

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

Б.И. Вишнеvский, 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 ($KOE \geq 100$) 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, со-

держимое 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, пирразинамиду, 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.

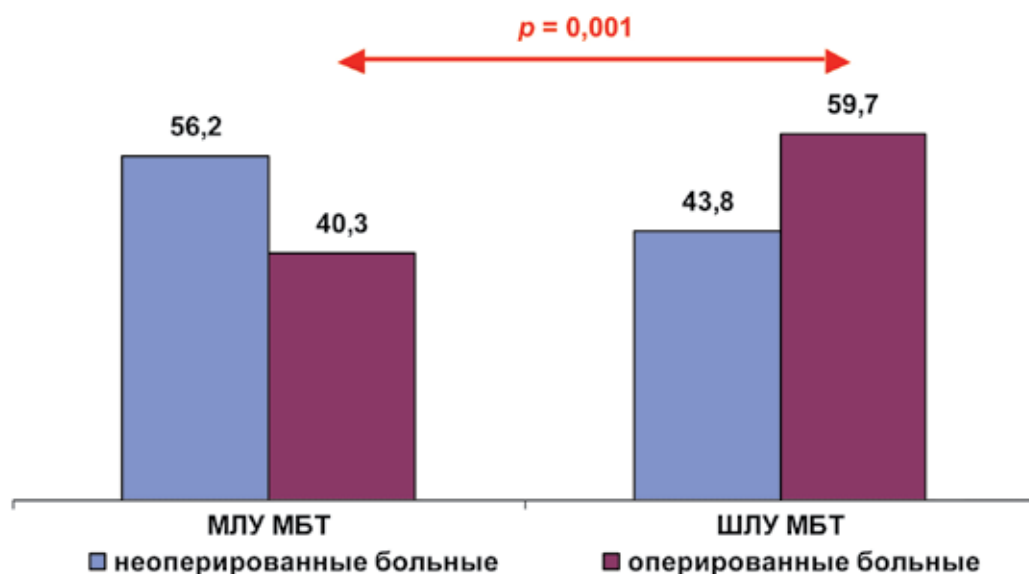


Рис. 1. Частота МЛУ и ШЛУ у МБТ, выделенных из респираторного материала оперированных и неоперированных больных (%)

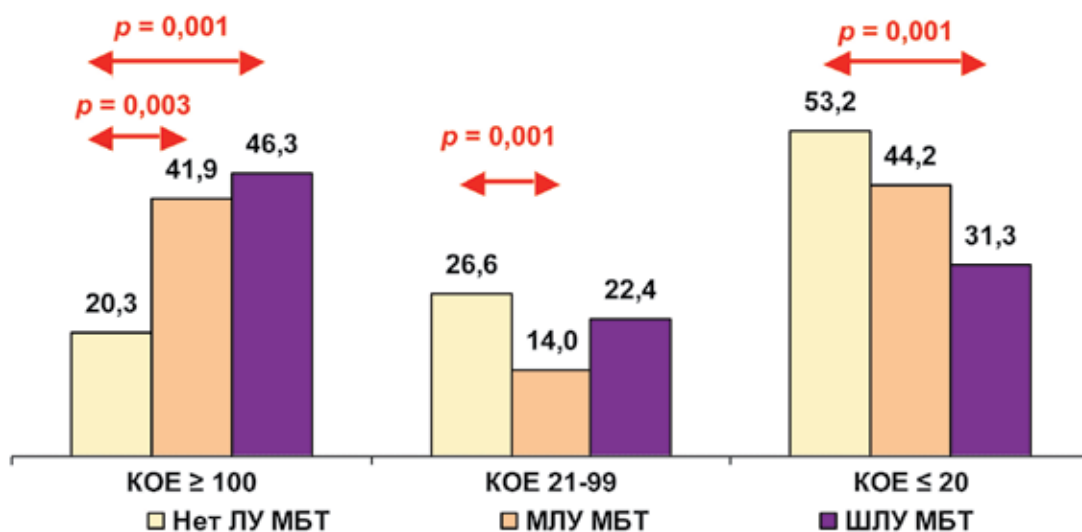


Рис. 2. Массивность бактериовыделения из респираторного материала неоперированных больных при сохраненной лекарственной чувствительности, МЛУ и ШЛУ МБТ (%)

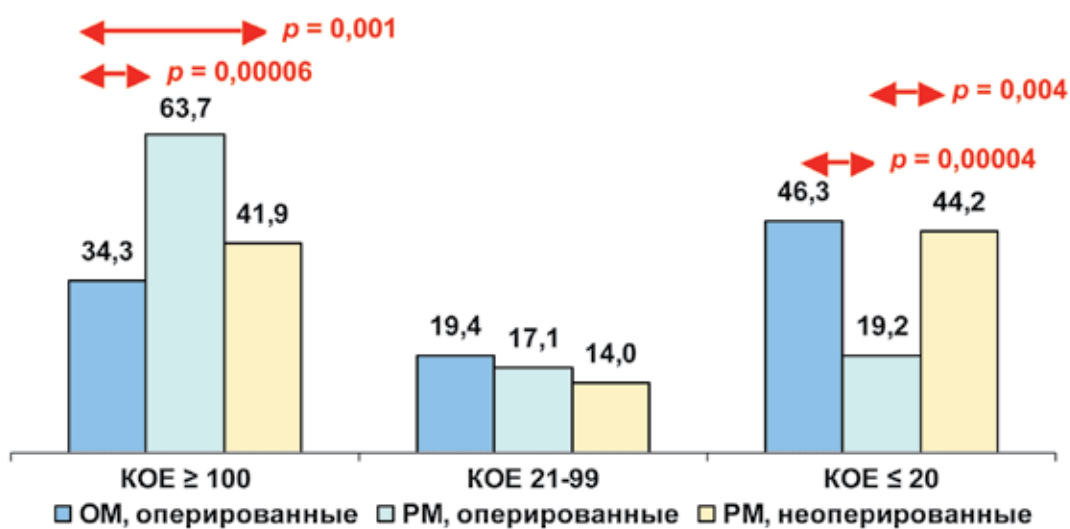


Рис. 3. Бактериальная нагрузка диагностического материала оперированных и неоперированных больных при МЛУ МБТ (ОМ – операционный материал, РМ – респираторный материал) (%)

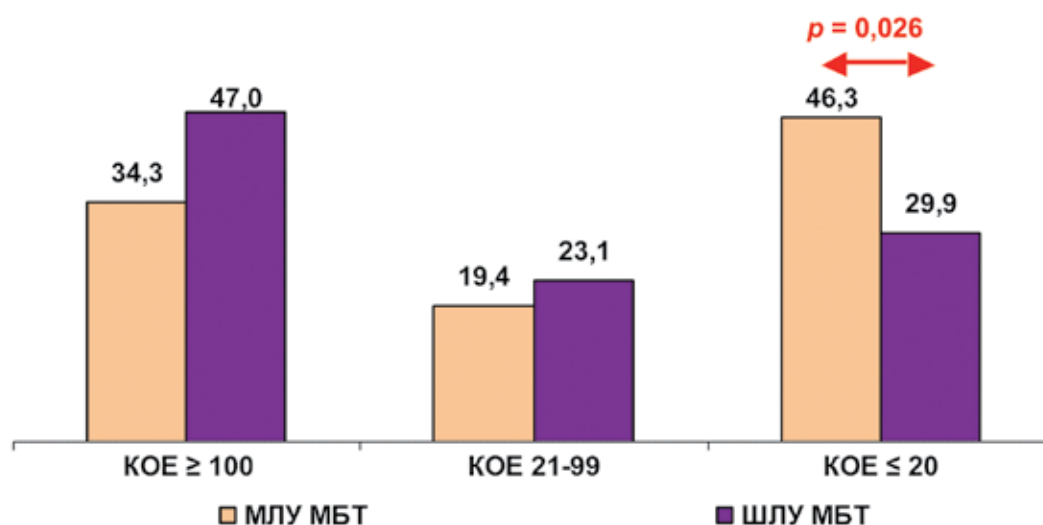


Рис. 4. Бактериальная нагрузка операционного материала больных при ШЛУ и МЛУ МБТ (%)

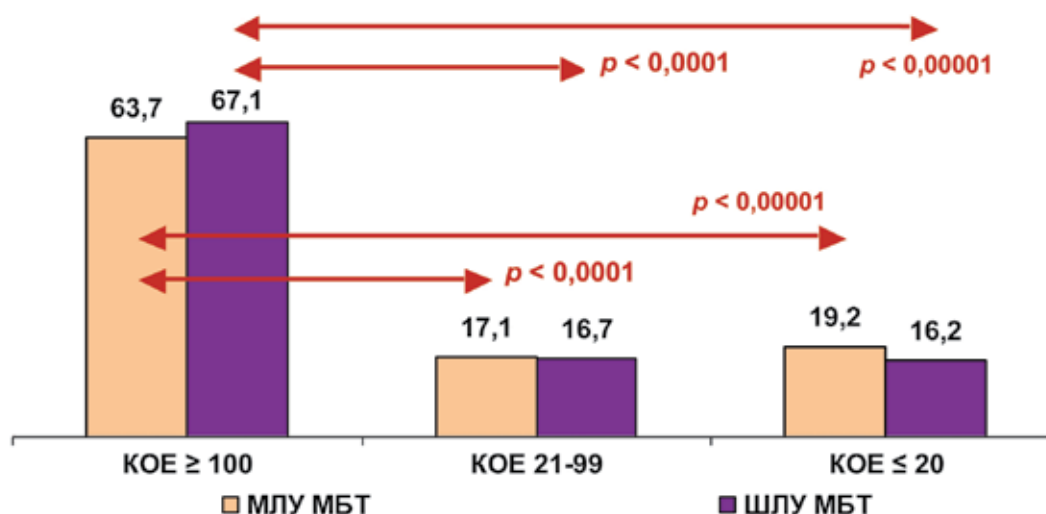


Рис. 5. Массивность бактериовыделения из респираторного материала оперированных больных при МЛУ и ШЛУ МБТ (%)

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 преобладали 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 экониша 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 фтизиобактери-

ологии 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 внегочном 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., Vigel 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