

# МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

**А.В. Ковальчук, Е.П. Еременко, А.Н. Кузнецова, П.В. Рогожкин, Е.П. Инькова**

Самарский государственный медицинский университет  
443099, Российская Федерация, Самара, ул. Чапаевская, д. 89

**E-mail:** borodulinbe@yandex.ru

**Высокая распространенность туберкулеза, устойчивого к терапии, существенно влияет на эпидемиологическую ситуацию. Приводятся сведения о методах диагностики туберкулеза.**

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, генетическая мутация, микробиологические методы, туберкулез.

Для цитирования: Ковальчук А.В., Еременко Е.П., Кузнецова А.Н., Рогожкин П.В., Инькова Е.П. Методы диагностики лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Медицинская сестра. 2019; 21 (8): 7–10. <https://doi.org/10.29296/25879979-2019-08-02>



При археологических раскопках обнаружилось, что туберкулезом люди болели еще в период неолита (около 5000 лет до н. э.). В Древнем Египте (около 2700 лет до н. э.), в Древней Греции Гиппократ считал туберкулез самой распространенной болезнью всех времен. С начала XVII века европейская эпидемия туберкулеза, которую называли «великой белой чумой», свирепствовала более 200 лет, причем умирал каждый 6-й больной. В 1944 г. был разработан антибиотик стрептомицин, который помогал бороться с заболеванием. Последующие годы ознаменовались еще более значимыми успехами в этой области, но надежды на полную ликвидацию туберкулеза не оправдались [1].

Развитие лекарственной устойчивости (ЛУ) микобактерий туберкулеза (МБТ) стало серьезной

угрозой эффективности противотуберкулезной помощи во многих странах. Распространение МБТ, устойчивых к основным противотуберкулезным препаратам, – один из главных факторов, препятствующих деятельности фтизиатрической службы не только в России, но и во всем мире [1, 2].

В основе развития ЛУ МБТ (как и любых других инфекционных микроорганизмов) лежит преимущественное выживание МБТ, имеющих мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к антибактериальным агентам [3, 4]. В процессе химиотерапии достаточно быстро погибают чувствительные микробные клетки, но размножаются лекарственно-резистентные, если не достигается абацилирование. Адаптации микроорганизмов к неблагоприятным воздействиям способствует происходящий в каждой бактериальной клетке спонтанный мутагенез, в результате которого происходят повреждения молекулы ДНК-мутации. Эти мутации не взаимосвязаны, т.е. устойчивость к одному препарату не ассоциирована с резистентностью к другим препаратам. При полирезистентности возникает накопление хромосомных мутаций, связанных с устойчивостью к разным препаратам. Это отличает МБТ от других микроорганизмов, полирезистентность которых чаще всего обусловлена плазмидами или другими мобильными генетическими элементами [5].

Феномен перекрестной ЛУ связан с одинаковым механизмом антибактериальной активности препаратов. В наибольшей степени это относится к фторхинолонам, так как все они являются блокаторами фермента ДНК-гиразы. Реже это наблюдается среди аминогликозидов как блокаторов белкового синтеза. У МБТ в отличие от других патогенов имеется только по 1 копии 16S РНК и 23S РНК. Именно поэтому 1 мутация в соответствующем гене уже ведет к резистентности, все рибосомы в полисоме будут устойчивы к ингибиторам белкового синтеза (стрептомицин и другие аминогликозиды). У других микробов множественность копий рибосомальных генов требует для образования ЛУ мутационных изменений в каждой копии. Этим можно объяснить чрезвычайно высокую частоту устойчивости МБТ к стрептомицину.

Микробные организмы используют ряд механизмов, обуславливающих ЛУ. Среди этих механизмов условно выделяют: барьерный (изменение проницаемости клеточных стенок и мембран); разложение или инактивацию ферментами (например,  $\beta$ -лактамаза как причина природной резистентности МБТ к  $\beta$ -лактамам антибиотикам); модификацию мишени антибиотика благодаря изменению нуклеотидной последовательности соответствующих генов и как следствие – изменение метаболизма [6, 7].

В последнее время у каждого препарата 1-го ряда и большинства резервных определен хотя бы 1 ген, специфические мутации в котором приводят к развитию устойчивых вариантов МБТ. В клинической практике развитие значительной ЛУ почти во всех случаях является следствием неадекватного лечения, однако вероятность ее возникновения на фоне неадекватной химиотерапии резко возрастает при первичном заражении штаммами МБТ-мутантов. В связи с этим пациенты с полостями распада в легких, в которых быстро увеличивается количество МБТ, подвержены более высокому риску приобретения ЛУ [7–9].

Выявление туберкулеза в первичном звене здравоохранения – важная задача. Своевременное обнаружение больных рассматривается как фактор, определяющий их выздоровление и эпидемиологическую обстановку по туберкулезу в целом [10]. Обнаружение МБТ имеет решающее значение не только для диагностики туберкулеза. Оно чрезвычайно важно для прогнозирования течения процесса, выбора рациональной схемы лечения и правильной оценки его эффективности. Самый надежный способ подтверждения диагноза туберкулеза легких – обнаружение МБТ в мокроте или бронхоальвеолярной жидкости пациента [10–12]. Однако при такой видимой простоте диагностики очень часто проходит >7 дней от госпитализации до постановки диагноза.

Наиболее часто с проблемой диагностики туберкулеза сталкивается врач-пульмонолог стационарного отделения [13, 14]. Более чем столетний опыт фтизиатров доказал, что «золотым стандартом» диагностики является классическое сочетание микроскопического и культурального методов исследования МБТ. Эти методы актуальны и в настоящее время, несмотря на появление большого числа альтернативных [10]. Бактериоскопическое исследование – наиболее доступный, быстрый и дешевый метод выявления кислотоустойчивых МБТ. Однако он, даже при использовании самой совершенной микроскопической техники, в том числе люминесцентной, позволяет обнаружить кислотоустойчивые МБТ, если их содержание в 1 мл исследуемого материала составило не менее 10 000. Такое количество МБТ содержится в мокроте только у пациентов с распространенными, прогрессирующими формами

туберкулезного процесса. При его незначительной выраженности лишь у 34% больных удается обнаружить возбудитель при бактериоскопии мазка из мокроты даже после многократных повторных исследований. К недостаткам бактериоскопического метода относится получение отрицательных результатов в следующих случаях: количество выделяемых МБТ ниже чувствительности метода или если бактериовыделение отсутствует; если микроскопическое обнаружение кислотоустойчивых МБТ не позволяет отдифференцировать МБТ комплекса *M. tuberculosis* (возбудитель туберкулеза) от нетуберкулезных (атипичных) микобактерий – возбудителей микобактериозов, определить их жизнеспособность [5, 15].

Получили широкое распространение молекулярно-генетические методы (МГМ) выявления в диагностическом материале специфических фрагментов цепи ДНК МБТ. Из них самый применяемый – полимеразная цепная реакция (ПЦР), в основе которой лежит многократное увеличение числа копий специфического участка ДНК (так называемая направленная амплификация ДНК). Недостатками метода являются: невозможность определить степень жизнеспособности выявляемых МБТ; дороговизна метода; требуются высококвалифицированный персонал, хорошо оснащенные лаборатории, в которых соблюдаются требования генной инженерии, бесперебойной доставки высококачественных дорогостоящих расходных материалов; возможность получения ложноположительных результатов, что обусловлено как техническими погрешностями, так и особенностями метода. В настоящее время ПЦР-диагностику МБТ используют в практике диагностических лабораторий противотуберкулезных учреждений как дополнительный экспресс-метод получения ориентировочных результатов при обязательном параллельном применении классических микробиологических методов диагностики туберкулеза [10, 16].

К МГМ выявления МБТ относится использующийся в настоящее время тест GeneXpert MTB/RIF, который, в том числе, определяет в исследуемом материале генетические маркеры МБТ и наличие мутаций, ассоциированных с множественной ЛУ (МЛУ). Он характеризуется более высокими чувствительностью и специфичностью, чем такие общепринятые методы, как микроскопия мокроты. Тест GeneXpert MTB/RIF обеспечивает быструю одновременную диагностику туберкулеза и устойчивости к рифампицину как индикатору МЛУ. Тест прост в выполнении, не требует большого количества МБТ и необходимости в наличии кабинета-ламинара. Это – самокупаемый и высокоэффективный метод обнаружения туберкулеза и ЛУ [5, 10].

В практике диагностических лабораторий противотуберкулезных учреждений тест GeneXpert MTB/RIF

используется как экспресс-метод поиска МБТ при обязательном параллельном применении классических методов с последующим подтверждением диагноза и определением ЛУ возбудителя культуральными методами.

Основное достоинство всех МГМ – быстрое и достоверное выявление больных с МЛУ-туберкулеза, так как все тест-системы дают возможность определить ЛУ к рифампицину, который является надежным маркером МЛУ [10, 17–19].

Использование МГМ не исключает необходимости применения традиционных культуральных методов определения лекарственной чувствительности возбудителя. Для диагностики ЛУ МБТ традиционными микробиологическими методами требуется длительное время (результаты применения метода абсолютных концентраций получают в среднем через 8–12 нед после сдачи диагностического материала на анализ), что неблагоприятно сказывается на эффективности химиотерапии в связи с неправильно выбранным режимом и нарастанием спектра резистентности МБТ.

Культуральная диагностика туберкулеза переживает в настоящее время принципиальные изменения, связанные с внедрением в практику полностью автоматизированных систем культивирования МБТ. Главная особенность этих методов – применение жидких питательных сред для культивирования с последующей радиометрической (ВАСТЕС 460), колориметрической (Мб-Васт, ВастALERT) и люминесцентной детекцией роста (ВАСТЕС MGIT 960). Рост МБТ на жидкой питательной среде в этих системах удается обнаружить уже через 1–2 нед в зависимости от их исходного количества в диагностическом материале. Частота выявления МБТ также несколько выше, чем на плотных питательных средах. Автоматизированные системы ВАСТЕС с использованием соответствующих флаконов, содержащих разные противотуберкулезные препараты, позволяют сократить время определения ЛУ МБТ до 4–14 сут. Из перечисленных автоматизированных систем наиболее эффективна система ВАСТЕС MGIT 960BD. Флаконы MGIT с жидкой питательной средой 7Н9 содержат в придонной части под силиконом флюоресцентный индикатор, «погашенный» высокими концентрациями кислорода. В случае роста МБТ в процессе поглощения кислорода индикатор начинает светиться, флюоресценция в системе ВАСТЕС MGIT фиксируется автоматически. Основным недостатком ВАСТЕС MGIT, как и других систем ВАСТЕС, является высокая стоимость оборудования и флаконов с питательной средой. Для исследования чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам используются специальные флаконы, содержащие препараты в определенных концентрациях. Набор ВАСТЕС MGIT 960 PZA Kit позволяет тестировать чувствительность

к пиразинамиду при концентрации МБТ 100 мкг/мл [7, 10, 11, 19].

Принципиально новый подход в молекулярной диагностике МБТ – технология гидрогелевых биочипов, разработанная в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Для определения ЛУ МБТ используются 2 тест-системы: тест-система ТБ-Биочип 1 позволяет выявить мутации, ответственные за устойчивость к рифампицину и изониазиду, тест-система «ТБтест» – резистентность МБТ к фторхинолонам, аминогликозидам и капреомицину.

Таким образом, применение новых методов выявления МБТ максимально сокращает сроки выявления туберкулеза, что важно для начала своевременного лечения больных с учетом ЛУ МБТ. Внедрение этих методов требует как от врачей, так и от медсестер дополнительных знаний и умений.

#### Литература

1. Севастьянова Э.В., Черноусова Л.Н. Туберкулез и болезни легких. 2018; 96 (7): 11–7.
2. Бородулина Е.А., Бородулин Б.Е., Амосова Е.А., Табашникова А.И., Титугина А.Ю. Туберкулиновые пробы и их сравнительная оценка. Туберкулез и болезни легких. 2010; 87 (8): 13–7.
3. Землянский О.А., Тюрина Е.Б., Башкирев А.А. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2015; 3: 62–6.
4. Man M.A., Nicolau D. Surgical treatment to increase the success rate of multidrug-resistant tuberculosis. Eur. J. Of Cardio-ThoracicSurgery. 2012; 42 (1): 9–12.
5. Бадлеева М.В., Басаева А.Г., Дементьева К.Н. Методы выявления микобактерий и диагностика туберкулеза. Научные исследования и современное образование. 2017: 33–5.
6. Wang H., Lin H., Jiang G. Pulmonary resection in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a retrospective study of 56 cases. The Annalsofthoracicsurgery. 2008; 86 (5): 1640–5.
7. Бобровская К.В., Кравченко М.А., Бердников Р. Б. Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза, полученных из мокроты и операционного материала больных с туберкулемами легких. Уральский медицинский журнал 2013; 2 (107): 50–3.
8. Землянский О.А., Тюрина Е.Б., Башкирев А.А. Эпидемиологические особенности туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя на территории Белгородской области. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2014; 1: 25–7.
9. Воробьева О.А. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза – современный взгляд на проблему. Сибирский медицинский журнал. 2008; 2: 5–7.
10. Бородулина Е.А., Бородулин Б.Е., Еремеев А.Е. Впервые выявленный туберкулез легких и способ его выявления. Туберкулез и болезни легких. 2011; 88 (5): 113–4.
11. Яблонский П.К., Вишневский Б.И., Соловьева Н.С., Маничева О.А., Догонадзе М.З., Журавлев В.Ю. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза при различных локализациях заболевания. Инфекция и иммунитет. 2016; 6 (2): 133–40.
12. Белоусова К.В. Кравченко М.А. Бердников Р.Б. Вахрушева Д.В. Скорняков С.Н. Еремеева Н.И. Сравнительный анализ клинически значимых биологиче-

ских свойств *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резецированных участков легких и респираторного материала. Фундаментальные исследования. 2014; 9 (11): 2452–5.

13. Бородулина Е.А., Поваляева Л.В., Бородулина Э.В., Вдоушкина Е.С., Бородулин Б.Е. Проблема диагностики туберкулеза в практике врача-пульмонолога. Вестник современной клинической медицины. 2017; 10 (1): 89–93.

14. Бородулина Е.А., Инькова А.Т., Бородулин Б.Е., Поваляева Л.В. Пути оптимизации выявления туберкулеза в пульмонологическом отделении. Туберкулез и болезни легких. 2018; 96 (5): 22–7.

15. Родионова Ю.Д., Гусякова О.А., Лямин А.В., Бородулина Е.А., Козлов А.В. Оценка влияния условий хранения мокроты на витальные свойства микобактерий туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. 2017; 95 (1): 42–6.

16. Pontali E. Rediscovering high technology from the past: thoracic surgery is back on track for multidrug-resistant tuberculosis. Expert review of anti-infective therapy. 2012; 10 (10): 1109–15.

17. Гарифуллин З.Р., Аминев Х.К. Эффективность хирургического лечения больных лекарственно-устойчивым туберкулезом легких в зависимости от длительности заболевания. Туберкулез и болезни легких. 2009; 7: 41–6.

18. Белоусова К.В., Умпелева Т.В., Еремеева Н.И., Голубева Л.А., Ботева Т.Ю., Вахрушева Д.В. Лекарственная чувствительность и генотипическая принадлежность *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из резектатов легких больных туберкулезом. Туберкулез и болезни легких. 2019; 97 (7): 11–7.

19. Воробьева О.А. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза – современные взгляды на проблему. 2008; 2: 5–6.

#### METHODS FOR DIAGNOSIS OF DRUG RESISTANCE IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

A.V. Kovalchuk, E.P. Eremenko, A.N. Kuznetsova, P.V. Rogozhkin, E.P. Inkova

Samara State Medical University

89, Chapayevskaya St., Samara 443099, Russian Federation

**The paper gives information on methods for diagnosing tuberculosis, as its epidemiology continues to remain a problem in many countries of the world.**

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, genetic mutation, microbiological methods, tuberculosis.

**For reference:** Kovalchuk A.V., Eremenko E.P., Kuznetsova A.N., Rogozhkin P.V., Inkova E.P. Methods for diagnosis of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Meditsinskaya Sestra*. 2019; 21 (8): 7–10. <https://doi.org/10.29296/25879979-2019-08-02>