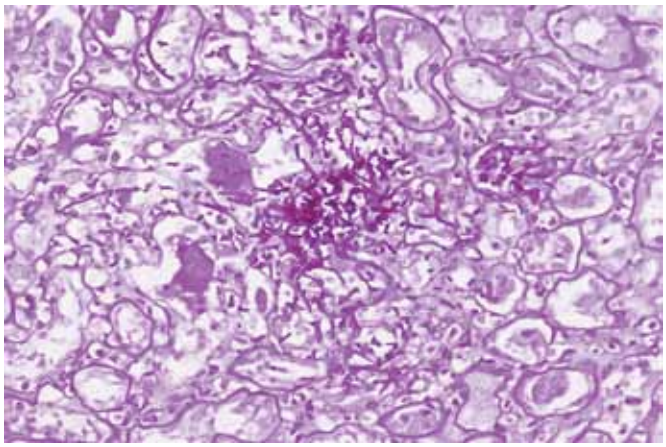


Рис. 13. Микотический очажок в почке при генерализации процесса; микропрепарат, ШИК-реакция (× 400)

флоры и присоединение микотического колита (рис. 8, 9, 10, 11), а также инвазию грибов в сосудистое русло (рис. 12) с развитием генерализованного микотического процесса (рис. 13). В секционных исследованиях по данным прозектуры нашего учреждения с 2013-го по 2015 г. отмечено увеличение количества случаев генерализованных микозов: 5, 10 и 14 случаев, соответственно. Эта тенденция прослеживается и в процентном отношении данной патологии к общему количеству вскрытий (1,2% – в 2013 г., 2,5% – в 2014 г., 3,9% – в 2015 г.).

В исследуемом материале в трех случаях констатировано сочетанное поражение кишечника: в биопсийном материале от пациентов с ВИЧ-инфекцией в одном из случаев выявлено сочетание псевдомембранозного колита и инфильтративного туберкулеза кишечника, в биоптатах от другого больного выявили как признаки псевдомембранозного колита, так и цитомегаловирусной инфекции, подтвержденной иммуногистохимическим методом исследования, и туберкулезного поражения кишки. В секционном материале диагностирован один случай сочетания микотического колита с одновременным визуальным выявлением анаэробной микрофлоры в слизистой оболочке толстой кишки.

В большинстве случаев у пациентов пожилого возраста, особенно при наличии сердечной патологии, длительная и упорная диарея у больных ПМК приводит к тяжелым электролитным расстройствам, гиповолемии, снижению уровня альбуминов в плазме крови, развитию периферических отеков вплоть до анасарки, артериальной гипотензии, нарушениям ритма сердца, тяжелым дистрофическим изменениям кардиомиоцитов при вторичных метаболических поражениях миокарда и развитием в финале острой сердечно-сосудистой недостаточности.

Заключение

Антибиотикоассоциированные поражения кишечника имеют тенденцию к увеличению частоты встречаемости и тяжести поражения, что связано не только с массивной длительной антибактериальной противотуберкулезной терапией и применением все новых и новых мощных антибактериальных препаратов. Большую роль в развитии этой патологии играют и такие факторы, как неосведомленность больных о высоком риске неоправданного и бессистемного неконтролируемого использования современных антибиотиков; недооценка практическими врачами опасности антибактериальной терапии для здоровья и жизни пациентов.

При анализе медицинской документации умерших обращают на себя внимание следующие данные: недостаточный сбор анамнеза и ежедневных жалоб пациента, отсутствие у лечащего врача информации об антибактериальной терапии на предыдущих этапах амбулаторного или стационарного лечения, данных о самостоятельном приеме больным препаратов, недостаточное внимание к появлению у пациентов жалоб со стороны желудочно-кишечного тракта, продолжение антибактериальной терапии при появлении кишечной симптоматики, недоучет возраста и соматического состояния пациента, наличие сердечно-сосудистой патологии, недостаточное восполнение потерянной при диарее жидкости, несвоевременная и неполная коррекция дисэлектролитемических расстройств.

Необходимо обратить внимание на тенденцию к росту бактериальных и микотических суперинфекций с поражением не только кишечника, но и развитием их генерализованных форм.

Литература

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. – М.: Триада-Х., 1998. – 496 с.

2. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова. – М.: МИА, 2003. – 231 с.

3. Ерюхин И.А., Шляпников С.А., Лебедев В.Ф., Иванов Г.А. Псевдомембранозный колит и «кишечный сепсис» – следствие дисбактериоза, вызванного антибиотиками. // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 1997. – Т. 156. – № 2. – С. 108-111.

4. Мишин В.Ю. Медикаментозные осложнения комбинированной химиотерапии туберкулеза легких. – М.: МИА, 2007. – 244 с.

5. Нагасако К. Дифференциальная диагностика заболеваний прямой и ободочной кишки. // [Электронный ресурс] URL: http://colonoscopy.ru/projects/ nagasako/texts/ 18-7.htm/ (Дата обращения 25.04.2016).

6. Патологическая анатомия: национальное руководство /под ред. М.А. Пальцева, Л.В. Кактурского, О.В. Зайратьянца. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 1258 с.

7. Фтизиатрия: национальное руководство /под ред. М.И. Перельмана. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2007. – 512 с.

8. Шульпекова Ю.О. Антибиотикоассоциированная диарея. // Русский медицинский журнал. – 2007. – Т. 15. – № 6. – С. 1-6.

Сведения об авторе

***Зюзя Юлия Рашидовна** – заведующая централизованным патологоанатомическим отделением ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10

Тел. + 7 (499) 268-66-26

e-mail: zuzaju@mail.ru

Межрегиональная общественная организация «Московское общество фтизиатров»

ПРОТОКОЛ
заседания Межрегиональной общественной организации «Московское общество фтизиатров», посвященного теме «Латентная туберкулезная инфекция»

г. Москва **11 июня 2015 г.**

Председатели:

Е.М. Богородская, доктор медицинских наук, президент МОО «Московское общество фтизиатров», директор ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», главный фтизиатр Департамента здравоохранения города Москвы, профессор кафедры фтизиатрии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России;

С.Е. Борисов, доктор медицинских наук, профессор, член правления МОО «Московское общество фтизиатров», заместитель директора по научно-клинической работе ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»;

В.А. Аксенова, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, главный внештатный детский специалист фтизиатр Минздрава России, заведующая отделом туберкулеза у детей и подростков НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России.

Секретарь: А.Г. Дудина, главный специалист отдела делопроизводства ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

Всего зарегистрировалось 162 человека, представляющие медицинские организации: ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» (включая филиалы и структурные подразделения), ГБУЗ «Туберкулезная клиническая больница № 3 им. проф. Г.А. Захарьина ДЗМ», ГБУЗ «Туберкулезная больница им. А.Е. Рабухина ДЗМ», ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», ФГБУ «Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России, кафедру фтизиатрии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», а также ГБУЗ Московской области «Московский областной противотуберкулезный диспансер» и ОБУЗ Ивановской области «Областной противотуберкулезный диспансер им. М.Б. Стоюнина».

Повестка дня заседания:

1. Руководство по ведению пациентов с латентной туберкулезной инфекцией. Всемирная организация здравоохранения. Документ WHO/HTM/2015/01 – *15 мин.*

Докладчик: кандидат медицинских наук М.В. Синицын.

2. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей – *15 мин*.

Докладчик: кандидат медицинских наук Т.А. Севостьянова.

3. Диагностика латентной туберкулезной инфекции в г. Москве. Правовые основы химиопрофилактики туберкулеза у лиц, живущих с ВИЧ, – *30 мин*.

Докладчик: доктор медицинских наук Е.М. Богородская.

4. Фиксированные выступления в прениях: профессор С.Е. Борисов, профессор В.А. Стаханов, профессор К.Г. Пучков, доктор медицинских наук Л.В. Слогоцкая, а также другие члены МОФ, желающие высказаться по вышеуказанным вопросам.

Перед началом заседания президент МОО «Московское общество фтизиатров» Е.М. Богородская представила нового сотрудника ГБУЗ «Туберкулезная больница им. А.Е. Рабухина ДЗМ» – заместителя главного врача по медицинской части, доктора медицинских наук Н.В. Эйсмонт.

Также, в соответствии с решением Ежегодной конференции Московского общества фтизиатров, состоявшейся 22.01.2015, было сделано объявление о начале приема конкурсных научных работ на премии МОФ по трем номинациям:

а) за лучшую работу в области диагностики и лечения туберкулеза – премия имени профессора В.Л. Эйниса;

б) за лучшую работу в области профилактики, эпидемиологии и организации борьбы с туберкулезом – премия имени профессора А.Е. Рабухина;

в) за лучшую работу в области хирургии – премия имени академика М.И. Перельмана.

По пункту 1.

СЛУШАЛИ: Руководство по ведению пациентов с латентной туберкулезной инфекцией.

ВЫСТУПИЛ:

М.В. Синицын, заместитель главного врача по медицинской части (для работы с пациентами сочетанной ВИЧ/туберкулез инфекцией) ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», который ознакомил присутствующих в основными положениями Руководства, представленного в апреле 2015 г. на сайте Всемирной организации здравоохранения (в том числе и на русском языке). В Руководстве дано определение латентной туберкулезной инфекции (ЛТИ), рассмотрены 15 групп риска, представлены основные рекомендации по ведению больных с ЛТИ, в частности, мониторинг иммунного статуса, профилактика, минимизация всех рисков приема противотуберкулезных препаратов, работа с больными и обучение самостоятельной оценке симптоматики побочных явлений. Подчеркивается важность создания национальной программы в каждой конкретной стране с акцентом на необходимость планирования ресурсов и увеличения кадрового потенциала.

Е.М. Богородская прокомментировала данное выступление, добавив, что в России при повсеместной вакцинации БЦЖ только по реакции Манту сложно утверждать о наличии положительного иммунного ответа и необходимо применять параллельно пробу с аллергеном туберкулезным рекомбинантным.

По пункту 2.

СЛУШАЛИ: Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению латентной туберкулезной инфекции у детей.

ВЫСТУПИЛИ:

Т.А. Севостьянова, заведующая детским консультационно-диагностическим отделением Клинико-диагностического центра ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ», заместитель главного внештатного специалиста фтизиатра ДЗМ, главный внештатный детский специалист фтизиатр ДЗМ, изложила основные положения Федеральных клинических рекомендаций, утвержденных Рабочей группой при главном внештатном детском специалисте фтизиатре Минздрава России в марте 2013 г. и на заседании правления Российского общества фтизиатров в январе 2014 г. Современная концепция помощи детскому населению включает выявление групп с наибольшим риском, контролируемое лечение, своевременную диагностику и лечение без остаточных изменений. Внедрение новых технологий – пробы с Диаскинтестом®, квантиферонового теста – привело к формированию новых групп риска и новых подходов к лечению. Даны более точные определения факторов риска, что играет большую роль при назначении превентивной терапии.

Д.Л. Айзиков, заведующий отделением клинической фармакологии ГБУЗ Московской области «Московский областной противотуберкулезный диспансер», задал вопрос о распределении режимов химиопрофилактики у детей, проводился ли анализ по группам.

В.А. Аксенова, главный внештатный детский специалист фтизиатр Минздрава России, заведующая отделом туберкулеза у детей и подростков НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, ответила, что эти вопросы отражены в диссертационном исследовании доктора медицинских наук Л.А. Барышниковой (г. Самара), а также сослалась на данные аналитического обзора по Российской Федерации и статистические данные, публикуемые С.А. Стерликовым (ЦНИИОИЗ).

Из зала был задан вопрос о том, чем проводят массовую иммунодиагностику детей с 8 лет в поликлиниках.

В.А. Аксенова ответила, что препаратом Диаскинтест®, в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями.

Е.М. Богородская дополнила, что необходимо учитывать ряд ведомственных рекомендаций (Минздрава, Департамента здравоохранения города Москвы), Санитарные правила (в соответствии с которыми проба Манту делается всем детям в возрасте до 17 лет). Поскольку эпидемиологическую безопасность регулируют СанПиНы и за их нарушение налагаются штрафы на физических и юридических лиц, а Минздрав и другие ведомства выпускают только рекомендации по лечению, необходимо заниматься вопросом внесения изменений в Санитарные правила.

О.Б. Нечаева, руководитель Федерального центра мониторинга противодействия распространению туберкулеза ФГБУ «Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России, добавила, что директором ЦНИИОИЗ, академиком РАН В.И. Стародубовым направлено письмо на имя Главного санитарного врача и в Минздрав России о внесении изменений в постановление Правительства № 60 и приказ № 951, по сути, отражающее коррекцию тактики у ВИЧ-инфицированных в соответствии с Федеральными рекомендациями.

По пункту 3.

СЛУШАЛИ: Диагностика латентной туберкулезной инфекции в г. Москве. Правовые основы химиопрофилактики туберкулеза у лиц, живущих с ВИЧ.

ВЫСТУПИЛА:

Е.М. Богородская в своем выступлении объединила две ранее доложенные темы, затронув вопросы правового регулирования в этой области. Во вступлении она напомнила, что показатели, достигнутые МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ, лучше, чем в целом по России. Уже неактуально выявление больных с бактериовыделением, мы переходим на новый уровень, начиная заниматься ЛТИ по примеру США. Там ЛТИ давно изучается без использования флюорографии, к которой прибегают в случаях положительных результатов квантиферонового теста. Существующая нормативно-правовая база по ЛТИ включает приказы Минздрава № 855 (2009 г.) и № 951, приказы ДЗМ 2014–2015 гг., содержащие правовое обеспечение применения теста с аллергеном противотуберкулезным рекомбинантным (АТР – Диаскинтестом®) – отечественного, экономически более выгодного. Его использование не требует дополнительного лицензирования, проводится в прививочных кабинетах средним медицинским персоналом, обученным в МНПЦ борьбы с туберкулезом. Курс обучения проходят не реже одного раза в два года. Тест с АТР существенно сужает, концентрирует группы риска.

Докладчик совместно с М.В. Синицыным рассмотрела правовые основы профилактики туберкулеза у ВИЧ-инфицированных, в связи с которыми в настоящее время существует ряд не до конца решенных проблем. ВИЧ-инфицированные пациенты, как и больные туберкулезом, имеют право на бесплатное лечение и должны находиться под диспансерным наблюдением в уполномоченном учреждении, обеспечивающем их обследование и профилактику, проведение антиретровирусной терапии, появляясь для контроля один раз в 6 мес. (в отличие от туберкулезных больных такое наблюдение может осуществлять федеральное учреждение). Лечение они проходят на добровольной основе, в отличие от больных туберкулезом, которые при злостном уклонении могут подвергаться судебному преследованию. В соответствии с СанПиН 2011 г. о профилактике ВИЧ-инфекции, представление сведений о диагнозе может осуществляться только в случаях, предусмотренных законодательством, при соблюдении принципа анонимности или письменном согласии на передачу информации, при предотвращении угрозы распространения. Специализированные организации обеспечивают химиопрофилактику всем ВИЧ-инфицированным при уверенном исключении активного туберкулеза. Однако слово «обеспечивать» не является синонимом слова «проводить». Не решены вопросы о том, кто должен проводить химиопрофилактику – фтизиатр или инфекционист; и где (на базе Центра СПИД или противотуберкулезного диспансера); всем 100% ВИЧ-инфицированным или только определенной их части (принимая во внимание наличие противопоказаний); на платной или бесплатной основе (в ПТД противотуберкулезные препараты выдают бесплатно всем состоящим на диспансерном учете); кто должен закупать эти препараты.

Ряд ответов напрашивается сам собой: проводит химиопрофилактику сертифицированный фтизиатр, способный квалифицированно оценить показания и противопоказания, исключить локальный туберкулез; в организации, имеющей лицензию по фтизиатрии и право на диспансерное наблюдение. ПТД в свою очередь должен гарантировать, что при его посещении больной не заразится туберкулезом. Другие организации, например, федеральные институты, не осуществляют диспансерное наблюдение, значит, химиопрофилактика может проводиться ими только на платной основе. Плата за лечение в свою очередь поднимает вопрос приверженности к лечению, так как до 50% больных до аптеки так и не доберется. Химиопрофилактику можно провести только тем ВИЧ-инфицированным, кто добровольно обратился в Центр СПИД и получил направление к фтизиатру, таким образом, далеко не все, кому показана профилактика, в реальности ее получат.

В приказе Минздрава России № 109 отсутствует группа риска «ВИЧ-инфицированные», поэтому возникает вопрос, как их поставить на учет для получения противотуберкулезных препаратов. Благодаря инициативе главного внештатного детского специалиста фтизиатра Минздрава России В.А. Аксеновой в приказе № 855 есть формулировка о лицах с неуточненной активностью процесса, впервые инфицированных детях и подростках с нарастанием гиперергической реакции. Теоретически возможно также использовать нулевую группу. По решению врачебной комиссии у больных с иммунодефицитными состояниями проба с АТР может быть отрицательной и все больные с количеством клеток $CD4^+$ менее 350 в 1 мкл могут быть отнесены к лицам с ЛТИ, что дает возможность их помещения под диспансерное наблюдение и, следовательно, бесплатной химиопрофилактики. В данной группе учет не может продолжаться долго, но для химиопрофилактики срок будет достаточным. При проведении обследования и химиопрофилактики на базе ПТД должно быть обеспечено полное разобщение пациентов с ВИЧ-инфекцией и больных туберкулезом, выделен отдельный вход. Врач-фтизиатр должен дважды в год проводить скрининг ЛТИ при помощи реакции Манту или пробы с АТР, обследовать лиц с подозрительными симптомами. Все ВИЧ-инфицированные с положительными пробами должны быть взяты на учет в нулевую группу для исключения локальной формы туберкулеза. Финансирование должно осуществляться из средств субъекта Российской Федерации. Также должна быть организована работа в кабинете фтизиатра (штатного сотрудника либо ПТД, либо самого Центра) на базе Центра СПИД. Если больной не желает добровольно становиться на учет на амбулаторном этапе, то дальнейшее лечение должно проходить либо за счет средств больного или организации/программы для ВИЧ-инфицированных, либо бесплатно – в стационаре Центра СПИД.

По пункту 4.

СЛУШАЛИ: Фиксированные выступления в прениях.

ВЫСТУПИЛИ:

О.Б. Нечаева напомнила о прошедшем в г. Воронеже VIII съезде Российского общества фтизиатров и заседании Профильной комиссии по фтизиатрии, где высказывались соображения в пользу сохранения нулевой группы, о том, что отдельных групп учета по микобактериозу, саркоидозу не будет. В готовящиеся методические рекомендации внесена корректировка по ВИЧ-инфицированным: больным с количеством клеток $CD4^+$ менее 350 в 1 мкл (а это около 15% всех состоящих на учете) один раз в два года назначается химиопрофилактика изониазидом (6 мес.) или изониазидом и рифампицином (3–4 мес.). Термины определяли, исходя из МКБ-10. Также были упомянуты различия в подходах к профилактике, диагностике и лечению в разных субъектах Российской Федерации.

К.Г. Пучков, заместитель главного врача по педиатрии ГБУЗ «МНПЦ центр борьбы с туберкулезом ДЗМ», прокомментировал, что в настоящее время происходят большие перемены, а ранее при огромной группе риска однозначная трактовка туберкулинодиагностики была некорректна. Однако необходимо учитывать, что при пробе с АТР у детей результат запаздывает. Он поддержал обсуждаемые Федеральные клинические рекомендации, действие которых можно было бы еще усилить при проведении отдельных исследований по ряду территорий. Был высказан ряд замечаний по формулировкам, перешедшим из более ранних рекомендаций и нуждающимся в редакционной правке, и предложено фтизиатрическому сообществу продолжить анализ рекомендаций в рабочем порядке.

В.А. Стаханов, заведующий кафедрой фтизиатрии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России»,поблагодарил за приглашение на заседание со столь актуальной тематикой. Он выразил свое согласие с сомнением К.Г. Пучкова в достоверности данных ВОЗ по массовой туберкулинодиагностике (в связи с возможным наличием ложноположительных результатов). С другой стороны, появление квантиферонового теста или пробы с АТР не может стать панацеей. К широкому внедрению пробы с АТР в общей лечебной сети следует относиться с осторожностью, чтобы не дискредитировать метод, зная, как иногда поставлены работа и ведение отчетности в учреждениях общей лечебной сети. По мнению В.А. Стаханова, следовало бы углубленно изучать отдаленные результаты (5–10 лет) на базе противотуберкулезных учреждений. Он также поддержал позицию О.Б. Нечаевой о том, что доля ВИЧ-инфицированных, кому показаны химиопрофилактика и превентивное лечение, должна быть невелика и назначать их надо очень осторожно. Применение изониазида как единственного препарата для химиопрофилактики может спровоцировать в будущем тотальную устойчивость среди всего населения. Можно достигать максимального результата в рамках имеющихся приказов, делая акцент на увеличение выявления, а не на лечение. Сославшись на диссертацию Н.В. Ставицкой, он также упомянул генетическое картирование как дело будущего, но надо смотреть в сторону большей индивидуализации подходов.

Н.И. Клевно, главный внештатный детский специалист фтизиатр ЦФО, ведущий научный сотрудник отдела туберкулеза у детей и подростков НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, как один из составителей рекомендаций высказала свое мнение по тематике заседания: клинические рекомендации по ЛТИ размещались на сайте РОФ, где проходило их обсуждение, поступавшие предложения рассматривались и учитывались. На смену существовавшему ранее множеству нормативных документов пришли четкие однозначные рекомендации, их можно продолжать совершенствовать и при необходимости ежегодно редактировать.

Е.М. Богородская подвела итог заседанию, отметив, что и проба Манту, и проба с АТР дают информацию о наличии ЛТИ (результаты пробы с АТР запаздывают, но показывают наличие активно размножающихся МБТ). Федеральные клинические рекомендации нужно знать в числе прочих профильных нормативных документов. Предложено по инициативе МОФ на портале *In-tub.ru* – первом специализированном сайте для фтизиатров и специалистов в области других социально значимых заболеваний, в режиме реального времени разместить тесты по нормативным документам, в том числе Федеральным рекомендациям. Аттестационной комиссии предлагается принимать во внимание результаты этого тестирования при установке высшей квалификационной категории.

Председатели: ***Е.М. Богородская***
С.Е. Борисов
О.Н. Зубань
Секретарь: ***А.Г. Дудина***

НАШИ ПОЗДРАВЛЕНИЯ!

В январе 2016 года члену редакционной коллегии нашего журнала, известному российскому фтизиатру и торакальному хирургу, большому другу московских фтизиатров Алексею Владимировичу Елькину исполнилось 55 лет!

Алексей Владимирович окончил в 1984 году Первый Ленинградский медицинский институт им. акад. И.П. Павлова и в том же году был принят на работу в Ленинградский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, где произошло его становление как врача, научного сотрудника и преподавателя. Он прошел путь от интерна и научного сотрудника до заместителя директора института по научной работе (в 2001–2011 годах) и заведующего кафедрой.

В 1993 году он защитил кандидатскую, а в 2000 году – докторскую диссертацию по специальностям 14.00.26 «Фтизиатрия» и 14.00.27 «Хирургия», в 2006 году получил звание профессора.

Профессор А.В. Елькин – ведущий специалист России в области хирургии туберкулеза легких, под его научным руководством и при его непосредственном участии в тесном сотрудничестве со специалистами в разных областях (биохимии, морфологии, иммунологии, микробиологии) изучаются фундаментальные и прикладные аспекты туберкулеза в современных условиях.

А.В. Елькин является автором более 200 научных работ, четырех монографий, посвященных различным аспектам хирургии туберкулеза, соавтором ряда нормативных документов, регламентирующих оказание помощи больным туберкулезом. Материалы проведенных исследований были широко представлены на научно-практических мероприятиях, в числе которых российские и международные съезды фтизиатров; национальные конгрессы по болезням органов дыхания; всероссийские съезды анестезиологов и реаниматологов, международные конференции хирургов.

С 2011 года А.В. Елькин – заведующий кафедрой фтизиопульмонологии и торакальной хирургии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова.

А.В. Елькин имеет богатый опыт врача-клинициста и организатора здравоохранения, являлся заместителем директора института по лечебной работе, организовывал и длительное время возглавлял дифференциально-диагностическую пульмонологическую комиссию в Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии, в настоящее время возглавляет дифференциально-диагностическую комиссию на базе Санкт-Петербургского городского противотуберкулезного диспансера. При его непосредственном участии неоднократно организовывались региональные и всероссийские научные конференции. Алексей Владимирович – врач высшей квалификационной категории по специальности «Хирургия», имеет сертификаты специалиста по фтизиатрии и хирургии, проводит показательные операции в России и странах СНГ.

Награжден почетной грамотой Министерства здравоохранения Российской Федерации и нагрудным знаком «Отличник здравоохранения».

В течение многих лет А.В. Елькина и московских фтизиатров связывают самые тесные профессиональные и человеческие отношения. Мы высоко ценим профессионализм и эрудицию Алексея Владимировича, его спокойный и доброжелательный характер, высокую человеческую порядочность и преданность нашей непростой специальности.

Надеемся, что в течение еще многих лет мы будем работать рука об руку, и желаем Алексею Владимировичу здоровья, творческих успехов и благополучия ему самому и всем его близким.

Коллектив ГБУЗ «Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»
Правление МОО «Московское общество фтизиатров»
Редакционная коллегия журнала
«Туберкулез и социально значимые заболевания»

Межрегиональная общественная организация
«Московское общество фтизиатров»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10, стр. 1
тел. +7 (916) 972-37-76
e-mail: mof_2013@mail.ru
сайт: www.m-o-f.ru, www.mosphtiziatr.ru

Заявление
для вступающих в члены Общества

1. Фамилия _____ **Имя** _____ **Отчество** _____

Дата рождения _____

2. Название учреждения _____

_____

Подразделение: _____

3. Служебный адрес:
Почтовый индекс ☐ Субъект РФ _____

Город _____

Улица _____ дом _____ корпус _____

Телефон: код города (_____) телефон _____ факс _____

E-mail _____

4. Должность:
Директор ☐ Главный врач ☐ Главный специалист по фтизиатрии ☐
Зав. кафедрой ☐ Доцент ☐ Научный сотрудник ☐ Зав. отделением ☐
Врач ☐ Аспирант ☐ Клинический ординатор ☐ Прочее _____ (указать)

5. Ученая степень _____ (указать)

6. Звание:
Академик ☐ Член-корр. ☐ Профессор ☐ Доцент ☐ Другое _____ Нет звания ☐

7. Домашний адрес:
Почтовый индекс ☐ Субъект РФ _____

Город _____

Улица _____ дом _____ корпус _____ квартира _____

Телефон: код города (_____) телефон _____ мобильный _____

8. Специализация:
Фтизиатрия ☐ Травматология и ортопедия ☐ Офтальмология ☐
Педиатрия ☐ Организация здравоохранения ☐ Анестезиология ☐
Хирургия ☐ Функциональная диагностика ☐ Пульмонология ☐
Акушерство и гинекология ☐ Урология ☐ Экономика ☐ Юриспруденция ☐

Другое _____ (указать)

9. Область Ваших специальных интересов _____

_____

Настоящим выражаю согласие на обработку персональных данных.

«_____» _____ 20____ г. Подпись _____

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЬИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ЖУРНАЛА «ТУБЕРКУЛЁЗ И СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ»

Редакция просит авторов при подготовке статьи для размещения в журнале «Туберкулез и социально значимые заболевания» соблюдать следующие правила:

1. Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором выполнена работа.

2. Статья должна быть на русском языке, напечатана через 2 интервала с шириной полей 2,5 см, без переносов. В редакцию необходимо присылать 2 экземпляра (в печатном и электронном виде).

3. Размер оригинальных статей, включая рисунки, литературу, резюме и ключевые слова, не должен превышать 12 с., в статье не должно быть более 5 авторов. Размер обзора литературы не должен превышать 15 с.

4. В выходных данных указываются:

а) название работы;

б) инициалы и фамилии авторов;

в) название учреждения и подразделения (института, филиала, кафедры, отдела, лаборатории), в котором выполнена работа;

г) город;

д) страна.

5. Заглавие статьи должно быть сформулировано возможно кратко, но без сокращений.

6. Согласно новым требованиям ВАК для публикации в журнале необходимо представлять на отдельном листе сведения о каждом авторе:

1) фамилия, имя, отчество;

2) должность;

3) полный почтовый служебный адрес и e-mail;

4) номер служебного телефона и факса.

7. Статья должна быть подписана всеми авторами. Обязательно нужно указывать фамилию, имя, отчество автора, с которым редакция будет вести переписку, его адрес (с шестизначным почтовым индексом), телефон, факс и e-mail.

8. Материал статьи (кроме лекций, обзоров, кратких сообщений) должен быть изложен в определенной последовательности с выделением разделов:

а) введение, в котором кратко освещены содержание вопроса (возможно, со ссылкой на литературные источники), цель и задачи исследования;

б) материалы и методы. Излагать методики исследования следует без подробного описания, если они общеприняты (со ссылкой на автора), но с указанием модификаций, если они введены автором, необходимо точно описать применяемые воздействия: их вид, дозы, температуру, силу тока, длительность и т. д., должны быть указаны все элементы лечебного комплекса;

в) результаты и обсуждение (необходима статистическая обработка результатов);

г) выводы или заключение;

д) список литературы;

е) резюме, ключевые слова.

9. Таблицы печатаются на отдельных листах, они должны быть компактными, иметь название, их «шапка» должна соответствовать содержанию граф. Все цифры в таблицах должны соответствовать цифрам в тексте, обязательна их статистическая обработка. При использовании в таблице сокращений, не упомянутых в статье, или символов (*, ** и т. п.) смысл их объясняется в примечании под таблицей.

10. Математические и химические формулы должны быть четко вписаны с указанием на полях букв (русских, латинских, греческих) алфавита, а также прописных и строчных букв, показателей степени, индексов, букв или цифр, когда это неясно из шрифта.

11. В тексте не допускаются сокращения, кроме единиц измерения, которые следует давать только в соответствии с системой единиц СИ (кг, г, м, см, мм, л, мл, В, Вт, МА, Ки и т. п.)

12. К статье может быть приложено необходимое для понимания текста количество рисунков с подрисуночными подписями (сюда относятся и графики). В тексте статьи на каждый рисунок должна быть ссылка, продублированная на полях.

12.1. Фотографии, рисунки (графики), представленные в электронном виде, должны быть в файлах с расширением TIFF, BMP, JPEG, PPT, AI, EPS. Размер иллюстраций должен быть максимально большим: для одиночных портретов и т.п. – не менее 700 x 1000 пикс (6 x 9 см на 300dpi); для групповых портретов и иллюстраций с мелкими деталями – не менее 1000 x 1300 пикс (9 x 12 см на 300dpi). Микрофотографии и фотографии рентгенограмм должны быть размером не менее 700 x 1000 пикселей (6 x 9 см на 300dpi). **НЕ ДОПУСКАЕТСЯ** использование любых форматов программы Corel Draw – cdr, cdx и т.д. (необходимо пересохранять в форматы TIFF, JPEG, AI, EPS и т.п.)

Все указанное в п.12.1 относится и к иллюстрациям, интегрированным в документы Word, Excel.

13. Список литературы прилагается к статье на отдельном листе. Библиографические ссылки в тексте статьи должны даваться номерами в квадратных скобках в соответствии со списком литературы, который формируется в алфавитном порядке: фамилия и инициалы автора (сначала отечественные, затем зарубежные авторы, в транскрипции оригинала), далее:

• для статей в журналах: название статьи, название журнала, год, том, выпуск, страница;

• для книг и сборников: название (по титульному листу), место и год издания;

• для диссертаций (авторефератов): название диссертации (автореферата) дис. ... д-ра (канд.) мед. (биол.) наук, город, год.

14. К статье (исключая лекции, обзоры и краткие сообщения) должно быть приложено на отдельном листе резюме на русском (до 15 строк) и английском языках. Оформление резюме: инициалы, фамилия автора, название статьи, текст, ключевые слова.

15. Статья должна быть тщательно выверена автором.

16. Направление в редакцию работ, уже опубликованных или отправленных в другие журналы, не допускается.

17. Редакция оставляет за собой право сокращать и редактировать присланные статьи.

18. Статьи, получившие отрицательную рецензию, в журнале не публикуются и авторам не возвращаются.

19. Статьи, оформленные с нарушением вышеизложенных правил, публиковаться не будут.

20. Статьи (распечатка + CD-диск) следует направлять почтой по адресу:

107014, г. Москва, улица Стромынка, д. 10,
редакция журнала
«Туберкулёз и социально значимые заболевания»

или по электронной почте: *mostubjournal@mail.ru.*