

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ НА ЭТАПЕ ИНФЕКЦИОННОГО СТАЦИОНАРА

Долгова Е.А.^{1,2}, Альварес Фигероа М.В.^{1,2}, Шахгильдян В.И.³, Юдицкий М.В.⁴,
Волковинская Л.С.⁴, Романюк Т.Н.¹, Батыров Ф.А.², Шипулин Г.А.¹

¹ ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

² Туберкулезная клиническая больница №7, Москва

³ Инфекционная клиническая больница №2, Москва

⁴ Туберкулезная клиническая больница №3, Москва, Россия

Введение. Туберкулез (ТБ) является одним из наиболее частых вторичных заболеваний у больных ВИЧ-инфекцией, вызывающий тяжелые поражения как легочной, так и внелегочной локализации, и служащий основной причиной летального исхода у больных на стадии СПИДа [1]. По мере увеличения количества больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции, растет заболеваемость сочетанной патологией ВИЧ-инфекция/ТБ. К концу 2008 г. этот показатель превысил аналогичный за 1999 год в 27 раз [2].

Больные с положительным ВИЧ-статусом в случае развития вторичного заболевания неизвестной этиологии попадают в инфекционный стационар общего профиля. При выявлении у пациентов клинических симптомов ТБ и после осмотра этих пациентов фтизиатром - консультантом, больных переводят в туберкулезную больницу. Однако при выраженном иммунодефиците на поздних стадиях ВИЧ-инфекции существенно меняется морфология туберкулезного воспаления, что приводит к атипичной клинико-рентгенологической картине заболевания и затрудняет дифференциальную диагностику со сходными по проявлениям вторичными заболеваниями. При этом диагностическая значимость бактериоскопии мокроты - единственного метода обнаружения микобактерий, применяемого на этапе инфекционного стационара, у таких больных относительно невысока вследствие его низкой чувствительности.

При выборе рациональной схемы химиотерапии больных сочетанной патологией, необходимо учитывать высокую частоту их поражения штаммами микобактерий, устойчивыми к действию противотуберкулезных препаратов (ПТП) [3, 4] и возможность развития туберкулеза, вызванного *M. bovis*, обладающего естественной устойчивостью к пипразинамиду.

Единственным методом традиционной микробиологической диагностики, позволяющим определять видовую принадлежность мико-

бактерий и их чувствительность к ПТП, является культуральный метод, который применяется лишь в специализированных противотуберкулезных учреждениях. Данный метод обладает существенными недостатками: длительным сроком получения результатов и низкой диагностической чувствительностью при развитии ТБ на фоне глубокой иммуносупрессии, что делает его мало приемлемым у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Таким пациентам, часто находящимся в тяжелом состоянии, требуется максимально быстрое установление этиологии заболевания вследствие высокого риска генерализации туберкулезного процесса, приводящего к гибели пациента при отсутствии этиотропной терапии.

Методы, основанные на использовании ПЦР, обладают высокой диагностической чувствительностью и специфичностью, и позволяют в течение короткого периода времени ответить на многие вопросы, встающие перед лабораторной диагностикой туберкулеза. В то же время эффективность их использования для больных сочетанной патологией ВИЧ-инфекция/туберкулез изучена недостаточно.

Целью нашей работы явилось определение диагностической эффективности применения молекулярно-генетических методов для диагностики туберкулеза у больных, находящихся на поздних стадиях ВИЧ-инфекции, на этапе инфекционного стационара.

Материалы и методы. Исследовано 359 образцов различных видов клинического материала (мокрота, БАЛЖ, биоптаты бронхов, плевральная жидкость, ликвор, биоптаты лимфоузлов) полученного от 124 ВИЧ-инфицированных пациентов инфекционной больницы №2 (ИКБ №2), которые впоследствии были переведены в клинические туберкулезные больницы №3 и №7 для дифференциальной диагностики туберкулеза. Средний возраст пациентов составил 32 ± 7 лет. Мужчин было 104 (83,9%), женщин – 20 (16,2%). Все больные находились на стадии вторичных заболеваний IVB или IVB (СПИД).

В туберкулезных больницах диагноз «туберкулез» был установлен у 122 (98,4%) больных. Эти пациенты были ретроспективно разделены на две группы. К первой был отнесен 41 (33,6%) больной туберкулезом с культурально-подтвержденным бактериовыделением. Для всех пациентов данной группы с помощью метода абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена была определена лекарственная устойчивость микобактерий к рифампицину. Во вторую группу был включен 81 больной туберкулезом без бактериовыделения.

В работе использованы наборы реагентов производства ФГУН ЦНИИЭпидемиологии Роспотребнадзора. Наличие ДНК *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТС) определялось с помощью набора реагентов

«АмплиСенс® МТС-FL». В случае обнаружения ДНК МТС, в этих же образцах определялся вид МТС (набор «АмплиСенс® МТС-diff-Fl») и чувствительность к рифампицину (набор «АмплиСенс®-МТС-Rif-Seq»). При работе с наборами реагентов «АмплиСенс® МТС-FL» и «АмплиСенс® МТС-diff-Fl» амплификацию с гибридизационно-флуоресцентной детекцией проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). При работе с набором реагентов «АмплиСенс®-МТС-Rif-Seq» использовали амплификатор «Терцик» (ДНК-технология) и секвенатор «AbiPrism 3100» (Applied Biosystems).

Результаты. ДНК МТС была обнаружена в образцах 56 (45,9%) больных с клиническим диагнозом «туберкулез», при этом в 1 случае был определен вид *M. bovis*. В случае отвергнутого в специализированном стационаре диагноза «туберкулез» ДНК МТС в материале больных обнаружена не была.

При исследовании образцов, полученных от больных с бактериовыделением, ДНК МТС была обнаружена в материале 36 (87,8%) пациентов. В случае совпадения локализации взятия материала для посева и исследования методом ПЦР, ДНК МТС обнаруживали в 100% случаев. В материалах 12 (33,1%) пациентов данной группы были выявлены мутации устойчивости МТС к рифампицину, что на 100% совпало с результатами бактериологического посева. Необходимо отметить, что результаты культурального исследования были получены в среднем через 81 ± 15 дней с момента посева материала на плотные питательные среды, тогда как использование тест-системы «АмплиСенс®-МТС-Rif-Seq» позволило сделать вывод о лекарственной чувствительности МТС к рифампицину в течение 2-3 дней с момента получения материала.

При исследовании материала, полученного от больных с клиническим диагнозом «туберкулез» без бактериовыделения, ДНК МТС была обнаружена в образцах еще 20 (24,7%) человек. При этом в образцах, собранных от 5 (25%) пациентов, были выявлены мутации, вызывающие устойчивость МТС к рифампицину.

Заключение. На данном этапе исследования показана высокая диагностическая чувствительность определения ДНК МТС методом ПЦР в отношении туберкулеза у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Применение молекулярно-генетических методов на этапе инфекционного стационара позволит усовершенствовать диагностику туберкулеза, ускорить перевод больных туберкулезом из общего стационара в специализированные больницы, с целью предотвращения нозокомиального распространения заболевания, своевременно начать противотуберкулезное лечение. При этом полученная в ранние сроки информация о видовой принадлежности микобактерий и их устойчи-

вести к ПТП позволит проводить более эффективную химиотерапию у этих больных.

Литература:

1. Туберкулез в Российской Федерации 2007 г. Аналитический обзор основных статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации.

2. <http://www.tbpolicy.ru/>.

3. Алексеева Л.П. Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Туберкулез с лекарственной устойчивостью микобактерий у больных ВИЧ-инфекцией». 2009 г.

4. Фролова О.П., Шинкарева О.А., Новоселова О.А. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу, сочетанному с ВИЧ-инфекцией, в Российской Федерации и рекомендации по организации противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией. Проблемы туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. Бюллетень №7, 2009 г.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТА УРАЦИЛ-ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «АМПЛИСЕНС® МТС-FL» ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ДНК MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX

Долгова Е.А., Альварес Фигероа М.В., Шипулин Г.А.

ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва

Введение. В последнее время во фтизиатрической практике все чаще наблюдается применение метода полимеразой цепной реакции (ПЦР). Методики, основанные на ПЦР, несмотря на их явные преимущества - высокие чувствительность и специфичность, тем не менее, имеют и недостатки, одним из которых является возможность получения ложноположительных результатов вследствие контаминации, т.е. попадания в реакционную смесь продуктов амплификации. Правильная организация лабораторного помещения и применение современных методик с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации значительно снижает риск контаминации, но не защищает лабораторию от случайного загрязнения ими вследствие повреждения или случайного открывания пробирок. Продукты амплификации (ампликоны), при попадании из внешней среды в реакционную смесь, способны служить матрицами для последующей ПЦР.