

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ ДЕСТРУКТИВНЫМ СПЕЦИФИЧЕСКИМ ПРОЦЕССОМ ЛЕГКИХ

Кричевская Н.А.

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, Россия (410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112), e-mail: meduniv@sgmu.ru

Проведен сравнительный анализ эффективности лечения больных деструктивным туберкулезом легких при использовании для определения лекарственной устойчивости возбудителя метода абсолютных концентраций и тест-системы «ТБ-БИОЧИП». В исследовании принимали участие пациенты молодого возраста, с впервые выявленным туберкулезом легких, наличием бактериовыделения и лекарственной устойчивости микобактерии туберкулеза, завершённой интенсивной фазой химиотерапии. При использовании метода абсолютных концентраций (пациенты 1 группы) данные о лекарственно-устойчивом туберкулезе получены через 2–3 месяца, при использовании тест-системы «ТБ-БИОЧИП» (пациенты 2 группы) через 1–2 дня, что позволило пациентам 2 группы сразу назначить адекватную химиотерапию. В результате своевременного назначения адекватной химиотерапии с учетом лекарственной устойчивости, улучшение в течении патологического процесса было достигнуто у большего числа пациентов 2 группы и в более короткие сроки по сравнению с наблюдаемыми в 1 группе.

Ключевые слова: тест-система "ТБ-БИОЧИП", метод абсолютных концентраций, лекарственная устойчивость, M. tuberculosis.

THE ROLE OF MOLECULAR GENETIC METHODS FOR STUDYING DRUG RESISTANCE IN THE TREATMENT OF TUBERCULOSIS IN PATIENTS WITH DESTRUCTIVE PULMONARY SPECIFIC PROCESS

Krichevskaya N.A.

Phthisiology departament of Razumovskiy State Medical University of Saratov Ministry of Health of the Russian Federation (410012, Saratov, street B. Kazachya, 112), e-mail: meduniv@sgmu.ru

A comparative analysis of the treatment of patients with destructive pulmonary tuberculosis when used to determine drug resistance method of absolute concentrations and test systems "TB- Biochip". The study involved young patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis, the presence of bacterial isolation and drug resistance of Mycobacterium tuberculosis, completed an intensive phase of chemotherapy. When using the method of absolute concentrations (group 1 patients) data on drug-resistant tuberculosis were obtained after 2–3 months, when using a test system «TB- Biochip» (group 2 patients) after 1–2 days, allowing patients to 2 groups immediately assign adequate chemotherapy. As a result, timely administration of appropriate chemotherapy based on drug resistance, improved during the pathological process was achieved in more patients in group 2 and in a shorter time compared to that observed in group 1.

Keywords: test-system "TB-Biochip", method of absolute concentrations, drug resistance, M. tuberculosis.

Введение

В последнее время клиницистами большое внимание уделяется диагностике и лечению туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), когда микобактерии туберкулеза (МБТ) устойчивы к двум основным противотуберкулезным препаратам – изониазиду и рифампицину по результатам тестов на лекарственную устойчивость [1, 2, 3, 5]. МЛУ-ТБ требует более длительного и дорогостоящего лечения, а также чаще приводит к неэффективной терапии или к летальному исходу [3, 6]. Высокий

уровень МЛУ-ТБ серьезно влияет на распространение туберкулеза через накопление в популяции источников инфекции из-за снижения эффективности лечения.

Лекарственная устойчивость (ЛУ) неотступно следует за развитием антибактериальной терапии. Открытие стрептомицина в 1943 г. ознаменовало новую эпоху в лечении туберкулеза, однако в 1949 г. появились первые сообщения о приобретенной устойчивости к данному препарату. Исследование МБТ на молекулярном уровне позволили раскрыть некоторые механизмы развития ЛУ к противотуберкулезным препаратам. Установлено, что резистентность обусловлена хромосомными мутациями [8, 4]. Лекарственная устойчивость развивается в результате одной или нескольких хромосомных мутаций в независимых генах МБТ [4]. После возникновения селекции лекарственно-устойчивых штаммов МБТ они могут передаваться воздушно-капельным путем от больного к здоровому человеку. Эффективность лечения ЛУ-ТБ (лекарственно-устойчивый туберкулез) зависит от адекватной химиотерапии, проводимой на основании индивидуальных результатов тестов лекарственной устойчивости (ТЛЧ) [3]. Однако используемые ТЛЧ должны быть ускоренными (молекулярно-генетические методы), недорогостоящими, качественными, стабильными и пригодными для широкомасштабного использования, а также требовать минимум лабораторной инфраструктуры и минимум обучения персонала.

Лекарственную устойчивость МБТ в настоящее время определяют методом абсолютных концентраций (МАК), основанным на добавлении в плотную питательную среду Левенштейна – Йенсена стандартных концентраций противотуберкулезных препаратов, которые принято называть предельными. Недостатком метода является то, что результаты лекарственной устойчивости микобактерии туберкулеза будут получены не ранее 2–3 месяцев [7].

Все большее значение приобретают внедренные в лабораторную практику молекулярно-генетические методы (МГМ) ускоренного выявления ЛУ возбудителя. Основным достоинством МГМ тестирования ЛУ МБТ является быстрота получения результатов и оперативное выявление больных с МЛУ-туберкулезом. Применение МГМ позволяет проводить определение ЛУ МБТ непосредственно из исследуемого материала. В этом случае получение результатов о наличии у пациента МЛУ-ТБ возможно через 1–2 дня после обследования. Определить устойчивость к изониазиду и рифампицину позволяет отечественная тест-система «ТБ-Биочип», для определения ЛУ к препаратам второго ряда – офлоксацину тест-система «ТБ-Биочип-2» (ООО «Биочип-ИМБ», Россия), в основе которых лежит технология биологических микрочипов, набор реагентов для проведения ПЦР в режиме реального времени. Сопоставление результатов, полученных биочип-

исследованиями с данными ЛЧ МБТ, определенной культуральными методами как на плотных, так и на жидких средах, выявили 90–97 % совпадения по изониазиду и 88–96 % по рифампицину [8, 9].

Цель исследования: повышение эффективности лечения больных молодого возраста с деструктивными формами туберкулеза легких при использовании молекулярно-генетических методов выявления ЛУ.

Материалы и методы. Дизайн исследования определен как проспективное рандомизированное.

Критерии включения: впервые выявленный деструктивный туберкулез легких с наличием бактериовыделения и ЛУ МБТ, возраст больных от 18 до 44 лет включительно, завершенная интенсивная фаза химиотерапии (ИФ ХТ). Критерии исключения: дети и подростки; лица старше 44-х лет, наличие ВИЧ-инфекции; тяжелая сопутствующая патология в стадии декомпенсации; больные, преждевременно прервавшие интенсивную фазу химиотерапии (ИФ ХТ).

Обследовано 89 человек, находящихся на лечение в ГУЗ Областной клинический противотуберкулезный диспансер г. Саратова. Пациенты разделены на 2 группы: 1 группа – 51 пациент (57,3 %), у которых ЛУ определялась методом абсолютных концентраций; 2 группа – 38 больных (42,7 %), у которых ЛУ к изониазиду, рифампицину и офлоксацину определялась молекулярно-генетическим методом: тест-системой «ТБ-БИОЧИП». В качестве образцов биологического материала исследовали мокроту. В обеих группах преобладали лица мужского пола: в 1 группе – 52,9 % (n=27), во второй – 52,6 % (n=20) (p>0,05), женщины соответственно составили 47,1 % (n=24) против 47,4 % (n=18) (p>0,05).

Всем пациентам проводились стандартные клинические, микробиологические и рентгенологические методы исследования. Группы наблюдения были сопоставимы по клиническим параметрам и характеру патологических изменений в легких, оцениваемых по рентгенологической картине. В структуре форм специфического процесса преобладал инфильтративный туберкулез легких: в 1 группе 82,4% (n=42); во 2 группе – 78,9% (n=30) (p>0,05). Диссеминированный туберкулез легких диагностирован у 17,6% (n=9) и 21,1% (n=8) в 1 группе и во 2 группе соответственно (p>0,05). У значительной части пациентов при поступлении в стационар в обеих группах наблюдались симптомы туберкулезной интоксикации: у 90,2 % (n=46) и 86,8 % (n=33); катаральные явления в легких выслушивались у 94,1 % (n=48) и 92,1 % (n=35) больных; изменения в гемограмме: ускоренное СОЭ у 58,8 % (n=30) и 60,5 % (n=23), лимфопения у 17,6 % (n=9) и 15,8 % (n=6).

В рентгенологической картине в обеих группах превалировали распространенные формы заболевания с поражением более 1 доли у 78,4 % (n=40) больных в 1 группе и 73,7 %

(n=28) человек во 2 группе (p>0,05). Процессы с множественными полостями распада составили 72,5 % (n=37), против 60,5 % (n=23) во второй группе. Лечение начато у пациентов 1 группы по интенсивной фазе (ИФ) 1 режима в 68,6 % (n=35), по ИФ 2б режима в 31,4 % (n=16) случаях. Во 2 группе ИФ 1 режима начата в 5,3 % (n=2), ИФ 2б в 36,8 % (n=14), ИФ 4 режима в 57,9 % (n=22) случаях.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием компьютерных программ Microsoft® Excel для Windows XP® и Statistica 6.0. с использованием методов статистического анализа (среднее арифметическое и ошибка средней). Сравнение количественных признаков двух групп с нормальным распределением, проводилась с использованием параметрического метода (t-критерий Стьюдента). Для сравнения достоверности различий относительных величин в двух группах использовали непараметрический критерий – χ^2 . В качестве критического уровня достоверности был принят критерий 0,05.

Результаты исследования

В ходе проведенных исследований было установлено, что частота выявления МЛУ существенно не различалась при использовании метода абсолютных концентраций и метода биологических микрочипов. Из числа лиц, обследованных методом абсолютных концентраций (группа 1), МЛУ выявлена в 60,8 % (n=31) случаев, ЛУ к другим химиопрепаратам (ХП) – в 39,2 % (n=20). Тест-системой «ТБ-БИОЧИП» (группа 2) МЛУ установлена у 57,9 % (n=22) больных, ЛУ только к офлоксацину – у 42,1 % (n=16) лиц (p>0,05). При этом различались сроки получения результатов ЛУ: в группе 1 ЛУ выявлена в среднем через 78,2±26,9 дней от начала лечения, в группе 2 – через 3,4±1,2 дня, (p=0,03), что позволило пациентам 2 группы сразу назначить адекватную терапию. В результате своевременно назначенной адекватной химиотерапии (ХТ) с учетом ЛУ, улучшение в течении патологического процесса было достигнуто у большего числа пациентов 2 группы и в более короткие сроки по сравнению с наблюдаемыми в 1 группе. При оценке клинической динамики процесса нормализация клинических показателей происходила раньше во 2 группе, чем в первой (таблица 1 и 2).

Таблица № 1

Динамика клинических показателей у пациентов при назначении химиотерапии с учетом лекарственной устойчивости

Методы определения лекарственной устойчивости	Исчезновение симптомов интоксикации			Исчезновение катаральных явлений		
	Число принятых доз			Число принятых доз		
	30 доз	60 доз	90 доз	30 доз	60 доз	90 доз

Метод абсолютных концентраций	19 (41,3%)	41 (89,1%)	46 (100%)	23 (47,9%)	31 (64,6%)	48 (100%)
Молекулярно-генетический метод	28 (84,8%)	32 (96,6%)	33 (100%)	31 (88,6%)	34 (97,1%)	35 (100%)
p	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Таблица № 2

Динамика лабораторных показателей у пациентов при назначении химиотерапии с учетом лекарственной устойчивости

Методы определения лекарственной устойчивости	Нормализация СОЭ			Нормализация абсолютного числа лимфоцитов		
	Число принятых доз			Число принятых доз		
	30 доз	60 доз	90 доз	30 доз	60 доз	90 доз
Метод абсолютных концентраций	12 (40%)	28 (93,3%)	30 (100%)	3 (33,3%)	5 (55,6%)	9 (100%)
Молекулярно-генетический метод	16 (69,6%)	23 (100%)	23 (100%)	4 (66,7%)	6 (100%)	6 (100%)
p	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Раннее назначение адекватной химиотерапии в связи с использованием определения ЛУ методом тест-системы «ТБ-БИОЧИП» оказала влияние и на более быстрое достижение эпидемического благополучия пациентов. Прекращение бактериовыделения во 2 группе происходило на средних дозах $45 \pm 21,7$, а в 1 группе на средних дозах $98,8 \pm 63,3$ ($p < 0,05$). Данные представлены в таблице № 3.

Таблица № 3

Динамика прекращения бактериовыделения (микроскопически) у пациентов при назначении химиотерапии с учетом лекарственной устойчивости.

Число принятых доз	Метод абсолютных концентраций n=51	Молекулярно-генетический метод n=38	p
30	13 (25,5%)	24 (63,2%)	p<0,05
60	25 (49,0%)	33 (86,8%)	p<0,05
90	28 (54,9%)	38(100%)	p<0,05
120	37 (72,5%)	38(100%)	p<0,05
150	41 (80,4%)	38(100%)	p<0,05
180	51 (100%)	38(100%)	

Рубцевание полостей распада происходило во 2 группе на $96,49 \pm 14,38$ дозах интенсивной фазы ХТ от начала лечения против $204,71 \pm 49,73$ дозы в 1 группе ($p = 0,005$).

Результаты представлены в таблице № 4.

Таблица № 4

Рентгенологическая динамика (рубцевание полостей распада) у пациентов при назначении химиотерапии с учетом лекарственной устойчивости (с нарастающим итогом)

Число принятых доз	Метод абсолютных концентраций n=51	Молекулярно-генетический метод n=38	p
30	0	0	
60	0	2 (5,3%)	p<0,05
90	3 (5,9%)	29 (76,3%)	p<0,05
120	7 (13,7%)	38 (100%)	p<0,05
150	11 (21,6%)	38 (100%)	p<0,05
180	19 (37,3%)	38 (100%)	p<0,05
210	20 (39,2%)	38 (100%)	p<0,05
240	51(100%)	38 (100%)	

Заключение. Использование тест-системы «ТБ-БИОЧИП» позволяет сократить сроки определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза и своевременно назначить адекватную химиотерапию, в результате которой достигается повышение ее результативности по всем клиническим критериям.

Список литературы

1. Дорожкова И. Р., Макарова М. В., Фрейман Г. Е. Ускоренный скрининг туберкулеза и микобактериозов в централизованной микобактериологической лаборатории мегаполиса // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 4. – С. 131.
2. Дорожкова И. Р., Макарова М. В., Фрейман Г. Е. Повышение эффективности выделения и идентификации микобактерий в условиях централизованной микобактериологической лаборатории // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 6. – С. 21-27.
3. Зависимость результатов лечения больных туберкулезом легких от спектра лекарственной устойчивости возбудителя / И. А. Васильева, А. Г. Самойлова, Т. Р. Багдасарян, В. Н. Зиминая, Л. Н. Черноусова // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 10. – С. 28-33.
4. Михеева О. П., Иванова О. В. Результаты определения лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биологических микрочипов в Кемеровской области // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 5. – С. 48-49.
5. Оптимизация лабораторной диагностики туберкулеза с использованием современных бактериологических и молекулярно-генетических методов / Я. М. Балабанова, Ф. Дробниевский, И. М. Федорин, О. А. Игнатъева, Н. А. Маломанова // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 2. – С. 36-44.

6. Паролина Л. Е., Морозова Т. И., Докторова Н. П. Фармакоэкономика во фтизиатрии: возможности и перспективы // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 2. – С. 8-15.
7. Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». URL: <http://www.zdrav.ru/library/regulations/detail.php?ID=25540> (дата обращения 12.11.2013).
8. Сравнительный анализ определения лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* бактериологическим методом абсолютных концентраций и методом биологических микрочипов / Ж. Т. Исакова, Н. А. Совхозова, З. К. Гончарова, А. А. Алдашев // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 3. – С. 57-60.
9. Ускоренная диагностика множественной лекарственной устойчивости МБТ на основе тест-системы «ТБ-биочип» / М. В. Павлова, Н. В. Сапожникова, В. Ю. Журавлев, М. Н. Кондакова, Л. И. Арчанова // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 5. – С. 93.

Рецензенты:

Салина Т.Ю., д.м.н., доцент, доцент кафедры фтизиатрии ФПК и ППС ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, г. Саратов.

Казиминова Н.Е., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, г. Саратов.