

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

А.И. Исакова, Е.Ю. Носова, Ю.Ю. Гармаш, К.А. Богданов, В.Н. Трусов, С.Г. Сафонова
ГБУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Департамента здравоохранения города Москвы»

MODERN MOLECULAR-GENETIC METHODS FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSTIC BY SURGERY SAMPLES

A.I. Isakova, E.Yu. Nosova, Yu. Yu. Garmash, K.A. Bogdanov, V.N. Trusov, S.G. Safonova

Отсутствие данных о лекарственной чувствительности (ЛЧ) *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам препятствует назначению адекватной терапии, в том числе в послеоперационном периоде. Комплексный подход к лабораторному исследованию операционного материала с использованием молекулярных технологий и микробиологических методов позволяет получить более полную информацию о свойствах возбудителя. Исследование 123 образцов операционного диагностического материала показало, что у пациентов с туберкулезом легких частота обнаружения ДНК МБТ в образцах превосходила частоту получения культуры МБТ в 8,5 раза. Сравнение полученных данных с ретроспективным анализом результатов выявления и определения ЛЧ МБТ в респираторном материале до операции показало, что с помощью молекулярно-генетических методов в операционном материале впервые удалось подтвердить этиологическую природу туберкулеза у 42,3% пациентов, из которых в 92,3% была определена ЛЧ МБТ к химиопрепаратам с помощью «ТБ-ТЕСТ». Кроме этого, в связи с трудностью выделения культур МБТ из операционного материала показана возможность использования этого диагностического материала для проведения эпидемиологических исследований.

Ключевые слова: диагностика туберкулеза, операционный материал, микробиологические методы, молекулярно-генетические методы

Lack of the data on *M. tuberculosis* (MBT) drug susceptibility delays prescription of the adequate chemotherapy, among others – in postoperative course. The complex of surgical samples testing based on molecular-genetic and microbiological methods provide more comprehensive information on properties of the pathogen. The rate of MBT DNA detection in surgical samples from 123 pulmonary tuberculosis patients 8.5 times exceed the positive culture rate. Retrospective comparison of MBT and drug resistance detection in respiratory samples in preoperative period demonstrate, that by molecular-genetic tests in surgical samples the tuberculosis etiology was primary confirmed in 42.3% patients, among them in 92.3% the drug resistance profile was defined by «TB-TEST». In addition, due to the complicated MBT cultivating from surgical samples, molecular-genetic methods, applicable to that kind of material, can be used in epidemiological studies.

Key words: tuberculosis diagnosis, surgery samples, microbiology, molecular-genetic methods

Введение

Туберкулез в России остается одной из наиболее значимых проблем здравоохранения. В настоящее время отмечено снижение заболеваемости туберкулезом как в большинстве субъектов Российской Федерации, так и в стране в целом. В 2015 г. заболеваемость туберкулезом составила 47,9 на 100 тыс. населения. В Москве она существенно ниже – 28,0 на 100 тыс. населения (территориальный показатель) [5]. Однако, несмотря на снижение заболеваемости, увеличивается доля туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) возбудителя, которая среди впервые выявленных больных, обследованных на лекарственную чувствительность (ЛЧ) микобактерий туберку-

леза (МБТ) к противотуберкулезным препаратам (ПТП) (форма № 7-ТБ), в 2015 г. составила 19,0%. В 2013 и 2014 гг. этот показатель был равен 14,3% и 15,9%, соответственно [5]. Нередко химиотерапия больных туберкулезом сопровождается операционным вмешательством. За 2015 год в противотуберкулезных учреждениях Департамента здравоохранения города Москвы было прооперировано 1944 человека, которым было проведено 2525 операций [5].

Верификация диагноза туберкулеза и определение ЛЧ МБТ к ПТП при диагностических операциях является необходимой составляющей назначения химиотерапии. Отсутствие данных о ЛЧ возбудителя туберкулеза препятствует назначению адекватной терапии, в том числе в послеоперационном периоде,

и, как следствие, может вызвать прогрессирование процесса. Для больных без бактериовыделения с операционным этапом лечения туберкулеза легких исследование операционного материала является единственным способом получения данных о ЛЧ. Кроме этого, известно, что послеоперационные рецидивы у больных туберкулезом с МЛУ МБТ возникают в 2–3 раза чаще, чем при ее отсутствии [2, 3], что требует быстрого определения ЛЧ МБТ к химиопрепаратам. В то же время для пациентов с установленной ЛЧ в дооперационном периоде эффективность лечения во многом будет зависеть от ее определения у МБТ, обнаруженных непосредственно в операционном материале, так как, по данным ряда авторов, возможно несоответствие ЛЧ возбудителя, выделенного из респираторного и операционного материала [4]. Все это указывает на необходимость получения данных о ЛЧ возбудителя в кратчайшие сроки после операции, что повысит эффективность химиотерапии и сократит время пребывания пациента в стационаре.

Для определения ЛЧ МБТ применяют микробиологические (посев на плотные и жидкие питательные среды) и молекулярно-генетические методы (МГМ). Определение ЛЧ культуральным методом является «золотым стандартом». Однако время получения результатов роста МБТ и определения ЛЧ составляет до 10–12 недель. Посев на жидкой среде *Middlebrook 7H9* в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson) значительно сокращает время получения результата.

Молекулярно-генетические методы позволяют в кратчайшие сроки с высокой чувствительностью и специфичностью не только выявить присутствие в образце ДНК МБТ, но и определить спектр мутаций, приводящих к лекарственной устойчивости возбудителя к различным ПТП, что особенно актуально для микобактерий, обладающих пониженным «фитнесом» (метаболические изменения, приводящие к снижению скорости роста или отсутствию способности к воспроизведению). Кроме того, известно, что существует корреляция между наличием определенных мутаций и уровнем устойчивости возбудителя к препаратам [12, 15, 19]. Таким образом, присутствие той или иной мутации можно представить не просто как качественную характеристику, а возможность проведения количественной оценки устойчивости, особенно при отсутствии микробиологических данных в случаях туберкулеза с МЛУ и ШЛУ МБТ, что позволит сориентировать врачей при выборе химиотерапии.

В то же время имеется мало информации о свойствах возбудителя, выделенных непосредственно из очагов туберкулезного поражения легких (резекционный материал). По данным К.В. Белоусовой (2013 г.) молекулярно-генетические методы обладают существенным преимуществом при выявлении МБТ в этом материале. Так, при исследовании операционного материала от пациентов с туберкулезом легких высеваемость

МБТ составила 22,3%, в то время как ДНК МБТ обнаружена в 97,9% [1].

В настоящее время наиболее перспективным среди известных молекулярных тест-систем является принципиально новый набор «ТБ-ТЕСТ» (ООО «Биочип», Россия), позволяющий одновременно выявлять ДНК МБТ и определять расширенный спектр мутаций, связанных с устойчивостью к трем препаратам первого ряда (рифампицину, изониазиду и этамбутолу) и двум группам препаратов резервного ряда (фторхинолонам и аминогликозидам), а также установить генотип штаммов МБТ, наиболее важных в эпидемиологическом плане для Российской Федерации [20].

Таким образом, комплексный подход к лабораторному исследованию операционного материала с использованием современных молекулярных технологий и микробиологических методов позволит получить более полную информацию о свойствах возбудителя.

Цель исследования

Оценить эффективность комплекса молекулярно-генетических и микробиологических методов этиологической диагностики туберкулеза и определения лекарственной устойчивости МБТ при исследовании операционного материала фтизиохирургической торакальной клиники.

Материалы и методы исследования

Пациенты и образцы

В проспективное исследование включены 159 образцов операционного диагностического материала, полученных от 159 пациентов, прооперированных по поводу патологии легких в стационарах МНПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы. Бактериологическое и молекулярно-генетическое исследования выполняли из одной порции осадка обработанного диагностического материала (рис. 1).

Обработка диагностического операционного материала и микробиологическое исследование

Операционный диагностический материал (содержимое каверн, содержимое туберкулем и других образований) предварительно обрабатывали раствором МусоРер, в соответствии с инструкцией фирмы производителя Becton Dickinson [13], с последующим отмыванием и центрифугированием. Обработанный осадок использовали для люминесцентной микроскопии на кислотоустойчивые микроорганизмы (КУМ), а также для посева и последующего определения ЛЧ в жидкой питательной среде *Middlebrook 7H9*, обогащенной ростовой (*MGIT Growth Supplement*) и деконтаминирующей (*MGIT PANTA*) добавками в автоматизированной системе BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson, США) в соответствии с руководством [19].

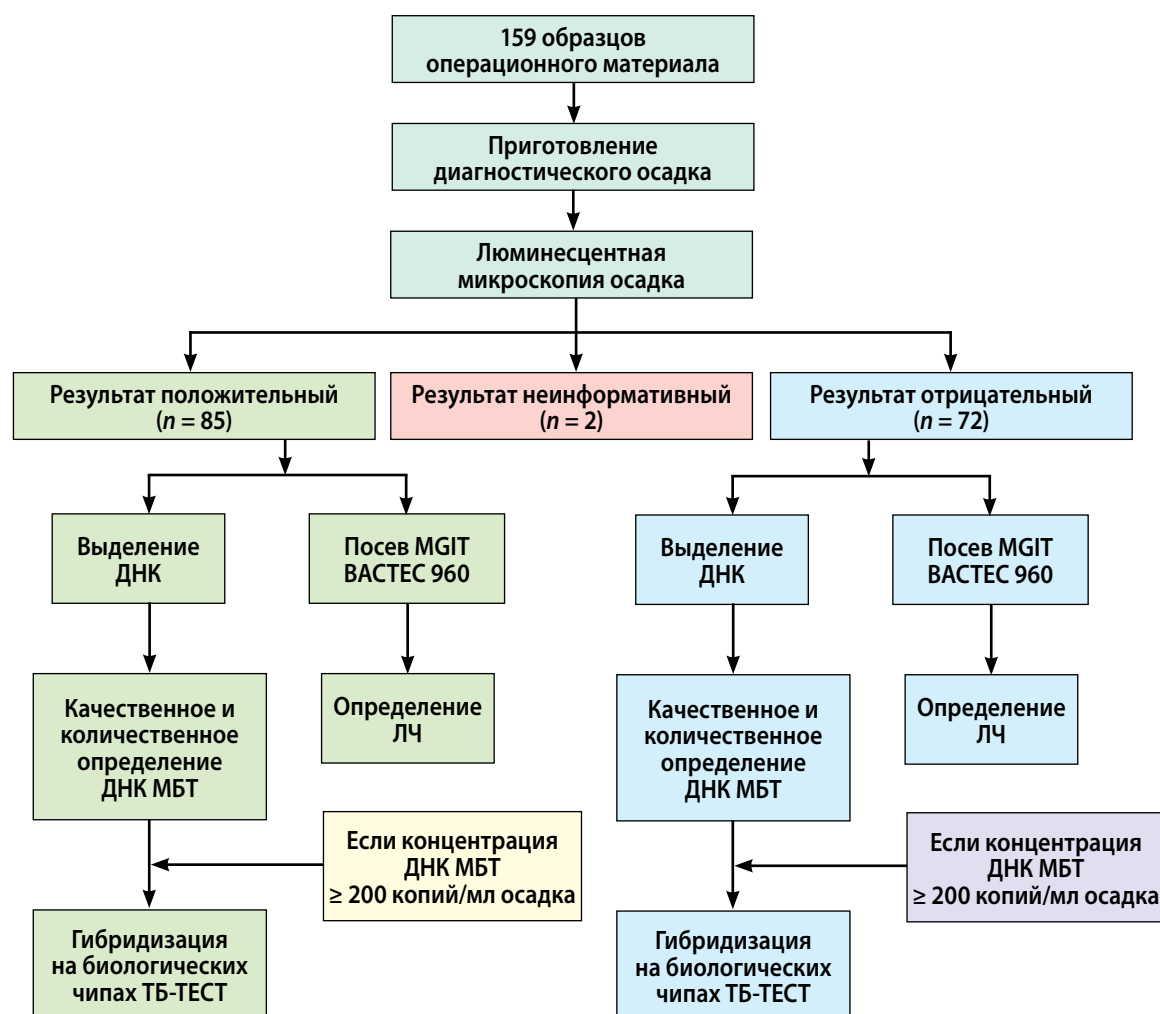


Рис. 1. Порядок проведения исследования

Видовую идентификацию выделенных микобактерий проводили с использованием микробиологических методов: определение скорости и возможности роста при различных температурах, способности к пигментообразованию, морфологии колоний, биохимические тесты (ниациновый, нитратредуктазный, каталазный, рост на среде с натрием салициловокислым).

Молекулярно-генетические исследования

Для молекулярно-генетических исследований использовали порцию осадка в объеме 0,5–1,0 мл деконтаминированного образца. Экстракцию ДНК выполняли на роботизированной станции Freedom EVO (TECAN, Швейцария) с использованием реагентов «М-Сорб» («Синтол», Россия).

Качественное и количественное определение ДНК МБТ проводили с помощью Реал-тайм ПЦР с использованием наборов «АмплиТуб-РВ» («Синтол», Россия).

Для молекулярного определения лекарственной чувствительности с помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ» тестировали образцы, в которых концентрация ДНК МБТ составляла 200 и более копий на 1,0 мл. Порядок проведения исследований представлен на рисунке 1.

Статистическая обработка результатов

Для определения достоверности диагностического теста оценивали его чувствительность (способность теста определять наличие данного заболевания у пациента) и специфичность (способность теста определять отсутствие данного заболевания у пациента). При расчете характеристик методов и доли совпадений результатов вычисляли 95%-ный доверительный интервал (95%ДИ). Сравнение качественных признаков проводили по критерию χ^2 и (внутри одной группы) – по критерию Мак-Нимара (McNemar's test – прим. ред.). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Микроскопическое, культуральное и молекулярно-генетическое исследования операционного диагностического материала

Из 159 образцов диагностического материала два были «неинформативными» для проведения люминесцентной микроскопии, вследствие чего не вошли в исследование.

Из 85 образцов с положительным результатом микроскопии на КУМ в 77 (90,6%, 95%ДИ 82,5–95,2%) была выявлена

Таблица 1. Результаты молекулярно-генетических и микробиологического исследований операционного материала в зависимости от результата микроскопического исследования на КУМ

Результаты микроскопического исследования на КУМ	Обнаружение ДНК МБТ						Выделение культуры микобактерий		
	Амплитуб-РВ			Биочипы («ТБ-ТЕСТ»)			ВАСТЕС™ MGIT™ 960		
	абс.	%	95%ДИ	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Положительный (n = 85)	77	90,6	82,5–95,2	74	87,1	78,3–92,6	12	14,1	8,3–23,1
Отрицательный (n = 72)	17	23,6	15,3–34,6	12	16,7	9,8–26,9	3	4,2	1,4–11,6
ВСЕГО (n = 157)	94	59,9	52,1–67,2	86*	54,8	47,0–62,4	15	9,6	5,9–15,2

* Для исследования отбирали образцы, в которых концентрация ДНК МБТ была ≥ 200 копий на 1 мл диагностического осадка.

ДНК МБТ и в 74 (87,1%, 95%ДИ 78,3–92,6%) установлено достаточное ее количество для определения ЛЧ, а в 12 (14,1%; 95%ДИ 8,3–23,1%) – обнаружен рост микобактерий (табл. 1). Из 12 полученных культур две идентифицированы как НТМБ (*M. xenopi*), в одной пробе обнаружен рост смешанной культуры МБТ и НТМБ (*M. avium complex*), девять культур идентифицированы как МБТ.

Несмотря на то что в 72 образцах операционного материала микроскопическое исследование не показало присутствия КУМ, в 17 из них (23,6%, 95%ДИ 15,3–34,6%) была выявлена ДНК возбудителя. В 12 (16,7%, 95%ДИ 9,8–26,9%) образцах, содержащих 200 и более копий ДНК МБТ в одном миллилитре осадка, была определена ЛЧ к ПТП. В трех образцах был обнаружен рост микобактерий (4,2%, 95%ДИ 1,4–11,6%), в двух случаях идентифицирован рост НТМБ (*M. xenopi* и *M. avium complex*), а в одном – культура идентифицирована как МБТ.

Таким образом, в 85 из 157 образцов (54,1%, 95%ДИ 46,3–61,7%) операционного материала с помощью микроскопии были обнаружены КУМ, в 94 (59,9%, 95%ДИ 52,1–67,2%) образцах с помощью «Амплитуб-РВ» выявлены последовательно, специфичные для *M. tuberculosis complex* (ДНК МБТ), в 86 (54,8%, 95%ДИ 47,0–62,4%) – определена ЛЧ МБТ, и лишь в 15 (9,6%, 95%ДИ 5,9–15,2%) был обнаружен рост микобактерий.

Таким образом, МБТ в операционном материале достоверно чаще выявляется ($p < 0,001$) с помощью Амплитуб-РВ, по сравнению с ВАСТЕС™ MGIT™ 960, и не отличается (различия недостоверные, $p > 0,05$) по частоте выявления в сравнении с люминесцентной микроскопией.

Сопоставление результатов проведенных лабораторных исследований с установленным диагнозом

Согласно сведениям, полученным из отдела эпидемиологического мониторинга МНПЦ борьбы с туберкулезом и вы-

писных эпикризов пациентов, диагноз туберкулеза был установлен у 123 (78,3%) из 157 обследованных лабораторными методами пациентов. Результаты представлены в таблице 2.

С помощью люминесцентной микроскопии в операционном материале КУМ выявлены у 83 (67,5%, 95%ДИ 58,8–75,2%) больных туберкулезом и у двоих (5,9%, 95%ДИ 1,6–19,1%) из 34 пациентов с нетуберкулезными заболеваниями легких. Данный метод позволяет достоверно чаще выявлять КУМ в операционном материале больных туберкулезом ($p < 0,01$).

ДНК МБТ была выявлена только у больных туберкулезом легких – в 94 (76,4%, 95%ДИ 68,2–83,1%) образцах ($p < 0,01$), что говорит о высокой специфичности тестов. В 86 (91,5%, 95%ДИ 84,1–95,6%) из 94 случаев с помощью «ТБ-ТЕСТ» определена лекарственная чувствительность к ПТП.

В то же время рост МБТ в образцах был получен лишь у 11 (8,9%) больных туберкулезом, причем одна культура была идентифицирована как смешанная (МБТ и НТМБ). Достоверных различий результатов культурального исследования с помощью ВАСТЕС™ MGIT™ 960 операционного материала у больных туберкулезом и пациентов с нетуберкулезными заболеваниями легких нет ($p > 0,05$). Это объясняется низкой чувствительностью данного метода при посеве операционного материала на МБТ – 8,9%.

Таким образом, в операционном материале больных туберкулезом ДНК возбудителя удалось выявить в 8,5 раза чаще, чем выделить культуру МБТ ($p < 0,01$).

В литературе имеется мало данных о высеваемости МБТ из резекционного материала легких в жидкой среде *Midlebrook 7H9* в системе ВАСТЕС™ MGIT™ 960. В ряде случаев вместе с резекционным материалом анализировали посевы в ВАСТЕС™ MGIT™ 960 биопсийного материала лимфатических узлов, кожи, печени, селезенки и др., которые объединяли

Таблица 2. Результаты лабораторных исследований в зависимости от установленного диагноза

Диагноз (n = 157)	Микроскопическое исследование (обнаружение КУМ)			ВАСТЕС™ MGIT™ 960 (выделение культуры микобактерий)			Молекулярно-генетическое исследование (обнаружение ДНК МБТ)		
	абс.	%	95%ДИ	абс.	%	95% ДИ	абс.	%	95% ДИ
Туберкулез легких (n = 123)	83	67,5	58,8–75,2	13 (11+2*)	10,6	6,3–17,3	94	76,4	68,2–83,1
Нетуберкулезные заболевания легких (n = 34)	2	5,9	1,6–19,1	2*	5,9	1,6–19,1	–	–	0–10,2

* НТМБ – нетуберкулезные микобактерии.

Таблица 3. Мутации и их сочетания, связанные с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду

Мутации в генах:			Количество образцов (n = 42)
<i>rpoB</i> (устойчивость к рифампицину)	<i>katG</i> (устойчивость к изониазиду)	<i>inhA</i> (устойчивость к изониазиду)	
L511P	–	–	1
–	S315T	–	10
–	–	T15	1
–	S315T	T15	4
S531L	S315T	–	12
S531L	S315T	T15	6
S531L	S315T, I335V	–	3
H526L	S315T	–	1
H526L	S315T	T15	1
D516V	S315T	–	1
D516V	S315T	T15	1
S531W	S315T	–	1

в группу «ткани». Высеваемость возбудителя туберкулеза из такого материала не превышала 7,9–9,5% [11]. Вероятно, это связано с тем, что в неблагоприятных условиях для МБТ (снижение парциального давления кислорода, воздействие факторов иммунитета, условия пониженной кислотности в фагосоме) происходят адаптивные изменения экспрессии генов, которые участвуют в переходе МБТ в «некультивируемое» состояние [6, 16, 18]. Кроме того, по данным ряда авторов, штаммы МБТ, содержащие мутации, приводящие к развитию МЛУ и ШЛУ, характеризуются пониженной способностью роста при отсутствии антибактериальных препаратов [7, 10]. Однако данные выводы не всегда одинаково применимы к клиническим штаммам, полученным от пациентов, и лабораторным, селективным из чувствительных *in vitro*. Так, замена S531L в гене *rpoB*, приводящая к устойчивости к рифампицину, в лабораторных штаммах ассоциирована с пониженным «фитнесом» по отношению к чувствительным штаммам, в то время как в некоторых клинических изолятах снижения «фитнеса» не обнаружено [8]. Таким образом, фенотип МБТ определяется не только мутациями в генах-мишенях действия препаратов, но и «генетическим фоном» и компенсаторными изменениями, возникающими в процессе лечения [8, 9, 14, 17].

Результаты оценки лекарственной чувствительности и определения генетических семейств

Из 11 полученных культур МБТ с помощью микробиологических методов ЛЧ была определена только у 10. В смешанной культуре (МБТ и НТМБ) ЛЧ определить не удалось. Однако в данной культуре с помощью «ТБ-ТЕСТ» выявлены мутации, связанные с развитием пре-ШЛУ МБТ. По данным микробиологического определения ЛЧ к ПТП, у двух пациентов выявлены МБТ с МЛУ, у трех – МБТ с пре-ШЛУ, у трех – МБТ с ШЛУ, у одного пациента – монорезистентность МБТ к изониазиду и еще у одного – МБТ, чувствительные к исследуемым препаратам.

В 86 образцах ДНК с помощью «ТБ-ТЕСТ» определена ЛЧ МБТ к ПТП. Из них у 10 (11,6%) пациентов выявлены МБТ с МЛУ, у 11 (12,8%) – пре-ШЛУ, у пяти (5,8%) – МБТ с ШЛУ, у 15 (17,4%) пациентов – МБТ, монорезистентные к изониазиду, и в одном случае (1,2%) – отмечена устойчивость МБТ к рифампицину. В 44 (51,2%) случаях мутации в анализируемых генах не были обнаружены, т.е. МБТ были чувствительны к пяти препаратам.

Таким образом, определить ЛЧ одновременно с помощью культурального и молекулярно-генетического методов удалось в семи образцах из 10 (результаты совпали). У двух пациентов из 10 в образце диагностического материала было выявлено недостаточное количество ДНК МБТ для определения ЛЧ, и у одного ДНК МБТ не была обнаружена.

Как уже говорилось ранее, в 42 (48,8%) из 86 образцов операционного материала были определены генетические детерминанты лекарственной устойчивости. Из них в 27 (64,3%) образцах выявлены мутации в гене *rpoB*, ответственные за устойчивость к рифампицину. Наиболее распространенная мутация S531L, приводящая к высокому уровню устойчивости к рифампицину [12], присутствовала в 21 (77,8%) образце.

Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду, были обнаружены в 41 из 42 (97,6%) образцов ДНК. Наиболее часто встречающейся заменой была S315T (в гене *katG*), выявленная в 40 (97,6%) образцах. Самое распространенное сочетание мутаций, ответственных за развитие МЛУ МБТ и приводящее к высокому уровню устойчивости к изониазиду и рифампицину, выявленное в 21 образце ДНК, было S531L (в гене *rpoB*) и S315T (в гене *katG*), [12, 19] (табл. 3).

В генах *gyrA* и *gyrB*, участвующих в появлении устойчивости к фторхинолонам, было выявлено пять и две мутации, соответственно. В гене *rrs* мутация a1401g определена в 5 образцах, а в гене *eis* мутации c12t, c14t и g10a выявлены в 9 образцах ДНК МБТ. Варианты мутаций представлены в таблице 4.

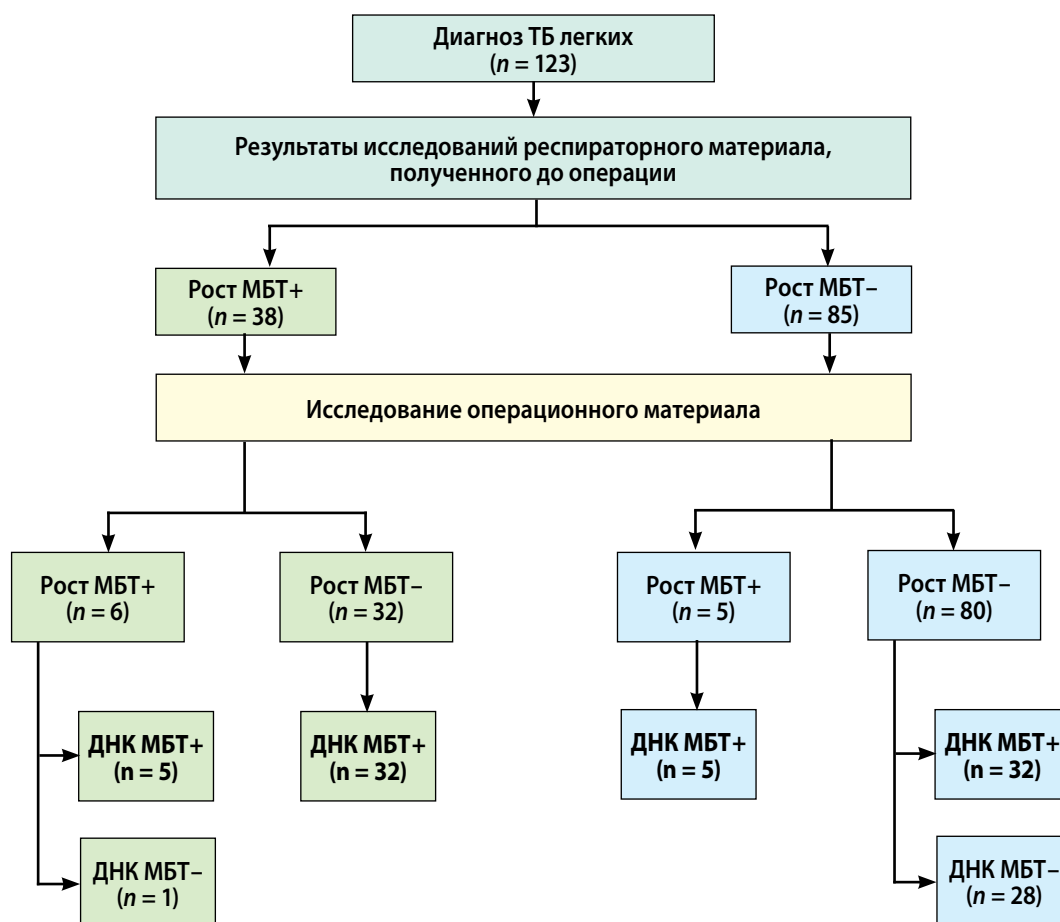


Рис. 2. Результаты молекулярно-генетического и микробиологического исследований с целью верификации заболевания туберкулеза

Самым вариабельным по типам выявленных мутаций был ген *embB*, в котором обнаружено 11 вариантов. Наиболее распространенные из них – M306V и Q497R, обнаруженные в 7 и 6 образцах, соответственно. Данные мутации встречались в МЛУ и пре- и ШЛУ образцах ДНК МБТ.

Тест-система «ТБ-ТЕСТ» позволяет определять наиболее эндемичные для Российской Федерации генотипы МБТ. Так,

генотип *Beijing* был определен в 41 случае (47,7%), вариант *Beijing B0* – в 11 (12,8%), Европейско-Американское семейство – в 14 (16,3%) случаях, *LAM* – в 10 (11,6%), *Ural* – в 8 (9,3%) и *Haarlem* – в 2 (2,3%). Таким образом, в случаях, когда невозможно получить культуру МБТ, при достаточной концентрации ДНК МБТ в образце операционного диагностического материала с помощью молекулярно-генетических методов возможно проведение эпидемиологических исследований.

Сопоставление результатов исследования операционного и респираторного материалов

Проведено ретроспективное исследование по сопоставлению результатов выявления и определения ЛЧ МБТ к ПТП в респираторном материале до операции и после проведения хирургического лечения в операционном материале.

В данном исследовании не изучали вопросы идентификации культур НТМБ из операционного материала, поэтому в дальнейшем образцы, из которых была выделена культура НТМБ, обозначали как рост МБТ–.

Из 123 больных туберкулезом у 38 (30,9%) пациентов из респираторного материала были получены данные о ЛЧ МБТ культуральным методом (рис. 2). Из них в операционном материале культура МБТ выделена лишь у шести (15,8%) пациентов (результаты определения ЛЧ МБТ, полученных из респираторного

Таблица 4. Мутации и их сочетания, связанные с устойчивостью МБТ к фторхинолонам и аминогликозидам

<i>gyrA/gyrB</i> (устойчивость к фторхинолонам)	<i>rrs/eis</i> (устойчивость к аминогликозидам)	Количество образцов (n = 16)
D94G (<i>gyrA</i>)	–	1
D485G, D500N (<i>gyrB</i>)	–	1
–	a1401g (<i>rrs</i>)	4
–	g10a (<i>eis</i>)	3
–	c12t (<i>eis</i>)	1
–	c14t (<i>eis</i>)	1
D94Y/N(<i>gyrA</i>)	a1401g (<i>rrs</i>)	1
D500N, E540D (<i>gyrB</i>)	c12t (<i>eis</i>)	1
D94G (<i>gyrA</i>)	g10a (<i>eis</i>)	1
D94Y (<i>gyrA</i>)	c12t (<i>eis</i>)	1
D94G (<i>gyrA</i>)	c12t (<i>eis</i>)	1

и операционного материалов, совпали), тогда как ДНК МБТ выявлена в 37 (97,4%) случаях. Полученные данные свидетельствуют о том, что возбудитель туберкулеза значительно реже высевается из операционного материала больных туберкулезом, чем из респираторного.

У 85 (69,1%) пациентов из 123 больных туберкулезом к моменту проведения операции данных о ЛЧ МБТ не было. У 52 (61,2%) из 85 пациентов ДНК МБТ впервые удалось выявить в операционном материале, и у пяти пациентов результаты были подтверждены ростом МБТ в системе BACTEC™ MGIT™ 960. У 28 (22,8%) пациентов в резекционном материале бактериологическими и молекулярно-генетическими методами МБТ или ДНК МБТ не были выявлены, вследствие чего получить данные о ЛЧ невозможно.

Таким образом, у 52 (42,3%) больных туберкулезом этиологическая природа заболевания была подтверждена впервые с помощью молекулярно-генетического исследования операционного материала.

Заключение

Полученные данные продемонстрировали, что при исследовании операционного материала ДНК МБТ выявляется только у пациентов с установленным диагнозом туберкулеза, в то время как у пациентов с нетуберкулезными заболеваниями легких с помощью люминесцентной микроскопии обнаруживают КУМ и выделяют культуры НТМБ. Частота выявления МБТ в операционном материале больных туберкулезом с помощью МГМ была в 8,5 раза выше по сравнению с культуральным методом. ЛЧ МБТ микробиологическими методами определена в 10 образцах, в то время как с помощью «ТБ-ТЕСТ» – в 86 образцах. В итоге применение МГМ в комплексной лабораторной диагностике туберкулеза при исследовании операционного материала позволяет повысить частоту этиологического подтверждения диагноза. В связи с трудностью получения культур МБТ из операционного материала в исследовании показана возможность использования резекционного диагностического материала для проведения эпидемиологических исследований. У 22,8% больных туберкулезом в резекционном материале бактериологическими и молекулярно-генетическими методами МБТ или ДНК МБТ не выявлены. При этом у 42,3% больных туберкулезом этиологическая природа заболевания была подтверждена впервые с помощью молекулярно-генетического исследования операционного материала.

Литература

1. Белоусова К.В. Характеристика клинически значимых биологических свойств возбудителя туберкулеза, выделенного из резецированных участков легких больных туберкулезом: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Екатеринбург, 2013. – 25 с.
2. Елькин А.В. Отдаленные результаты хирургического лечения туберкулеза легких в зависимости от массивности бактериовыделения и лекарственной устойчивости возбудителя // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 5. – С. 28-31.
3. Концепции химиотерапии и этиологической (микробиологической и молекулярно-биологической) диагностики туберкулеза в Российской Федерации на современном этапе. – Москва. – 2011.
4. Некрасов Е.В., Янова Г.В. Результаты хирургического лечения больных туберкулезом легких, выделяющих множественно лекарственно-устойчивые микобактерии туберкулеза // Клиническая медицина. – 2011. – Т. 78. – № 2. – С. 75-78.
5. Противотуберкулезная работа в городе Москве. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу 2015 г. / Под ред. Е.М. Богородской, В.И. Литвинова, Е.М. Беликовского. – М.: МНПЦБТ, 2016. – 244 с.
6. Скворцов Т.А., Ажикина Т.Л. Адаптивные изменения экспрессии генов *Mycobacterium tuberculosis* в ходе инфекционного процесса // Биоорганическая химия. – 2012. – Т. 38. – № 4. – С. 391-405.
7. Andersson D.I., Levin B.R. The biological cost of antibiotic resistance // Curr. Opin. Microbiol. – 1999. – Vol. 2. – N. 5. – P. 489-493.
8. Gargneux S. Fitness cost of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – Vol. 15. – Suppl. 1. – P. 66-68.
9. Gargneux S., Long C.D., Small P.M. et al. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Science. – 2006. – Vol. 312. – N. 5782. – P. 1944-1946.
10. von Groll A., Martin A., Stehr M. et al. Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing and non-W-Beijing genotype // PlosOne. – 2010. – Vol. 5. – N. 4. – e10191.
11. Hillemann D., Richter E., Rüsche-Gerdes S. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 automated system for recovery of *Mycobacteria* from 9558 extrapulmonary specimens, including urine samples. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – N. 11. – P. 4014-4017.
12. 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. – Vol. 82. – N. 1. – P. 49-53.
13. Kent P.T., Kubica G.P. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. – Atlanta, Ga, USA: US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, 1985.

14. Mariam D.H., Mengistu Y., Hoffner S.E., Andersson D.I. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – N. 4. – P. 1289-1294.
15. Nosova E., Zimenkov D., Khakhalina A. et al. A comparison of the Sensititre MycoTB Plate, the BACTEC MGIT 960, and a Microarray-Based molecular assay for the detection of drug resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Moscow, Russia // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11. – N. 11. – e0167093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167093>.
16. Park H.D., Guinn K.M., Harrell M.I. et al. *Rv3133c/dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* // *Mol. Microbiol.* – 2003. – Vol. 48. – N. 3. – P. 833-843.
17. Pym A.S., Saint-Joanis B., Cole S.T. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – N. 9. – P. 4955-4960.
18. Rustad T.R., Harrell M.I., Liao R., Sherman D.R. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3. – e1502.
19. 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.
20. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V. et al. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – N. 6. – P. 1520-1531.

Сведения об авторах

Исакова Александра Ивановна – врач клинической лабораторной диагностики Централизованной бактериологической лаборатории ГБУЗ города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (499) 268-70-33, тел./факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: isakovaaleks@gmail.com

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

Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (495) 603-30-33, тел./факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: rna68@rambler.ru

Гармаш Юлия Юрьевна – заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ города Москвы «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 (916) 365-50-97, факс + 7 (495) 785-20-82
e-mail: [ygarmash@mail.ru](mailto:ygar mash@mail.ru)

Богданов Кирилл Аркадьевич – заведующий туберкулезным хирургическим отделением № 1 Клиники № 1 ГБУЗ города Москвы «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) 268-08-16, тел./факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: 9161816769@mail.ru

Трусов Всеволод Николаевич – заведующий туберкулезным хирургическим отделением № 2 Клиники № 1 ГБУЗ города Москвы «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 (910) 422-76-41, + 7 (495) 603-30-93
e-mail: TRUSOVVSEVOLOD@yandex.ru

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

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Тел. + 7 (499) 268-08-76, факс + 7 (499) 785-20-82
e-mail: safonova.s.g.@inbox.ru