

РАССЛЕДОВАНИЕ ВСПЫШКИ ТУБЕРКУЛЕЗА В МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОМ УЧРЕЖДЕНИИ АРХАНГЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

¹Е. В. АНТУШЕВА, ²О. М. МИРОНЮК, ³И. В. ТАРАСОВА, ⁴П. И. ЕЛИСЕЕВ, ⁵Г. П. ПЛЮСНИНА, ⁶А. О. МАРЬЯНДЫШЕВ

TUBERCULOSIS OUTBREAK INVESTIGATION USING MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES IN THE SOCIOMEDICAL FACILITY OF THE ARKHANGELSK REGION

¹E. V. ANTUSHEVA, ²O. M. MIRONIYUK, ³I. V. TARASOVA, ⁴P. I. ELISEEV, ⁵G. P. PLYUSNINA, ⁶A. O. MARYANDYSHEV

¹Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

²Архангельский клинический противотуберкулезный диспансер

Вспышки туберкулезной инфекции в медико-социальных учреждениях являются актуальной проблемой вследствие тесного контакта пациентов в закрытом учреждении. Несмотря на высокую вероятность распространения инфекции от одного больного, не исключается возможность возникновения в медико-социальном учреждении новых случаев заболевания, обусловленных контактами с другими больными туберкулезом.

С тех пор как в клиническую практику были внедрены первые методы молекулярно-генетических исследований – сполиготипирование и ДНК-фингерпринтинг (RFLP), их стали активно применять для изучения эпидемических вспышек туберкулеза, в том числе и в медико-социальных учреждениях, а также семейных очагах. В начале 90-х годов в США проводили исследования, касающиеся внутрибольничной передачи туберкулеза среди пациентов с ВИЧ-инфекцией, и результаты этих исследований позволили доказать, что туберкулезный процесс у таких больных является не следствием активации латентной инфекции, а результатом нозокомиального инфицирования [5]. В этот же период молекулярно-генетические методы позволили изучить внутрибольничную вспышку туберкулезной инфекции в штате Теннесси, США, где один больной стал источником инфекции для 36 человек [6]. С внедрением более простой и дешевой методики MIRU-VNTR значимость молекулярно-генетических методов возрастает, так как у врачей и исследователей появляется возможность изучения генетического состава штаммов микобактерии туберкулеза (МБТ), имеющих место у больных туберкулезом, и определить, является ли источником заражения один больной либо обнаружить существование других контактов с носителями МБТ в лечебном или медико-социальном учреждении.

Известно, что идентичные штаммы МБТ с наибольшей вероятностью можно обнаружить в очагах среди больных, заразившихся от одного источника. Вместе с тем при массовых вспышках

туберкулеза паттерны штаммов могут иметь небольшие различия [1, 2].

Возможности молекулярно-генетических методов исследования позволили в 1998 г. изучить распространение вирулентного штамма W МБТ в одной из клиник штата Теннесси, США. Вспышка имела место в 1992 г., когда в лечебное учреждение поступил больной с недиагностированной туберкулезной инфекцией. С ним имели контакт 172 работника; впоследствии из них заболели 35, а также один пациент, не имевший прямого контакта с больным, но находившийся с ним на одном этаже. Молекулярно-генетическое исследование образцов ДНК, полученных от первого пациента и вновь заболевших, показало их полную идентичность. Более того, оказалось, что этот штамм имеет такую же генетическую структуру, как штамм W с множественной лекарственной устойчивостью, распространившийся в Нью-Йорке в 1990-1993 гг. [6].

Схожее исследование было проведено в одной из клиник Нью-Йорка в 1992 г. Там с помощью метода RFLP исследовали культуры, полученные от 16 пациентов с ВИЧ-инфекцией, госпитализированных в одну из городских клиник в 1989-1990 гг. У всех имел место туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью МБТ. У 13 из них признаки туберкулезной инфекции проявились в течение полугода после госпитализации, а 3 были госпитализированы с уже подтвержденным диагнозом туберкулеза, 13 вновь заболевших пациентов с большой вероятностью имели контакт с ранее больными (хотя бы один день находились в одной палате). По данным молекулярно-генетического исследования, у 12 из вновь выявленных и у одного ранее больного генотип МБТ совпадал, у 2 (один из них был вновь выявленным) результат оказался спорным, и лишь у одного пациента генотип МБТ отличался полностью, что позволило сделать вывод о преимущественно внутрибольничной передаче туберкулеза [5].

Также в 1992 г. в Сан-Франциско было проведено исследование, касающееся распространения туберкулезной инфекции в социальном учреждении для пациентов с ВИЧ-инфекцией. После поступления туда 2 пациентов с диагностированным туберкулезом заболевание было выявлено у 12 человек. Однако исследования с использованием метода RFLP показали, что штаммы от этих 2 пациентов, заболевших ранее, отличались от штамма 12, заболевших позднее. Был сделан вывод о необходимости более тщательного расследования и исключения контактов с больными [4].

Также проводили исследования, касающиеся передачи туберкулезной инфекции внутри семей. В 2012 г. в Польше было выполнено исследование, касающееся внутрисемейной передачи туберкулеза, по результатам которого выявили, что из 78 пациентов 49 (63%) заразились внутри семейного очага, так как их генотипы полностью совпадали. Если прибавить к ним те генотипы, где количество аллелей отличалось только по одному локусу, этот показатель увеличился до 85%. Но в то же время были выявлены 12 человек из 6 семей, штамм МБТ которых не совпадал с таковым внутри семьи, что свидетельствует о другом пути заражения [3].

Цель работы – изучение вспышки туберкулеза в медико-социальном учреждении Архангельской области с помощью молекулярно-генетического метода MIRU-VNTR.

Материалы и методы

Вспышка туберкулеза произошла в 2009-2012 гг. в медико-социальном учреждении – Районном психоневрологическом интернате (ПНИ). В течение этого периода выявили 7 больных туберкулезом легких (6 новых случаев заболевания и один рецидив). Пациенты ПНИ являлись инвалидами 2-й группы инвалидности по психическому заболеванию. У всех больных туберкулезом МБТ обнаружены с помощью микроскопического и культурального методов. Все пациенты были госпитализированы в стационар Архангельского клинического противотуберкулезного диспансера (АКИПД), где получали лечение на основании результатов тестов лекарственной чувствительности (ТЛЧ).

Учреждение расположено в двухэтажных кирпичных корпусах, соединенных между собой переходом. В течение года среднее число пациентов составляло 105 человек. Пациенты размещены в 31 комнате, которые рассчитаны на 2-4 человека. Прием пищи и медикаментов осуществляется в одном помещении. Санитарно-гигиенический узел рассчитан на пациентов, проживающих на одном этаже. Таким образом, все пациенты медико-социального учреждения имели контакты с больными туберкулезом.

Культуры МБТ, полученных от 7 пациентов медико-социального учреждения, заболевших туберкулезом в период с марта 2010 г. по апрель 2012 г., исследовали с помощью метода молекулярно-генетического исследования MIRU-VNTR. Изучили генетическую структуру штаммов МБТ по 10 локусам ДНК МБТ. Стандартный метод исследования MIRU-VNTR, разработанный P. Supply, позволяет генотипировать комплекс МБТ на основе амплификации с использованием праймеров, специфичных для крайних участков tandemных повторов, и последующего определения размера ампликонов после их электрофоретической миграции; в качестве положительного контроля обычно используется лабораторный штамм H₃₇Rv, для измерения размеров молекул – стандартный маркер.

Ретроспективно изучили амбулаторные карты и истории болезни 7 пациентов ПНИ.

Результаты

Средний возраст больных туберкулезом составил 46 лет (от 32 до 59 лет). Время пребывания в ПНИ составило 5 лет и более. Все вновь выявленные больные туберкулезом имели контакт с ранее заболевшими.

В ноябре 2009 г. при флюорографическом обследовании выявлен туберкулез у первого больного В. В январе, феврале и марте 2010 г. при обращении с жалобами к врачу у Ш., Ч. и Фар. был диагностирован туберкулез. В октябре 2010 г. и октябре 2011 г. при ежегодном флюорографическом обследовании обнаружили изменения в легких у больных Фед. и А. Последний больной туберкулезом В. А. был диагностирован в марте 2012 г. при обращении с жалобами пациента со стороны органов дыхания. У 6 пациентов зарегистрирован новый случай заболевания, а у больного В. А. зарегистрирован рецидив туберкулеза, так как он проходил лечение ранее в АКИПД с 07.08.06 г. по 18.07.07 г., где был закончен курс лечения, признанный эффективным.

Монорезистентность (к изониазиду) была выявлена у 3 пациентов (В., А. и В. А.), полирезистентность – у 4 (Ш. – устойчивость к изониазиду, стрептомицину, этамбутолу и пиперазину, Фар., Ч. и Фед. – к изониазиду и стрептомицину).

Данные по результатам молекулярно-эпидемиологического исследования (методом MIRU-VNTR) культур, полученных от больных туберкулезом, представлены в таблице.

Результаты исследований показывают, что 5 больных имеют одинаковый штамм МБТ, а у 2 – штаммы, отличные от остальных пациентов ПНИ. Более того, у пациента В. имеется смешанное инфицирование 2 штаммами МБТ, ни один из которых не совпадает со штаммом, имеющимся в группе из 5 человек (рис.).

Количество аллелей по 10 локусам MIRU-VNTR (МБТ)

№	Больной	Дата забора культуры	MIRU 2	MIRU 10	MIRU 4	MIRU 16	MIRU 23	MIRU 40	MIRU 27	MIRU 24	MIRU 31	MIRU 26
1	В.	26.03.2010	2 3	2 3	2 2	1 2	5 6	1 1	3 3	1 1	3 3	5 6
2	Ч.	18.03.2010	2	2	2	3	5	3	3	1	5	7
3	Ш.	25.03.2010	2	2	2	3	5	3	3	1	5	7
4	Фар.	30.06.2010	2	2	2	3	5	3	3	1	5	7
5	А.	10.11.2011	2	2	2	3	5	3	3	1	5	7
6	Фед.	28.06.2011	2	3	2	3	5	3	3	2	5	5
7	В. А.	03.04.2012	2	2	2	3	5	3	3	1	5	7

Обсуждение

В нашем исследовании, несмотря на небольшой размер очага, также была выявлена неоднородность циркулирующих в учреждении штаммов. В одном случае была определена смешанная инфекция (ни один из имеющихся штаммов не был обнаружен у других пациентов), в 5 случаях выявлен одинаковый штамм МБТ, и в одном случае присутствовал единственный штамм, отличный от всех других.

Можно предположить, что 5 пациентов с одинаковым штаммом МБТ были инфицированы из одного источника, а 2 других, несмотря на кажущийся очевидным контакт с этим же источником, были заражены другим путем. Данный факт является основанием для тщательного исследования источников туберкулезной инфекции.

Особое внимание следует уделить наличию смешанной инфекции у одного из пациентов. Она не только свидетельствует о дополнительном источнике инфицирования, но может служить причиной гетерорезистентных результатов ТЛЧ и неадекватного подбора терапии. Также она создает условия для дальнейшей амплификации лекарственной устойчивости МБТ и их распространении в учреждении. При этом смешанная инфекция практически не может быть выявлена клинически или другими методами исследования, что может стать причиной недооценки ее распространенности. Подтверждающие это результаты получены при исследовании, проведенном в Грузии. Там с использованием метода MIRU-VNTR исследовали 199 образцов культуры от больных, содержащихся в местах лишения свободы (МЛС). Это исследование было в большей степени посвящено вопросу выявления смешанной инфекции у пациентов одного учреждения (туберкулезной больницы МЛС), которая была выявлена в 26 (13,1%) случаях, что существенно превышает процент гете-



Рис. Снимок агарозного геля с результатами амплификации и детекции ДНК МБТ больных А., В., Фед. и Ф. по 10 локусам MIRU-VNTR. У больного В. по локусу 16 – два варианта количества аллелей (указано стрелкой)

рогенности, выявляемый с помощью других методов исследования [8].

Несмотря на тот факт, что 5 больных имели разную устойчивость (у Ш. – устойчивость к изониазиду, стрептомицину, этамбутолу и пиперазину, у Фар. и Ч. – к изониазиду и стрептомицину, у А. и В. А. – только к изониазиду), у них определялся одинаковый генотип МБТ. Вероятнее всего, это объясняется либо недостоверностью ТЛЧ к этамбутолу, пиперазину и стрептомицину, но не исключается гетерогенность МБТ, не выявляемая одним методом молекулярно-генетического исследования. Подобное исследование проводили в 2009 г. в Германии. Сравнивали две культуры – одна с доказанной монорезистентностью, другая – с полирезистентностью, но их паттерны по генотипу совпадали. Сделали вывод о том, что даже полностью сходные по определенным локусам штаммы могут иметь иную генетическую гетерогенность, не выявляемую рутинными методами исследования [7]. Для данных пациентов расхождение в ТЛЧ по этамбутолу, стрептомицину, пиперазину-

* Красным цветом показаны зафиксированные отличия в генотипе штаммов возбудителя.

ду не имело значения, так как больные получали стандартное лечение по категории «устойчивость к изониазиду». Основываясь на данном ТЛЧ и для предупреждения распространения инфекции 190 контактными лицами двукратно проведена химиопрофилактика: в 2011 г. – в течение 4 мес. рифампицином, в 2012 г. – в течение 2 мес. рифампицином и пиразинамидом.

Заключение

В ПНИ Архангельской области с 2009 по 2012 г. зафиксирована вспышка туберкулеза, обусловленная смешанной инфекцией. У 5 больных выявлен одинаковый штамм МБТ, а у 2 – штаммы, отличные от остальных больных туберкулезом. В одном случае имелось смешанное инфицирование двумя штаммами МБТ, ни один из которых не совпадал со штаммом, имеющимся в группе из 5 человек. Молекулярно-генетические исследования позволяют получить более объективную информацию о структуре штаммов МБТ в закрытом учреждении, выявить скрытые источники инфекции и принять меры для их устранения, а также своевременно выявить пациентов, инфицированных несколькими штаммами МБТ, и провести соответствующую химиопрофилактику контактными лицам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронкова О. В., Уразова О. И., Хасанова Р. Р. и др. Генотипическая характеристика *M. tuberculosis* – возбудителей остро прогрессирующего деструктивного туберкулеза легких // Бюл. сиб. мед. – 2011. – № 1.
2. Гвоздевский Н. А., Ажикина Т. Л., Свердлов Е. Д. Делеционно-инсерционные различия геномов высоковирулентного штамма

HN878 *Mycobacterium tuberculosis* и менее вирулентного штамма CDC1551 // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2006. – № 1.

3. Augustynowicz-Kopeć E., Jagielski T., Kazińska M. et al. Transmission of tuberculosis within family-households // J. Infect. – 2012. – Vol. 64, № 6. – P. 596-608. Epub 2012 Feb 1.

4. Daley C. L., Small P. M., Schechter G. F. et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms // N. Engl. J. Med. – 1992. – Vol. 326. – P. 231-235.

5. Edlin B. R., Tokars J. I., Grieco M. H. et al. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome // N. Engl. J. Med. – 1992. – Vol. 326. – P. 1514-1521.

6. Haas D. W., Milton S., Kreiswirth B. N. et al. Nosocomial transmission of a drug-sensitive W-variant *Mycobacterium tuberculosis* strain among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Tennessee // Infect Control Hosp Epidemiol. – 1998. – Vol. 19. – P. 635-639.

7. Niemann S., Köser C. U., Gagneux S. et al. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with identical DNA fingerprints // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, № 10. – P. e7407.

8. Shamputa I. C., Jugheli L., Sadradze N. et al. Mixed infection and clonal representativeness of a single sputum sample in tuberculosis patients from a penitentiary hospital in Georgia, Respiratory Research, 2006.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Елисеев Платон Иванович

*Северный государственный медицинский университет,
аспирант кафедры фтизиопульмонологии.*

163000, г. Архангельск, просп. Троицкий, д. 51.

Тел./факс: (8182) 28-57-91, (8182) 28-65-95.

E-mail: info@nsmu.ru; pediatrics@yandex.ru.

Поступила 11.03.2013