



## ВЛИЯНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ В ДИАГНОСТИЧЕСКОМ АЛГОРИТМЕ МЕТОДА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ \*

Л. В. ПЕТРОВА<sup>1</sup>, Э. В. СЕВАСТЬЯНОВА<sup>2</sup>, А. М. ВАСИЛЬЕВА<sup>1</sup>, Е. А. КУКЛИНА<sup>1</sup>, Ю. А. СОЛОВЬЕВ<sup>1</sup>, Л. Н. ЧЕРНОУСОВА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБУ РМЭ «Республиканский противотуберкулезный диспансер», г. Йошкар-Ола, РФ

<sup>2</sup>ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва, РФ

**Цель исследования:** изучить влияние применения в алгоритме микробиологической диагностики туберкулеза молекулярно-генетического метода ПЦР-РВ на эффективность химиотерапии у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью в Республике Марий Эл.

**Материалы и методы.** В исследование включено 344 больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью. Эффективность проводимой химиотерапии оценивали по показателю прекращения бактериовыделения, определяемого методом посева.

**Результаты.** Показано, что применение метода ПЦР-РВ для определения в образцах диагностического материала мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, и раннее назначение на основании данного исследования соответствующей схемы химиотерапии с последующей коррекцией схемы лечения по результатам фенотипических методов тестирования лекарственной устойчивости позволяет существенно (в среднем с 3,6 до 2,5 мес.,  $p < 0,05$ ) сократить сроки прекращения бактериовыделения, определяемого методом посева, что сократило сроки стационарного лечения больных.

**Ключевые слова:** микробиологическая диагностика туберкулеза, молекулярно-генетический метод ПЦР-РВ, эффективность химиотерапии, прекращение бактериовыделения

**Для цитирования:** Петрова Л. В., Севастьянова Э. В., Васильева А. М., Куклина Е. А., Соловьев Ю. А., Черноусова Л. Н. Влияние применения в диагностическом алгоритме метода ПЦР в реальном времени на эффективность лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2019. – Т. 97, № 9. – С. 40-44. <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-9-40-44>

## APPROACHES TO ORGANIZATION OF RESPIRATORY TUBERCULOSIS DETECTION WHEN ITS PREVALENCE IS DECREASING

L. V. PETROVA<sup>1</sup>, E. V. SEVASTYANOVA<sup>2</sup>, A. M. VASILIEVA<sup>1</sup>, E. A. KUKLINA<sup>1</sup>, YU. A. SOLOVIEV<sup>1</sup>, L. N. CHERNOUSOVA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Republican TB Dispensary, Yoshkar-Ola, Russia

<sup>2</sup>Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

**The objective of the study:** to investigate the effect of the molecular genetic test of PCR-RT within the procedure of microbiological diagnosis of tuberculosis on the efficacy of chemotherapy in patients with multiple drug resistant tuberculosis in the Mary-El Republic.

**Subjects and methods.** 344 patients with multiple drug resistant tuberculosis were enrolled in the study. The efficacy of chemotherapy was assessed based on sputum conversion confirmed by culture.

**Results.** It was demonstrated that PCR-RT for determining mutations in the diagnostic material samples associated with drug resistance to rifampicin, isoniazid, and fluoroquinolones, and the early prescription of an adequate chemotherapy regimen based on this study, followed by amendment of the treatment regimen according to the results of phenotypic drug susceptibility tests, significantly (on average from 3.6 to 2.5 months,  $p < 0.05$ ) reduced the time required for sputum conversion confirmed by culture, which reduced the time of in-patient treatment.

**Key words:** microbiological diagnosis of tuberculosis, the molecular genetic test of PCR-RT, chemotherapy efficacy, sputum conversion

**For citations:** Petrova L.V., Sevastyanova E.V., Vasilieva A.M., Kuklina E.A., Soloviev Yu.A., Chernousova L.N. The effect of real-time PCR as a part of diagnostic procedure on the efficacy of treatment of multiple drug resistant tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2019, Vol. 97, no. 9, P. 40-44. (In Russ.) <http://doi.org/10.21292/2075-1230-2019-97-9-40-44>

В Республике Марий Эл (РМЭ) частота выявления туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) среди бактериовыделителей неуклонно растет, и в 2017 г., по данным, рассчитанным в бактериологической лаборатории Республиканского противотуберкулезного диспансера (РПТД), составила 20,9%.

В соответствии с отечественными нормативными документами [2, 4] с 2015 г. в диагностические алгоритмы микробиологической диагностики туберкулеза включены обязательные экспресс-методы определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (ЛУ МБТ) к ряду основных и резервных противотуберкулезных пре-

\* Работа выполнена в рамках темы НИР № 0515-2019-0015 «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам»

паратов (ПТП), основанные на детекции мутаций, ассоциированных с ЛУ, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Их применение позволяет в кратчайшие сроки назначать больным МЛУ-ТБ адекватный режим лечения и снижает трансмиссию туберкулеза [1, 3].

Кроме картриджной GeneXpert МТВ/RIF и ДНК-стриповой технологий, одним из наиболее распространенных в РФ методов молекулярно-генетического исследования является мультиплексная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Эта отечественная технология весьма успешно применяется во многих лабораториях, так как использует недорогие тест-системы и дает возможность определять ЛУ к трем ПТП (рифампицин, изониазид и фторхинолоны). С 2012 г. метод ПЦР-РВ включен в алгоритм микробиологической диагностики туберкулеза, применяемый в РМЭ.

Цель исследования: изучить влияние применения метода ПЦР-РВ для быстрого определения ЛУ непосредственно из диагностического материала и раннего назначения на основании полученных результатов адекватной химиотерапии (ХТ) на эффективность прекращения бактериовыделения у больных с МЛУ-ТБ в РМЭ.

### Материалы и методы

В данное ретроспективное исследование включено 344 больных МЛУ-ТБ, проходивших лечение в РПТД РМЭ. Больные разделены на 2 группы.

В 1-ю группу включено 196 больных МЛУ-ТБ, которые находились на лечении в РПТД РМЭ с 2009 по 2011 г. и у которых мокрота исследовалась при люминесцентной микроскопии и посевом на плотных питательных средах (ППС).

Больным 1-й группы изначально эмпирически назначался I режим ХТ. Коррекция схемы ХТ проводилась после получения результатов фенотипического тестирования лекарственной чувствительности (ТЛЧ) возбудителя методом абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна – Йенсена к ПТП 1-го и 2-го рядов (изониазид, рифампицин, этамбутол, стрептомицин, офлоксацин, этионамид, канамицин, капреомицин, циклосерин, ПАСК). Средний срок получения результата ЛЧ МБТ с момента посева мокроты составил 56 дней. Коррекция ХТ потребовалась всем 196 больным данной группы.

Во 2-ю группу вошли 148 больных МЛУ-ТБ, которые находились на лечении в РПТД РМЭ с 2015 по 2017 г. Алгоритм микробиологического исследования включал микроскопическое исследование мокроты, посевы на ППС и жидкую среду в системе Bactec MGIT 960, а также исследование молекулярно-генетическим методом ПЦР-РВ для выявления ДНК МБТ и (при обнаружении достаточного количества ДНК) определения мутаций, ассоциированных с ЛУ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам. Далее, после получения культуры

МБТ, проводился ТЛЧ к ПТП 1-го ряда на жидких средах в системе Bactec MGIT 960 и одновременно ТЛЧ на ППС Левенштейна – Йенсена методом абсолютных концентраций ко всему спектру ПТП. Кроме того, эта же культура тестировалась методом ПЦР-РВ на наличие мутаций, ассоциированных с ЛУ к ПТП, в том случае, если данный вид исследования не был проведен непосредственно из мокроты. Средний срок получения результата ЛУ МБТ из диагностического материала методом ПЦР-РВ составил 2 дня с момента поступления материала в лабораторию, методом Bactec MGIT 960 на жидких средах – 22,5 дня с момента посева диагностического материала.

Больным 2-й группы изначально назначали IV режим ХТ по результатам, полученным методом ПЦР-РВ из образца мокроты. Последующая коррекция ХТ (при необходимости) проводилась после получения результатов ТЛЧ фенотипическими методами на жидких и плотных средах.

Для статистической обработки полученных результатов рассчитывали доверительный интервал и критерий Пирсона  $\chi^2$ .

### Результаты исследования

Проведена сравнительная оценка результатов лечения в двух группах больных. Эффективность ХТ ретроспективно оценивали по срокам прекращения бактериовыделения, подтвержденного методом посева.

До начала ХТ бактериовыделение, определяемое методом посева, было у всех больных обеих групп. Динамика прекращения бактериовыделения в процессе ХТ представлена в таблице.

Из данных, приведенных в таблице, следует, что во 2-й группе больных абациллирование происходило статистически значимо быстрее по сравнению с 1-й группой.

В 1-й группе больных за 21 мес. ХТ бактериовыделение прекратилось у 157/196 (80,1%) больных. Из 196 больных этой группы у 20 лечение признано неэффективным, а 19 – умерло по разным причинам, не исключая туберкулез.

Во 2-й группе из 148 больных бактериовыделение прекратилось у 116 (78,4%), последний из которых был абациллирован через 11 мес. ХТ. Лечение было неэффективно у 13 больных, умерло 19 больных.

Установлено, что средний срок прекращения бактериовыделения в 1-й и 2-й группах составил 3,6 и 2,5 мес. соответственно ( $p < 0,05$ ).

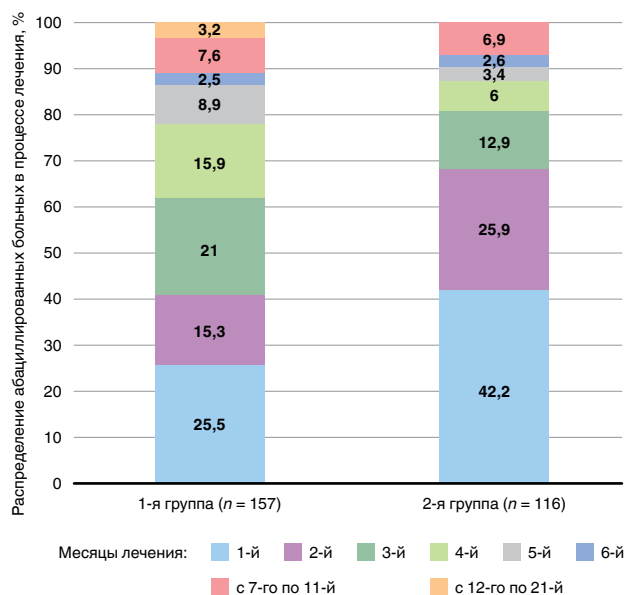
Распределение больных (%) по временным промежуткам ХТ среди прекративших бактериовыделение в 1-й и 2-й группах представлено на рис.

Отметим, что в 1-й группе бактериовыделение наиболее интенсивно прекращалось в течение первых 4 мес. лечения, но значительная часть больных – 35/157 (22,3%) – прекратили бактериовыделение лишь после длительного срока лечения.

**Таблица.** Частота и сроки прекращения бактериовыделения (методом посева) в группах больных

Table. The frequency and time frames of sputum conversion in the groups of patients

Срок ХТ (мес.)	Число больных, абацелированных к концу указанного срока ХТ					
	1-я группа (n = 196)		2-я группа (n = 148)		$\chi^2$	$p_{1-2}$
	абс.	%	абс.	%		
1	40	20,4	49	33,1	6,45	0,01
2	64	32,7	79	53,4	14,07	0,0008
3	97	49,5	94	63,5	6,16	0,01
4	122	62,2	101	68,2	1,08	0,3
5	136	69,4	105	70,9	0,04	0,85
6	140	71,4	108	73,0	0,04	0,85
7	141	71,9	108	73,0	0,0087	0,93
8	146	74,5	110	74,3	0,0005	1,0005
9	149	76,0	114	77,0	0,0085	0,93
10	151	77,0	115	77,7	0,0007	0,99
11	152	77,6	116	78,4	0,0031	0,96
12	153	78,1	-	-	-	-
13	154	78,6	-	-	-	-
14	154	78,6	-	-	-	-
15	154	78,6	-	-	-	-
16	155	79,1	-	-	-	-
17	155	79,1	-	-	-	-
18	155	79,1	-	-	-	-
19	156	79,6	-	-	-	-
20	156	79,6	-	-	-	-
21	157	80,1	-	-	-	-

**Рис.** Распределение больных (%) по временным промежуткам ХТ среди прекративших бактериовыделение**Fig.** The distribution of patients (%) as per chemotherapy time intervals among those who achieved sputum conversion

Во 2-й группе максимальное число больных было абацелировано уже в 1-3-й мес. ХТ – 94/116 (81%), что статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ) анало-

гичного показателя в 1-й группе, который составил 61,8%.

В данной работе не удалось добиться повышения итогового показателя абацелирования во 2-й группе – 116/148 (78,4%) по сравнению с 1-й группой – 157/196 (80,1%). Скорее всего это связано с тем, что в РМЭ в указанный период наблюдения в схемах ХТ применялось ограниченное количество ПТП. Среди больных МЛУ-ТБ, включенных в настоящее исследование, присутствовали в том числе и больные туберкулезом с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ). Из-за невозможности использования для них в схемах ХТ новых ПТП, таких как линезолид и бедаквилин, которые начали применять в РМЭ только с 2017 г., лечение больных ШЛУ-ТБ было зачастую неэффективно.

Однако в тех случаях, когда у больных МЛУ-ТБ не наблюдалось тотальной устойчивости к ПТП, используемым в схемах лечения в РМЭ, применение в диагностическом алгоритме молекулярно-генетического экспресс-метода ПЦР-РВ в сочетании с ускоренным методом Vactec MGIT 960 позволило добиться абацелирования пациентов в статистически значимо более короткие сроки и тем самым снизить риск трансмиссии туберкулеза.

Помимо этого, использование отечественной технологии ПЦР-РВ для экспресс-детекции мутаций, ассоциированных к ПТП, и немедленное назначение больным МЛУ-ТБ рациональной схемы ХТ по-

зволило сократить сроки пребывания этих больных в стационаре за счет более раннего прекращения у них бактериовыделения по сравнению с больными, для которых указанный метод диагностики не использовали и применяли эмпирический режим лечения. Выполненные расчеты показали, что в РМЭ в 2016 г. экономия средств на стационарном лечении 59 больных МЛУ-ТБ, при выявлении у них устойчивости к изониазиду и рифампицину методом ПЦР-РВ (впервые выявленные и рецидив), составила более 4 млн руб.

### Заключение

Проведенные исследования показали, что применение в диагностическом алгоритме молекулярно-генетического метода ПЦР-РВ оказывает по-

ложительное влияние на эффективность лечения больных МЛУ-ТБ, оцениваемую по срокам прекращения бактериовыделения, определяемого методом посева.

Использование метода ПЦР-РВ, выполняемого непосредственно из диагностического материала, для экспресс-определения мутаций, ассоциированных с ЛУ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, дает возможность немедленно назначить больному МЛУ-ТБ соответствующую схему ХТ, которая в дальнейшем при необходимости корректируется с учетом полученных результатов ТЛЧ фенотипическими методами. Указанная тактика позволила добиться абациллирования больных МЛУ-ТБ статистически значимо в более короткие сроки, что сократило сроки стационарного лечения больных МЛУ-ТБ в РМЭ.

**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. Буракова М. В., Васильева И. А., Ваниев Э. В., Багдасарян Т. Р., Самойлова А. Г. Эффективность химиотерапии туберкулеза легких у впервые выявленных пациентов при разных сроках определения множественной лекарственной устойчивости возбудителя // Туб. и болезни легких. – 2017. – № 11. – С. 63-66.
2. Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания: приказ МЗ РФ от 29.12.2014 г. № 951.
3. Самойлова А. Г., Буракова М. В., Васильева И. А., Ленская В. В., Ваниев Э. В. Влияние экспресс-детекции резистентности *M. tuberculosis* к рифампицину на эффективность химиотерапии больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя // Туб. и болезни легких. – 2016. – № 9. – С. 16-21.
4. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. РОФ. – М., 2015. – 35 с.

### ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ГБУ РМЭ «Республиканский противотуберкулезный диспансер»,  
424037, Республика Марий Эл, г. Йошкар-Ола,  
ул. Больничная, д. 22.

#### **Петрова Людмила Витальевна**

заведующая бактериологической лабораторией.  
Тел.: 8 (8362) 45-88-64.  
E-mail: lvps@bk.ru

#### **Васильева Алла Михайловна**

заместитель главного врача  
по организационно-методической работе.  
Тел.: 8 (8362) 42-64-70.  
E-mail: omk.rptd@minzdrav12.ru

### REFERENCES

1. Burakova M.V., Vasilyeva I.A., Vaniev E.V., Bagdasaryan T.R., Samoylova A.G. Efficacy of pulmonary tuberculosis chemotherapy in new cases depending on the time of drug resistance detection. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2017, no. 11, pp. 63-66. (In Russ.)
2. Clinical recommendations on improvement of diagnostics and treatment of respiratory tuberculosis. Approved by Edict no. 951 by the Russian Ministry of Health as of 29.12.2014. (In Russ.)
3. Samoylova A.G., Burakova M.V., Vasilyeva I.A., Lenskaya V.V., Vaniev E.V. The impact of express rifampicin susceptibility testing on chemotherapy efficiency in those suffering from multiple drug resistant tuberculosis. *Tuberculosis and Lung Diseases*, 2016, no. 9, pp. 16-21. (In Russ.)
4. *Federalnye klinicheskie rekomendatsii po organizatsii i provedeniyu mikrobiologicheskoy i molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki tuberkuleza*. [Federal clinical recommendations in organization and implementation of microbiological and molecular-genetic diagnostics of tuberculosis]. ROF Publ., Moscow, 2015. 35 p.

### FOR CORRESPONDENCE:

Republican TB Dispensary,  
22, Bolnichnaya St.,  
Yoshkar-Ola,  
Mary-El Republic, 424037

#### **Ljudmila V. Petrova**

Head of Bacteriological Laboratory.  
Phone: +7 (8362) 45-88-64.  
Email: lvps@bk.ru

#### **Alla M. Vasilieva**

Deputy Head Physician  
on Reporting and Statistics.  
Phone: +7 (8362) 42-64-70.  
Email: omk.rptd@minzdrav12.ru

**Куклина Елена Александровна**

врач-фтизиатр.  
Тел.: 8 (8362) 42-65-00.  
E-mail: pyfikhelen@yandex.ru

**Соловьев Юрий Александрович**

главный врач.  
Тел.: 8 (8362) 42-05-39.  
E-mail: y.solovyev@yandex.ru

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»,  
107564, Москва, ул. Яузская аллея, д. 2.  
Тел.: 8 (499) 785-90-91.

**Севастьянова Элина Викторовна**

доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник отдела микробиологии.  
E-mail: elinasev@yandex.ru

**Черноусова Лариса Николаевна**

доктор биологических наук, профессор,  
заведующая отделом микробиологии.  
E-mail: lchernousova@mail.ru

**Elena A. Kuklina**

Phthisiologist.  
Phone: +7 (8362) 42-65-00.  
Email: pyfikhelen@yandex.ru

**Yury A. Soloviev**

Head Physician.  
Phone: +7 (8362) 42-05-39.  
Email: y.solovyev@yandex.ru

Central Tuberculosis Research Institute,  
2, Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564.  
Phone: +7 (499) 785-90-91.

**Elina V. Sevastyanova**

Doctor of Biological Sciences,  
Leading Researcher of Microbiology Department.  
Email: elinasev@yandex.ru

**Larisa N. Chernousova**

Doctor of Biological Sciences, Professor,  
Head of Microbiological Department  
Email: lchernousova@mail.ru

Поступила 29.01.2019

Submitted as of 29.01.2019