

ИССЛЕДОВАНИЕ НОЗОКОМИАЛЬНОГО ИНФИЦИРОВАНИЯ МЕТОДАМИ RFLP-IS6110 И MIRU-VNTR В ОТДЕЛЕНИИ ДЛЯ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ*

Н. А. ВЛАСОВА¹, В. Н. СТЕПАНШИНА², Т. Н. МУХИНА³, Р. И. МИРОНОВА³, А. О. МАРЬЯНДЫШЕВ²

STUDY OF NOSOCOMIAL INFECTION BY IS6110 RFLP AND MIRU-VNTR METHODS IN THE UNIT FOR PATIENTS WITH MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS

N. A. VLASOVA¹, V. N. STEPANSHINA², T. N. MUKHINA³, R. I. MIRONOVA³, A. O. MARYANDYSHEV²

¹Архангельский клинический противотуберкулезный диспансер,

²Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск,

³ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболensk

У 41 больного, находящегося на лечении в отделении для больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, ежемесячно проводили тест на лекарственную чувствительность. У 10 больных с изменившимся результатом теста на лекарственную чувствительность исследовали все культуры с использованием молекулярно-генетических методов RFLP-IS6110 и MIRU-VNTR. Исследование нозокомиального инфицирования молекулярно-генетическими методами показало, что вероятность внутрибольничного инфицирования в специализированном стационарном отделении для больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя составляет 19,5%.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерия туберкулеза, нозокомиальное инфицирование, молекулярно-генетическое исследование культур микобактерий туберкулеза.

Drug susceptibility tests were monthly carried out in 41 patients treated in the multidrug-resistant tuberculosis unit. All cultures were examined using the molecular genetic methods IS6110 RFLP and MIRU-VNTR in 10 patients with a changed result of the drug susceptibility test. Molecular genetic examination of nosocomial infection showed that the likelihood of in-hospital infection in the specialized hospital unit for patients with multidrug-resistant tuberculosis was 19.5%.

Key words: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, nosocomial infection, molecular genetic examination of *Mycobacterium tuberculosis* cultures.

Проблема внутрибольничного инфицирования микобактериями туберкулеза (МБТ) приобрела большую актуальность в связи с появлением штаммов возбудителя, устойчивых к противотуберкулезным препаратам. Нозокомиальное инфицирование приводит к неэффективному курсу химиотерапии у впервые выявленных больных туберкулезом и возникновению рецидивов заболевания [3]. Отсутствие мер инфекционного контроля, а также длительные стационарные курсы способствуют возникновению внутрибольничного реинфицирования МБТ.

Случаи нозокомиального инфицирования описаны в научных исследованиях, но в отечественной литературе данные о внутрибольничных случаях заражения публикуются редко [2]. Использование методов молекулярно-генетического исследования микобактерий позволяет исследовать вспышки внутрибольничного заражения, распространения лекарственно-устойчивых штаммов туберкулеза.

Цель исследования – определение вероятности и предполагаемых сроков диагностики нозокомиального инфицирования в отделении для больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) МБТ Архангельского клинического противотуберкулезного диспансера с использованием молекулярно-генетических методов RFLP-IS6110 и MIRU-VNTR.

Материалы и методы

Вероятность возникновения нозокомиальной инфекции исследовали у больных туберкулезом с МЛУ возбудителя, находящихся на лечении в стационарном отделении противотуберкулезного диспансера г. Архангельска (АКПТД) для больных туберкулезом с МЛУ МБТ и бактериовыделением, диагностируемым методом микроскопии мокроты. Молекулярно-генетические исследования МБТ больных туберкулезом с МЛУ возбудителя про-

* Финансирование, координация и техническая поддержка этого исследования предоставлены Американскими Центрами контроля заболеваний и профилактики, Атланта, США. Выражаем личную благодарность Питеру Цигельскому, Юлии Ершовой и Екатерине Курбатовой за помощь в проведении исследования.

водили двумя методами. RFLP-анализ (Restriction Fragment Length Polymorphism) применяли как «золотой стандарт» исследования молекулярной эпидемиологии, основанный на генотипировании по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов с использованием вставочной последовательности IS6110 [7]. Метод MIRU-VNTR применяли как дополнительный метод, подтверждающий изменения генотипов МБТ, позволяющий генотипировать комплекс МБТ на основе амплификации с использованием праймеров, специфичных для крайних участков tandemных повторов, и последующего определения размера ампликонов после их электрофоретической миграции [5].

Исследования с помощью теста лекарственной чувствительности (ТЛЧ) МБТ на среде Миддлбрука 7H10 и методов RFLP-IS6110 и MIRU-VNTR проводили в лаборатории ФГУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» (лаборатория молекулярной биологии, г. Оболensk).

Проанализирована группа из 100 больных туберкулезом с МЛУ МБТ, находящихся на лечении с апреля 2005 г. по июнь 2006 г. Из 100 больных туберкулезом с МЛУ МБТ, получающих лечение по 4-й категории в соответствии с приказом Министерства здравоохранения РФ № 109 от 23 марта 2003 г. [4], которые весь период лечения обследовались ежемесячно культуральным методом, включены в молекулярно-генетическое исследование культуры МБТ от 41 больного. Критериями включения в когорту было наличие нулевой культуры МБТ до начала лечения. Всего было отобрано 79 изолятов культур МБТ у 41 больного. В трех случаях исследовали только нулевую культуру, так как не было роста последующих культур. У 38 пациентов была получена культура до начала лечения и в процессе лечения. Культуры МБТ получены на 2-м мес. лечения у 16 больных, после 2 мес. химиотерапии – у 10, после 3 мес. – у 2, после 4 мес. – у 4 и после 5 мес. – у одного больного.

Все культуры МБТ были исследованы на лекарственную чувствительность методом пропорций на агаре. Изолятам культур МБТ у 10 больных (включая первый и последний), у которых в предварительных исследованиях различались характеристики лекарственной чувствительности, были проведены молекулярно-генетические исследования методами MIRU-VNTR и RFLP-IS6110 всех культур МБТ.

Результаты

Все культуры МБТ были устойчивы к изониазиду (H) и рифампицину (R) в комбинации с устойчивостью к различным препаратам первого и второго рядов.

Изменения ТЛЧ наблюдали в 10 случаях, в том числе с нарастанием лекарственной устойчивости у 8 больных. По одному случаю наблюдалось на-

растание ТЛЧ к изониазиду (H) (концентрация 5 мгм/л) на 16-м мес. лечения, к этамбутолу (E), к канамицину (Km), офлоксацину (Ofx) после 1 мес. лечения. По одному случаю в комбинациях протинамид (Pto), ПАКК (PAS) на 3-м мес. лечения, стрептомицину (S)E и EKmPAS после 1 мес. лечения.

Учитывая изменения ТЛЧ, 10 больным проведено генотипирование методами MIRU-VNTR и RFLP-IS6110 с целью выявления момента возникновения различий между изолятами. Данные молекулярно-генетических исследований представлены в таблице. Изменение генотипа МБТ произошло у 8 пациентов, из них у 6 пациентов через 1 мес. после лечения, у одного через 2, еще у одного через 3 мес. лечения. У одного пациента произошло изменение ТЛЧ того же генотипа, и еще у одного пациента было трудно определить, произошла ли смена генотипа, так как из 8 изолятов 7 идентичны, а один отличается от остальных. В данном случае возможно несколько интерпретаций результатов исследования: могла произойти смена генотипа или у больного определяется смешанная культура, состоящая из двух генотипов МБТ.

Обсуждение

По данным литературы, вспышки нозокомиальной инфекции наблюдались в различных госпиталях. В США в клинике для больных с синдромом вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) произошла вспышка туберкулезной инфекции, в результате которой 31% больных с ВИЧ-инфекцией заболели туберкулезом легких. Впоследствии все заразившиеся скончались от прогрессирования туберкулезного процесса. МБТ от этих пациентов были идентифицированы методом сполитипирования, а в 11% случаев реинфекция была подтверждена с помощью RFLP-анализа [6]. В статье авторов из Южной Африки приведена эпидемиологическая модель распространения нозокомиальной инфекции у больных туберкулезом с ШЛУ МБТ в районном госпитале, и показано, что если не будут внедрены меры инфекционного контроля, то распространение штаммов с ШЛУ будет обусловлено нозокомиальным инфицированием более чем в 50% случаев в госпиталях, где находятся больные туберкулезом легких [12]. В исследовании во Вьетнаме в 2009 г. при использовании туберкулиновой пробы и IGPA-теста (интерфероновый тест) показано, что инфицирование медицинских работников происходит в 2 раза чаще в туберкулезных госпиталях, чем в госпиталях общего типа, и демонстрирует необходимость внедрения противоэпидемических мероприятий [8]. В настоящее время вспышки нозокомиального туберкулеза продолжают регистрироваться по всему миру. В одном из госпиталей США вспышка туберкулеза привела к 13 случаям смертей и 99 слу-

Сравнительная характеристика изолятов согласно данным RFLPIS6110- и MIRU-VNTR типирования

Больные	Количество изолятов	RFLPIS6110	MIRU-VNTR
1	3	Последний изолят отличается от первых двух наличием одной дополнительной полосы	Все три изолята идентичны
2	2	Последний изолят отличается от первого полностью	Последний изолят отличается от первого по трем локусам – MIRU 26, QUB 26 и ETRA
3	3	Последний изолят от первых двух отличается	Последний от первых двух изолятов отличается по трем локусам – MIRU 26, QUB 26 и ETRA
4	8	Семь изолятов идентичны, а для одного изолята не удалось получить читаемый RFLP-профиль	Семь изолятов идентичны, а один изолят имеет MIRU-профиль, характерный для смешанных культур
5	2	Последний изолят отличается от первого. Первый изолят, возможно, является смесью культур	Последний изолят отличается от первого по большинству проверенных локусов. Первый изолят, возможно, является смесью культур
6	4	Последний изолят отличается от первых трех изолятов, которые являются смешанными культурами	Последний изолят отличается от первых трех изолятов, являющихся, очевидно, смешанными культурами
7	5	Все 5 изолятов различаются, один из которых, возможно, является смесью культур	Все 5 изолятов различаются, возможно, являются смесью культур
8	3	Последний изолят отличается от первых двух отсутствием одной полосы	Последний изолят отличается от первых двух по одному локусу – QUB 11b
9	3	Последний изолят отличается от первых двух наличием одной дополнительной полосы	Последний изолят отличается от первых двух по одному локусу – QUB 11b
10	4	Последний изолят отличается от первых трех наличием нескольких дополнительных полос	Последний изолят отличается от первых трех по двум локусам – QUB 26 и VNTR 0424

чаям заболевания за последние 20 лет, после чего было принято решение о закрытии данного госпиталя [11]. Вспышки туберкулеза встречаются как среди гражданского населения, так и в тюрьмах. Особое значение следует уделять местам, где находятся заключенные с сочетанной патологией – туберкулез и ВИЧ-инфекция. В 1995 г. в США зарегистрирована вспышка туберкулеза в тюремной больнице у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Было идентифицировано 15 случаев туберкулеза у лиц с ВИЧ-инфекцией [9].

По данным отечественной литературы, внутрибольничные инфекции, в том числе и туберкулез, составляют 5-6% [3]. По нашим данным, среди 41 больного за период стационарного лечения туберкулеза с МЛУ МТБ в ГБУЗ «АО АКПТД» смена генотипа МБТ произошла у 8 пациентов, что составляет 19,5%. По данным российских ученых, сравнение результатов молекулярно-генетического исследования возбудителя, выявленного у одного и того же больного в разные сроки при первичной регистрации и рецидиве заболевания, выявило изменения генотипа у 16,6% больных, что может явиться косвенным свидетельством нозокомиальной суперинфекции [3]. По данным исследования [2] показано, что риск внутрибольничного заражения в отделении для больных туберкулезом с МЛУ МБТ возможен в 5,5% случаях при определении методом ID-типирования.

В этом исследовании данные анализа изолятов культуры МБТ, полученных у 8 больных туберку-

лезом с МЛУ МТБ из нулевой и последующей культуры, различаются по большинству проверенных локусов, согласно результатам MIRU-VNTR типирования, и наличием нескольких дополнительных полос по методике RFLP-IS6110. У одного пациента изоляты являются идентичными и, вероятно, обусловлены изменением ТЛЧ и развитием вторичной лекарственной устойчивости в процессе лечения. В этом случае, вероятно, произошла амплификация в период лечения, что может быть связано с неконтролируемым лечением, когда пациент самовольно покинул стационар. В отделении для больных туберкулезом с МЛУ МБТ АКПТД лечение проводится под контролем медицинского персонала, и амплификация лекарственной устойчивости может быть связана еще и с наличием смешанных микобактерий, в которых есть чувствительные и устойчивые штаммы МБТ. У одного пациента из 8 изолятов 7 идентичны, а один отличается от остальных. Данный результат исследования показывает наличие смешанной культуры, что может быть обусловлено двойным заражением до начала лечения или нозокомиальной инфекцией.

В нашем исследовании показано, что риск внутрибольничного заражения возможен в 19,5% случаях при определении методами MIRU-VNTR и RFLP-IS6110. Сроки нозокомиальной инфекции регистрировались от 1 до 16 мес. стационарного лечения.

Выводы

1. Изменение ТЛЧ может быть обусловлено сочетанием культур МБТ в период лечения больных туберкулезом с МЛУ возбудителя или появлением амплификации лекарственной устойчивости при проведении химиотерапии.
2. Изменение ТЛЧ может явиться также причиной внутрибольничного инфицирования другими МБТ, а молекулярно-генетические методы позволяют доказать данный факт.
3. Вероятность нозокомиального инфицирования среди больных туберкулезом в 2005-2006 гг. в стационарном отделении для больных туберкулезом с МЛУ МБТ АКПГД составила 19,5%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барапов А. А., Марьяндышев А. О. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерий туберкулеза // Пробл. туб. – 2008. – № 4. – С. 3-8.
2. Юрина Г. П., Ажанкина Т. Л., Тарасова И. В. и др. Нозокомиальная инфекция среди больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью в Архангельской области // Туб. – 2012. – № 6. – С. 26.
3. Мясникова Е. Б. Клинико-эпидемиологические критерии диагностики нозокомиальной туберкулезной инфекции у пациентов противотуберкулезных учреждений. Материалы 1-го конгресса национальной ассоциации фтизиатров. – 2012. – С. 389-391.
4. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 109 от 23 марта 2003 г.
5. Профилактика туберкулеза в лечебно-профилактических учреждениях при дефиците необходимых ресурсов. Методические рекомендации. – ВОЗ, 1999.
6. Antonio Rivero, Manuel Marques, Jesus Santos et al. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B // Clin. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 32. – P.159-161.
7. van Embden J. D., Cave M. D., Crawford J. T. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 406-409.
8. Janet C. Mohle-Boetani, Vanessa Miguelino, Daniel H. et al. Tuberculosis outbreak in a housing unit for human immunodeficiency virus-infected patients in a correctional facility: transmission risk factors and effective outbreak control // Clin. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 34, № 5. – P. 668-676. doi: 10.1086/338815.
9. Lui Thi Lien, Nguyen Thi Le Hang, Nabuyki Kobayashi et al. Prevalence and risk factor for tuberculosis infection among hospital workers in Hanoi, Vietnam. Plosone 4(8);e6798doi:10.1371/journal.pone.0006798.
10. Nguyen D., Brassard P., Menzies D. et al. Genomic characterization of an endemic *Mycobacterium tuberculosis* strain: evolutionary and epidemiologic implications // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 2573-2580.
11. Rick Scott Closes A.G. Holley State Hospit. Despite largest tuberculosis outbreak in country huffpost Miami www. huffingtonpost.cjm/2012/07/09/florida-tuberculosis-outbreak-keptsecret_n_1658916.html
12. Sanjay Basu M. S., Jason R. Andrews MD., Eric M. Poolman MD. et al. Prevention of nosocomial transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in rural South African district hospitals: an epidemiological modeling study // Lancet. – 2007. – Vol. 370, issue 9597. – P. 1500-1507.
13. Supply Ph. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 4498-4510.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Власова Наталья Алексеевна

Архангельский клинический противотуберкулезный диспансер,
врач-фтизиатр.
163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, д. 28.
Тел.: 8 (952) 250-46-91.
E-mail: mashavlasova@mail.ru

Поступила 15.06.2013