

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА К ПРЕПАРАТАМ 1-ГО РЯДА В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МОКРОТЫ И БИОПТАТАХ ТКАНИ ЛЕГКИХ, ПОЛУЧЕННЫХ ВО ВРЕМЯ ОПЕРАЦИИ\*

Ю. С. АЛЯПКИНА<sup>1,2</sup>, А. А. ЕЛОВ<sup>1</sup>, Л. К. ШИПИНА<sup>1</sup>, М. А. ВЛАДИМИРСКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва, Россия

<sup>2</sup>ООО «Синтол», Москва, Россия

**Цель работы:** изучить эффективность применения технологии ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для быстрого определения у больных туберкулезом легких с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза (МБТ) в образцах мокроты и биоптатах ткани легких, полученных во время операции.

**Материалы и методы.** При использовании технологий ПЦР-РВ и мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР в реальном времени (АС-ПЦР-РВ) были исследованы от больных туберкулезом 231 респираторный образец и 240 биопсийных образцов, полученных при хирургическом лечении.

**Результаты:** положительные результаты определения ДНК МБТ в респираторных образцах получены в 72,7% случаев, из которых в 61,9% случаев число геномных копий ДНК было достаточным для анализа лекарственной устойчивости МБТ, а в исследованных биопсийных образцах число положительных результатов составило 93,3%, из которых в 93% случаев определялась лекарственная устойчивость МБТ. Различия в эффективности исследования биоптатов и респираторных образцов для определения лекарственной устойчивости были статистически значимы:  $p < 0,01$ . При исследовании респираторных образцов множественная лекарственная устойчивость установлена в 42,3% случаев, а при исследовании биоптатов – в 34,4% случаев. Показана высокая эффективность применения технологий ПЦР-РВ и АС-ПЦР-РВ для изучения биопсийных образцов и быстрого определения лекарственной устойчивости МБТ у больных туберкулезом после хирургических вмешательств.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, рифампицин, изониазид, ПЦР в реальном времени

**Для цитирования:** Аляпкина Ю. С., Елов А. А., Шипина Л. К., Владимирский М. А. Эффективность применения технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-анализа лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к препаратам 1-го ряда в клинических образцах мокроты и биоптатах ткани легких, полученных во время операции // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2018. – Т. 96, № 12. – С. 18-24. DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-12-18-24

## EFFECTIVENESS OF REAL-TIME PCR FOR EXPRESS FIRST LINE DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING OF TUBERCULOUS MYCOBACTERIA USING SPUTUM SAMPLES AND SURGICAL SPECIMENS OF LUNG TISSUE

YU. S. ALYAPKINA<sup>1,2</sup>, A. A. ELOV<sup>1</sup>, L. K. SHIPINA<sup>1</sup>, M. A. VLADIMIRSKIY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russia

<sup>2</sup>ООО Sintol, Moscow, Russia

**The objective of the study:** to investigate the effectiveness of real-time PCR for express drug susceptibility testing in drug resistant pulmonary tuberculosis patients using sputum samples and specimens of lung tissue collected during surgery.

**Subjects and methods.** 231 sputum samples and 240 biopsy specimens collected during surgery were tested with the use of real-time PCR and multi-competitive allele-specific real-time PCR.

**Results:** the positive results of testing for MTB DNA were obtained in 72.7% of respiratory samples, of which in 61.9%, the number of genomic DNA copies was sufficient for drug susceptibility testing; positive results were observed in 93.3% of biopsy specimens, and in 93% of them the drug resistance of tuberculous mycobacteria was tested. The difference in the effectiveness of drug susceptibility testing of biopsy specimens and respiratory samples was statistically significant:  $p < 0.01$ . When testing respiratory samples, multiple drug resistance (MDR) was detected in 42.3% of cases, and when testing biopsy specimens, MDR was detected in 34.4% of cases. The high effectiveness of real-time PCR and multi-competitive allele-specific real-time PCR was demonstrated when testing biopsy specimens and performing express drug susceptibility testing in tuberculosis patients after surgical treatment.

**Key words:** tuberculous mycobacteria, drug resistance, rifampicin, isoniazid, real-time PCR

**For citations:** Alyapkina Yu.S., Elov A.A., Shipina L.K., Vladimirovskiy M.A. Effectiveness of real-time PCR for express first line drug susceptibility testing of tuberculous mycobacteria using sputum samples and surgical specimens of lung tissue. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2018, Vol. 96, no. 12, P. 18-24. (In Russ.) DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-12-18-24

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.579.21.0012 от 05.06.2014, ID RFMEFI57914X0012)

Распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) является одной из наиболее серьезных причин, препятствующих успешной борьбе с туберкулезом, в том числе в России. Наиболее клинически значимой является устойчивость МБТ к самым эффективным препаратам – рифампицину и изониазиду, которая определяется как множественная лекарственная устойчивость (МЛУ). Для достижения успехов в лечении туберкулеза с МЛУ МБТ важно быстрое определение спектра лекарственной устойчивости возбудителя, на основе которого будет подобрана схема лечения.

Молекулярно-биологические методы определения устойчивости МБТ к основным противотуберкулезным препаратам решают эту задачу за 1-2 дня, а также служат средством контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов и для своевременного эпидемиологического расследования их трансмиссии. Широко используются в практике противотуберкулезной службы секвенирование нуклеотидных последовательностей с определением мутаций в генах МБТ, кодирующих мишени лекарственных веществ [8], различные методы, основанные на технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей гибридизацией (биочипы – MTBDR plus, Hain) [5] и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) (GenXpert [7], Амплитуб [3, 6]). Хорошо изучены и установлены наиболее часто встречающиеся мутации, связанные с возникновением устойчивости МБТ: к рифампицину – в гене *rpoB*, к изониазиду – в генах *katG* и *inhA*. Нами разработан на основе мультиконкурентной аллель-специфичной технологии ПЦР-РВ эффективный и технически доступный метод быстрого определения лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам 1-го и 2-го рядов: изониазиду и рифампицину [3, 6], этамбутолу [2], фторхинолонам и аминогликозидам [1]. Метод использован для создания наборов «Амплитуб-МЛУ-РВ» и «Амплитуб-FQ-РВ», которые зарегистрированы Росздравнадзором в 2010 г. (№ ФСР 2010/07636) и 2017 г. (№ РЗН 2017/5772), а также для широкого исследования распространенности штаммов МБТ, устойчивых к рифампицину и изониазиду, особенно среди впервые выявленных больных туберкулезом [3]. Вышеуказанные альтернативные методы имеют ряд важных практических недостатков. Так, GenXpert позволяет определять лекарственную устойчивость МБТ только к одному препарату – рифампицину, также у больных туберкулезом с положительными результатом микроскопии мокроты его чувствительность составляет всего 89%, а при положительном культуральном исследовании и отрицательной микроскопии – он лишь в 67% случаев определяет МБТ [7]. Технология MTBDR (Hain) включает стадии гибридизации и визуализации амплифицированных продуктов ПЦР, требует дополнительного помещения и существенно дороже российской технологии.

Цель исследования: изучить эффективность применения технологии ПЦР-РВ для быстрого определения у больных туберкулезом легких лекарственной устойчивости МБТ в образцах мокроты и биоптатах ткани легких, полученных во время операции.

## Материалы и методы

Изучены биологические образцы от больных туберкулезом легких: 231 респираторный образец (мокрота – 214 образцов, бронхоальвеолярная жидкость – 14, плевральный экссудат – 3) и 240 биоптатов ткани легкого, полученных при хирургическом лечении. Основная часть респираторных образцов (194) получена от впервые выявленных больных туберкулезом; 37 – от ранее леченных. Биопсийные образцы ткани легкого получены при резекции легких, выполненных у 178 пациентов с хронически текущим туберкулезом и у 62 впервые выявленных или получавших противотуберкулезную химиотерапию менее 6 мес. пациентов.

### *Пробоподготовка и выделение ДНК из образцов мокроты*

Образцы мокроты разжижали в пробирках объемом 50 мл с помощью равного объема 4%-ного раствора NaOH при инкубировании в течение 10-15 мин, центрифугировали 15 мин при 3 000 об/мин и выделяли ДНК из полученных осадков в пробирках типа Эппендорф объемом 1,5 мл с помощью набора «М-Сорб-Туб» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией.

### *Пробоподготовка и выделение ДНК из образцов биоптатов*

Образцы биоптатов гомогенизировали в полном объеме в фарфоровой ступке и переносили в пробирку объемом 50 мл. К материалу добавляли инактивирующий микобактерии реагент (ООО «Ниармедик», РУ №ФСР 2012/13128, Россия) в пропорции 1:1, но не менее 1 мл. Содержимое пробирки перемешивали до полной гомогенизации на орбитальном шейкере и инкубировали при комнатной температуре в течение как минимум 1 ч для инактивации. Инактивированный разжиженный материал центрифугировали при 3 000 об/мин 15 мин и удаляли надосадочную жидкость. Пастеровской пипеткой отбирали 1 мл полученного осадка в 1,5-мл пробирку, центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость до остаточного объема супернатанта не более 0,2 мл. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора «М-Сорб-Туб» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией.

Обнаружение и количественный анализ МБТ проводили с помощью ПЦР-РВ, используя набор «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия), основанный на анализе двух специфичных для микобактерий туберкулезного комплекса генных фрагментов: мультикопийной вставки IS6110 и однокопийного

гена *regX3*. Одновременное использование двух специфичных фрагментов, с одной стороны, повышает достоверность анализа, а с другой – позволяет проводить точный количественный анализ клеток МБТ в образце, получить уже на этом этапе первичную информацию о копийности *IS6110* и, следовательно, о штамме *M. tuberculosis complex*.

Определение лекарственной устойчивости МБТ с помощью ПЦР-РВ

Для определения лекарственной устойчивости образцов к рифампицину и изониазиду использовали набор реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия), основанный на мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР-РВ (АС-ПЦР-РВ) [3].

Мультиконкурентная АС-ПЦР-РВ основана на конкурентном встраивании аллель-специфичных праймеров с различными нуклеотидами на 3'-конце. В одной пробирке одновременно можно определять до трех точек мутаций.

Набор реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ» определяет 11 мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину – наиболее часто встречаемые мутации в кодонах 531, 526, 516 и 533 гена *rpoB* МБТ, и 6 мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, – 3 мутации в 315-м кодоне гена *katG* и 3 мутации в гене *inhA*. Анализируемые мутации составляют 8 реакционных смесей для проведения различных реакций мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ. Каждая реакционная смесь анализируется в одной пробирке, пробирки объединены между собой и анализируются одновременно в одинаковых условиях амплификации. Технологически все пробирки объединены в стрип, предназначенный для анализа одного образца и содержащий 8 пробирок с уже внесенными концентрированными реакционными смесями (рис. 1).

Статистический сравнительный анализ результатов исследований проводили с использованием метода Пирсона [4].

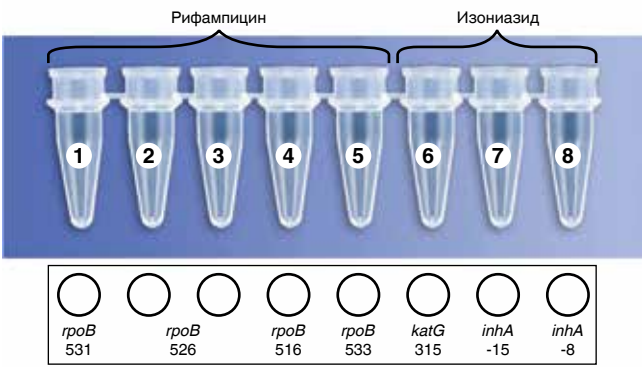


Рис. 1. Схема стрипа, предназначенного для выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду

Fig. 1. The chart of the strip, used for detection of mutations, associated with resistance to rifampicin and isoniazid

Результаты исследований

При исследовании 231 клинического респираторного образца (табл. 1, 2) 168 (72,7%) образцов были положительными по обоим генам, т. е. была идентифицирована ДНК МБТ, в том числе 140/194 (72,2%) образцов получены от впервые выявленных пациентов и 28/37 (75,7%) – от ранее леченных. Среднее число геномных копий ДНК МБТ, рассчитанных по однокопийному гену *regX*, в образцах впервые выявленных пациентов и образцах ранее леченных пациентов значимо не отличалось и составило в среднем  $2,8 \times 10^4$  в образце. Однако в 72 положительных образцах количество копий гена *regX* не превышало  $10^2$  на образец. Несмотря на столь низкое число геномных копий в 8 образцах, определение лекарственной устойчивости/чувствительности также было проведено.

Таким образом, определение лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду выполнено для 104 респираторных образцов – 62% от 168 положительных образцов (табл. 1).

Таблица 1. Результаты исследования различного диагностического материала

Table 1. The test results when using different diagnostic specimens

Материал	Всего	Отрица- тельные	Положительные						
			< 10 <sup>2</sup> копий regX МБТ	> 10 <sup>2</sup> копий regX МБТ	определение лекарственной устойчивости				
					всего	чувствительные	устойчивые		
							H+R+	H+R-	H-R+
Респираторные образцы									
Мокрота	214	59	67	88	96	41	42	10	3
БАЛЖ	14	2	4	8	8	3	2	3	-
Экссудат	3	2	1	-	-	-	-	-	-
Всего	231	63	72	96	104	44	44	13	3
Образцы резекционных материалов									
Биоптаты (фрагменты тканей)	182	10	12	160	163	75	55	30	3
Биоптаты в п/жидкой форме	51	3	5	43	46	21	17	6	2
Парафиновые блоки	7	3	4	-	-	-	-	-	-
Всего	240	16	21	203	209	96	72	36	5

**Таблица 2. Результаты исследования клинических образцов, полученных от разных групп пациентов**  
*Table 2. The test results when using samples obtained from different groups of patients*

Пациенты	Всего	Отрицательные	Положительные					
			Всего	определение лекарственной устойчивости				
				всего	чувствительные	устойчивые (абс./%)		
						H+R+	H+R-	H-R+
Респираторные образцы								
Впервые выявленные	194	54	140	86	39	32/37,2	12/13,9	3/3,5
Ранее леченные	37	9	28	18	5	12/66,6	1	-
Всего	231	63	168	104	44	44 /42,3	13/12,5	3/2,9
Образцы операционного материала								
Впервые выявленные	62	10	52	48	20	12/25	13/27	3/6,2
Ранее леченные	178	6	172	161	76	60/37,2	23/14,3	2/1,2
Всего	240	16	224	209	96	72 /34,4	36/17,2	5/2,4
Все исследованные образцы								
Впервые выявленные	256	64	192	134	59	44/32,8	25 /18,6	6/4,5
Ранее леченные	215	15	200	179	81	72/40,2	24/13,4	2/1,1
Всего	471	79	392	313	140	116/37	49/15,6	8/2,5

Результаты анализа ДНК-мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, представлены в табл. 1, 2. МЛУ МБТ установлена среди пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких в 37,2% случаев, среди ранее леченных – в 66,6%, всего в среднем в 42,3%. Лекарственная устойчивость только к изониазиду при сохранении чувствительности к рифампицину установлена в среднем у 12,5% пациентов. Моноустойчивость к рифампицину при сохранении чувствительности к изониазиду выявлена у 2,9% пациентов.

*Исследование биоптатов ткани легкого*

Всего исследовано 240 биоптатов ткани легкого, полученных при хирургическом лечении туберкулеза (178 пациентов с хронически текущим туберкулезом, длительно леченные и 62 – впервые выявленные или получавшие противотуберкулезную химиотерапию менее 6 мес.). Основная часть исследованных биоптатов представляла собой фрагменты резецированных пораженных тканей легких (192 биоптата), 41 образец был в полужидком виде, еще 7 образцов тканей – в парафиновых блоках. ДНК МБТ обнаружена в 224/240 (93,3%) образцах, из них в 203 образцах количество клеток МБТ в каждом составило более 10<sup>2</sup> при расчете по однокопийному гену *regX* МБТ, в среднем 3 × 10<sup>4</sup> геномных копий. Всего выявление ДНК МБТ в биоптатах составило 220/233 (94,4%), для образцов в парафиновых блоках – 4/7 (57,1%) (табл. 1, 2).

Для 209 образцов (93,3% от 224 положительных) (табл. 1, 2) с помощью определения мутаций ДНК МБТ установлена чувствительность/устойчивость к двум препаратам – рифампицину и изониазиду. Общее число образцов с МЛУ составило 72/209 (34,4%), в том числе среди впервые выявленных пациентов или леченных не более 6 мес. – 12/48 (25,0%), среди ранее леченных –

60/161 (37,2%). Число образцов с устойчивостью к изониазиду составило в среднем 36/209 (17,2%). Устойчивость к рифампицину при сохранении чувствительности к изониазиду составила 5/209 (2,4%).

Анализ культуральных исследований образцов мокроты у 173 больных туберкулезом легких, биоптаты которых были исследованы с помощью мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ, показал, что в 74% (128 случаев) рост МБТ не определялся как при использовании метода Левенштейна – Йенсена, так и жидкой питательной среды в системе Bactec.

*Характеристика выявленных ДНК-мутаций*

Результаты определения ДНК мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, представлены в табл. 3 и на рис. 2.

Среди 116 образцов ДНК МБТ с определенной МЛУ 89,6% (104 образца) составили образцы с сочетанием мутаций в кодоне 531 гена *rpoB*, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, и мутаций в 315-м кодоне гена *katG* и/или мутаций в промоторном регионе гена *inhA*, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду; 74% (86 образцов) МЛУ-образцов составила комбинация мутаций в 531-м кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu (TCG-TTG) и 315-м кодоне гена *katG* с заменой Ser-Thr1 (AGC-ACC). Восемь образцов имели сочетание мутаций в 516-м кодоне гена *rpoB* и в 315-м кодоне гена *katG* и/или мутаций в гене *inhA*, 2 образца – мутации в 533-м кодоне гена *rpoB* и в 315-м кодоне гена *katG*.

Таким образом, среди мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, наиболее часто встречаемой являлась замена Ser-Leu в 531-м кодоне гена *rpoB*. Она встречается в 108 (87%) образцах ДНК из 124, в которых обнаружены какие-либо мутации гена *rpoB*. В других образцах ДНК МБТ, устойчивых к рифампицину, найдены следующие



Таблица 3. Мутации, выявленные в гене *rpoB*, ассоциирующиеся с устойчивостью к рифампицину, и в генах *katG* и *inhA*, ассоциирующиеся с устойчивостью к изониазиду

Table 3. Mutations identified in the gene *rpoB* associated with resistance to rifampicin and in the genes *katG* and *inhA*, associated with resistance to isoniazid

Образцы	Кол-во	Мутации (H+)		Мутации (R+)	
		гены и кодоны	замена	гены и кодоны	замена
H+R+ 116	86	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 531	Ser-Leu TCG-TTG
	16	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 531	Ser-Leu TCG-TTG
		<i>inhA</i>	C(-15)T / T(-8)A/C		
	2	<i>inhA</i>	C(-15)T	<i>rpoB</i> 531	Ser-Leu TCG-TTG
	6	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 516	Asp-Tyr GAC-TAC
	1	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 516	Asp-Val GAC-GTC
	1	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 516	Asp-Val GAC-GTC
		<i>inhA</i>	C(-15)T		
	2	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 533	Leu-Pro CTG-CCG
	1	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 526	His-Arg CAC-CGC
		<i>inhA</i>	C(-15)T		
	1	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	<i>rpoB</i> 526	His-Leu CAC-CTC
		<i>inhA</i>	C(-15)T		
H+R- 49	43	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	-	-
	2	<i>inhA</i>	C(-15)T	-	-
	4	<i>katG</i> 315	Ser-Thr1 AGC-ACC	-	-
		<i>inhA</i>	C(-15)T		
H-R+ 8	5	-	-	<i>rpoB</i> 531	Ser-Leu TCG-TTG
	1	-	-	<i>rpoB</i> 533	Leu-Pro CTG-CCG
	1	-	-	<i>rpoB</i> 531	Ser-Leu TCG-TTG
				<i>rpoB</i> 516	Asp-Tyr GAC-TAC
	1			<i>rpoB</i> 526	His-Arg CAC-CGC

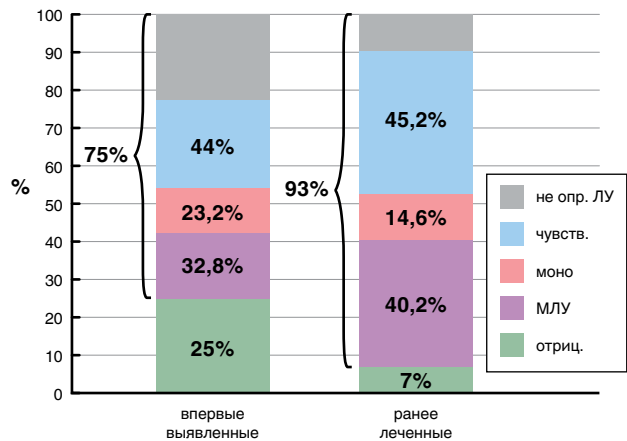


Рис. 2. Результаты выявления МБТ и определения лекарственной устойчивости в клинических образцах среди впервые выявленных (а также менее 6 мес. леченных) и длительно (более 6 мес.) леченных пациентов

Fig. 2. Results of MTB detection and drug susceptibility testing of the clinical samples of newly diagnosed patients (on treatment for less than 6 months) and those treated for a long period of time (over 6 months)

мутации: в 7 (5,6%) образцах – Asp-Tyr (GAC-TAC) и в 2 (1,6%) образцах – Asp-Val (GAC-GTC) в

516-м кодоне гена *rpoB*; в 2 (1,6%) образцах – His-Arg (CAC-CGC) и в 1 (0,8%) образце – His-Leu (CAC-CTC) в 526-м кодоне гена *rpoB*; в 3 (2,4%) образцах – Leu-Pro (CTG-CCG) в 533-м кодоне гена *rpoB*; в 1 образце – сочетание мутаций Ser-Leu в 531-м кодоне и Asp-Tyr в 516-м кодоне гена *rpoB*.

Наиболее часто встречаемой мутацией, ассоциирующейся с устойчивостью к изониазиду, является Ser-Thr1 (AGC-ACC) в 315-м кодоне гена *katG*, обнаруженная в 160/165 (97%) образцах. В 4 (2,4%) образцах найдена единственная мутация C(-15)T в гене *inhA*, а в 22 (13,3%) – комбинация мутаций Ser-Thr1 в 315-м кодоне гена *katG* и C(-15)T или T(-8)A/C в гене *inhA*.

При очень высокой чувствительности определения ДНК МБТ не все положительные образцы могут быть достаточными для определения лекарственной устойчивости. Из 214 образцов мокроты ДНК МБТ определены в 155/214 (72,4%) образцах, при этом количество ДНК на уровне не менее 100 геномных копий *regX*, надежно обеспечивающих определение лекарственной чувствительности/устойчивости в исследуемом образце, было обнаружено лишь в 96/155 (61,9%) из них. При исследовании 224 положительных биопсийных образцов число пригодных для определения лекарственной чувствительности составило 209/224 (93,3%).

При исследовании биопсийного материала методом мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ статистически значимо чаще (критерий  $\chi^2$ ,  $p < 0,01$ ) можно получить образцы, пригодные для определения лекарственной чувствительности МБТ, чем при исследовании мокроты.

В большинстве случаев количество геномных копий ДНК МБТ по однокопийному гену *regX* было на 2 порядка выше и более в биопсийных образцах по сравнению с образцами мокроты. При исследовании образцов мокроты и биопсий определена в 12,5 и 17,2% случаев соответственно устойчивость только к изониазиду и в 2,9 и 2,4% соответственно – только к рифампицину. При исследовании биоптатов доля штаммов МБТ, устойчивых только к изониазиду, составила 17,2%, а устойчивых только к рифампицину – 2,4%. Суммарное значение МЛУ составило 37%, а устойчивости только к изониазиду – 15,6%.

Таким образом, исследование биоптатов с использованием технологии ПЦР-РВ является весьма эффективным и быстрым методом получения данных о лекарственной чувствительности/устойчивости при хирургических вмешательствах у больных туберкулезом.

### Заключение

Применение технологии ПЦР-РВ и мультиконкурентной АС-ПЦР-РВ при исследовании респи-

раторных и биопсийных образцов обеспечивает быстрое и эффективное определение лекарственной устойчивости возбудителя у больных туберкулезом. Положительные результаты определения ДНК МБТ в респираторных образцах получены в 72,4% случаев, из которых в 61,9% случаев число определившихся геномных копий ДНК было достаточным для анализа лекарственной устойчивости МБТ. В биопсийных образцах число положительных результатов составило 224/240 (93,3%), из которых в 209/224 (93,3%) было успешно проведено исследование по определению лекарственной устойчивости МБТ. Различия в эффективности исследования биоптатов и респираторных образцов по определению лекарственной устойчивости были статистически значимы:  $p < 0,01$ . При исследовании респираторных образцов МЛУ установлена в 42,3% случаев, устойчивость только к изониазиду – в 12,5% случаев, а при исследовании биоптатов МЛУ установлена в 34,4%, устойчивость только к изониазиду – в 17,2% случаев. В среднем МЛУ в группе пациентов впервые выявленных или лечившихся не более 6 мес. составила 32,8%, а в группе длительно лечившихся – 40,2%. Различия в числе случаев лекарственной устойчивости между респираторными и биопсийными образцами не были статистически значимыми. Различий между результатами лекарственной устойчивости, определявшихся в образцах мокроты и биопсийных образцах, не установлено.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

**Conflict of Interests.** The authors state that they have no conflict of interests.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Аляпкина Ю. С., Алексеев Я. И., Варламов Д. А., Домотенко Л. В., Шипина Л. К., Владимирский М. А. Разработка технологии ПЦР в реальном времени для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам резервного ряда: фторхинолонам, амикацину, капреомидину // Туб. и болезни легких. – 2014. – № 12. – С. 69-75.
2. Аляпкина Ю. С., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Алексеев Я. И., Черноусова Л. Н., Владимирский М. А. Изучение спектра и частоты встречаемости мутаций гена *embB* микобактерий туберкулезного комплекса, ассоциируемых с устойчивостью к этамбутолу, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Туб. и болезни легких. – 2017. – № 11. – С. 27-35.
3. Владимирский М. А., Аляпкина Ю. С., Варламов Д. А., Алексеев Я. И. и др. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза // Пробл. туб. – 2008. – № 4. – С. 38-44.
4. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М., 1975 г. – С. 162.
5. Abanda N. N., Djiengoue J., Lim E. et al. Diagnostic accuracy and usefulness of the Genotype MTBDR plus assay in diagnosing multidrug resistant tuberculosis Cameroon. Cross-sectional study // BMC infectious diseases. – 2017. – Vol. 17. – P. 379.
6. Alyapkina Yu. S., Vladimirovsky M. A., Varlamov D. A., Alekseev J. I., Shipina L. K. Rapid detection of *M. tuberculosis* gene mutations associated with drug resistance by modified allele-specific real-time PCR // Abstracts 16-th ERS Annual Congress, September 2006, Europe Resp. J. – 2006. – Vol. 28, suppl. 50. – P. 3456.

### REFERENCES

1. Alyapkina Yu.S., Alekseev Ya.I., Varlamov D.A., Domotenko L.V., Shipina L.K., Vladimirovsky M.A. Development of real time PCR technology for rapid drug susceptibility testing of tuberculous mycobacteria to second line drugs: fluoroquinolones, amikacin, capreomicin. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2014, no. 12, pp. 69-75. (In Russ.)
2. Alyapkina Yu.S., Larionova E.E., Smirnova T.G., Alekseev Ya.I., Chernousova L.N., Vladimirovsky M.A. Investigation of ranges and frequency of mutations in the *embB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* associated with resistance to ethambutol using real-time polymerase chain reaction. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, no. 11, pp. 27-35. (In Russ.)
3. Vladimirovsky M.A., Alyapkina Yu.S., Varlamov D.A., Alekseev Ya.I. et al. Use of real-time PCR for detection and monitoring of transmission of drug resistant strains of tuberculous mycobacteria. *Probl. Tub.*, 2008, no. 4, pp. 38-44. (In Russ.)
4. Urbakh V.Yu. *Statisticheskiy analiz v biologicheskikh i meditsinskikh issledovaniyakh*. [Statistic analysis in biological and medical research]. Moscow, 1975, pp. 162.
5. Abanda N.N., Djiengoue J., Lim E. et al. Diagnostic accuracy and usefulness of the Genotype MTBDR plus assay in diagnosing multidrug resistant tuberculosis Cameroon. Cross-sectional study. *BMC Infectious Diseases*, 2017, vol. 17, pp. 379.
6. Alyapkina Yu.S., Vladimirovsky M.A., Varlamov D.A., Alekseev J.I., Shipina L.K. Rapid detection of *M. tuberculosis* gene mutations associated with drug resistance by modified allele-specific real-time PCR. Abstracts 16-th ERS Annual Congress, September 2006. *Europ. Resp. J.*, 2006, vol. 28, suppl. 50, pp. 3456.

7. Steingart K. R., Schiller I., Horne D. J., Pai M., Boehme C. C., Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review) // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2014. № 1. – P. 1-166.
8. Walker T. M., Kohl Th. A., Omar Sh. V., Hedge J. et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study // *Lancet Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 15. – P. 1193-1202.
7. Steingart K.R., Schiller I., Horne D.J., Pai M., Boehme C.C., Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2014, no. 1, pp. 1-166.
8. Walker T.M., Kohl Th.A., Omar Sh.V., Hedge J. et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, pp. 1193-1202.

## ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ,  
127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4.

**Аляпкина Ю. С.**

докторант.  
Тел.: 8 (495) 681-74-32.  
E-mail: yulisyntol@mail.ru

**Елов А. А.**

ведущий научный сотрудник.  
Тел.: 8 (495) 681-96-03.  
E-mail: anyol@mail.ru

**Шипина Л. К.**

старший научный сотрудник.  
Тел.: 8 (495) 681-96-03.  
E-mail: tntn21@yandex.ru

**Владимирский М. А.**

заведующий лабораторией инфекционной иммунологии и биотехнологии.  
Тел.: 8 (495) 681-74-32.  
E-mail: mvladimirskij@mail.ru

## FOR CORRESPONDENCE:

National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases,  
4, Dostoevsky St.,  
Moscow, 127473

**Alyapkina Yu.S.**

Doctoral Student.  
Phone: +7 (495) 681-74-32  
Email: yulisyntol@mail

**Elov A.A.**

Leading Researcher.  
Phone: +7 (495) 681-96-03.  
Email: anyol@mail.ru

**Shipina L.K.**

Senior Researcher.  
Phone: +7 (495) 681-96-03.  
Email: tntn21@yandex.ru

**Vladimirskiy M.A.**

Head of Infectious Immunology and Biotechnology Laboratory.  
Phone: +7 (495) 681-74-32.  
Email: mvladimirskij@mail.ru

Поступила 03.03.2018

Submitted as of 03.03.2018