

Дуденко Е.В., Китаев М.И., Сыдыкова С.С., Мусаева А.М., Мырзакулова А.Д.

## РОЛЬ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) В ЛАБОРАТОРНОМ КОНТРОЛЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

УДК 616.240-002.5:615.724.8-092-078.33

*Изучалось значение ПЦР в комплексе с бактериологическими методами в контроле эффективности химиотерапии впервые выявленных больных туберкулезом легких. При поступлении были обследованы 227 пациентов. Во время интенсивной химиотерапии проводилось выявление микобактерий туберкулеза (МБТ) у 60 пациентов в начале лечения и через 2-3 месяца. Изучалось значение ПЦР, бактериоскопии и посева у 41 пациента через 4-10 месяцев химиотерапии. ПЦР существенно дополняет традиционные микробиологические методы выявления микобактерий туберкулеза. ПЦР может использоваться как дополнительный лабораторный метод контроля эффективности химиотерапии.*

**Ключевые слова:** туберкулез легких, полимеразная цепная реакция.

*The role of polymerase chain reaction (PCR) in the control over efficiency of chemotherapy of patients with lungs tuberculosis. Dudenko E.V., Kitaev M.I., Sydykova S.S., Musaeva A.M., Myrzaculova A.D.*

*Investigated value PCR in the control over efficiency of chemotherapy of the first time revealed patients with lungs tuberculosis. At receipt it is surveyed sputum of 227 patients. During intensive chemotherapy comparison of frequency of revealing MBT at 60 patients prior to the beginning of treatment and in 2-3 months was spent. Investigated value PCR, bacterioscope and crop at 41 patients in 4-10 month of chemotherapy. PCR essentially supplements traditional methods of revealing mycobacterium tuberculosis. PCR might be used as an additional laboratory method in the control over efficiency of chemotherapy.*

**Key words:** a tuberculosis of lungs, polymerase chain reaction (PCR).

В настоящее время в связи с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией по туберкулезу особое значение приобретает внедрение в практику современных лабораторных методов диагностики и контроля лечения этой инфекции. ПЦР – анализ является основным из применяемых в лабораторной диагностике молекулярно – генетических методов. Для выявления микобактерий туберкулеза (МБТ) этот метод был предложен в 1989 году Brisson - Noel с соавторами [1]. Метод ПЦР основан на многократном увеличении числа копий (амплификации) специфического для МБТ участка молекулы ДНК. М. Tuberculosis относится к трудно культивируемым и длительно растущим бактериям, что ограничивает возможности достаточно чувствительного культурального метода. Микроскопия мазка мокроты – быстрый способ получения

результата, но чувствительность бактериоскопии относительно низкая. ПЦР – анализ обладает высокой чувствительностью, специфичностью и скоростью получения результата.

При использовании метода ПЦР происходит амплификация специфического участка ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма, поэтому контроль эффективности химиотерапии с помощью ПЦР должен проводиться в комплексе с посевами мокроты на выявление жизнеспособности МБТ[2].

С использованием ПЦР – анализа было показано, что у части впервые выявленных больных туберкулезом легких (32%), после окончания курса интенсивной химиотерапии и определения отрицательных результатов бактериоскопии и посева, из мокроты продолжают выделяться ДНК МБТ[3].

При ограниченных формах туберкулеза средний срок прекращения обнаружения ДНК МБТ в мокроте методом ПЦР – 3,25 месяца. При распространенных формах туберкулеза легких – 5,2 месяца. Методом посева – 3 месяца [4]. По данным [5], контроль за выделением МБТ с использованием ПЦР показал более длительное бактериовыделение (на 2-2,5 месяца) в мокроте больных туберкулезом легких по сравнению с традиционными микробиологическими методами исследования.

Больные туберкулезом легких с положительным ПЦР в начале и после окончания интенсивной фазы лечения и положительным результатом посева в начале лечения могут быть отнесены к группе риска по возможной реактивации туберкулеза в случае прекращения лечения на этом этапе [6].

Требуются дополнительные исследования для изучения роли метода ПЦР – анализа как лабораторного средства контроля эффективности лечения больных туберкулезом легких. В связи с этим целью настоящей работы явилось сопоставление выявляемости МБТ с помощью ПЦР – анализа и традиционных микробиологических методик у впервые выявленных больных туберкулезом легких на разных этапах химиотерапии.

Всего на наличие МБТ были обследованы 387 больных туберкулезом легких.

Определение МБТ проводилось у 227 впервые выявленных больных при поступлении на лечение в стационар. Инфильтративный туберкулез

был диагностирован у 180(79,30%), диссеминированный туберкулез – у 24(10,57%), фиброзно-кавернозный туберкулез – у 17(7,49%), очаговый - у 3(1,32%) и милиарный - у 3(1,32%).

Через 2-3 месяца интенсивной химиотерапии были обследованы 59 больных туберкулезом легких. Инfiltrативный туберкулез был диагностирован у 47(79,66%), диссеминированный туберкулез – у 5(8,47%), фиброзно-кавернозный туберкулез – у 7(11,86%).

В специальной серии исследований проводилось выявление МБТ у 60 впервые выявленных больных инfiltrативным туберкулезом легких в период максимальной лекарственной нагрузки (до лечения и через 2-3 месяца).

В отдаленные сроки химиотерапии (через 4 и более месяцев после начала химиотерапии) был обследован 41 пациент. Инfiltrативный туберкулез был диагностирован у 31(75,61%), диссеминированный – у 4(9,76%), фиброзно-кавернозный – 5(12,19%), очаговый – у 1(2,44%).

Выявление МБТ в образцах мокроты проводилось следующими методами: ПЦР-анализ, бактериоскопия с окраской по Циль-Нильсену, посевы на плотную среду Левенштейна-Йенсена. Для проведения ПЦР использовали тест-систему НПФ

«Литех»: набор для выделения ДНК из биопроб и набор «Политуб» для амплификации. Для детекции ампликонов использовался метод электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

При поступлении на лечение в стационар ПЦР – анализ был положительным у 201(88,55%) из 227 впервые выявленных больных. Положительные результаты бактериоскопии – у 124(54,63%) из этих больных, посева - у 134(59,03%). Эти данные позволяют утверждать, что при первичном туберкулезе легких ПЦР выявляет МБТ у большего числа больных, чем традиционные лабораторные методы диагностики.

Через 2-3 месяца химиотерапии ПЦР-анализ был положительным у 45(76,27%) из 59 обследованных больных, бактериоскопия – у 25(42,37%), посев – у 33(55,93%).

Проводилось сопоставление частоты выявления микобактерий у 60 впервые выявленных больных инfiltrативным туберкулезом легких в динамике: до начала лечения и через 2-3 месяца интенсивной химиотерапии в период максимальной лекарственной нагрузки.

Таблица 1

**Определение МБТ в мокроте впервые выявленных больных инfiltrативным туберкулезом легких в процессе химиотерапии**

Инfiltrативный туберкулез легких	Число больных	Положительный результат					
		ПЦР		БК		Посев	
		абс	%	абс	%	абс	%
До лечения	60	49	81,67	34	56,67	45	75,00
Через 2-3 месяца	60	42	70,00	17	28,33	15	25,00

Через 2-3 месяца лечения число положительных результатов ПЦР снизилось относительно исходных данных на 14,29%, бактериоскопии – на 50,00%, посева – на 66,67%. Таким образом, 2-3 месяца химиотерапии не приводили к полному абациллированию мокроты. Высокая частота положительных ПЦР после интенсивной химиотерапии(70,00%) сочеталась со значительным снижением положительных результатов посевов(25,00%), что свидетельствует о снижении содержания в мокроте жизнеспособных МБТ.

Результаты обнаружения МБТ в отдаленные сроки после начала химиотерапии представлены в таблице 2

Таблица 2

**Определение МБТ в мокроте больных туберкулезом легких в отдаленные сроки**

Клинические формы	Число больных	Положительные результаты					
		ПЦР		БК		Посев	
		абс	%	абс	%	абс	%
Инfiltrативный туберкулез	31	16	51,6	6	19,4	8	25,8
Диссеминированный туберкулез	4	4	100	1	25,0	2	50,0
ФКТ	5	5	100	2	40,0	3	60,0
Очаговый туберкулез	1	1	100	0	0	0	0
Все формы туберкулеза	41	26	63,4	9	22,0	13	31,7

У 10(24,39%) из 41 обследованных пациентов диагностирован рецидив заболевания. При рецидиве туберкулеза легких положительная бактериоскопия выявлена у 7 из 10 обследованных больных(70,0%), положительные результаты ПЦР-анализа и жизнеспособные МБТ при посеве были у всех обследованных(100%). Таким образом, высокая частота положительных реакций на микобактерии туберкулеза в отдаленном периоде (10 из 13 больных с положительными результатами ПЦР и посева) связана преимущественно с рецидивами заболевания.

У 29 из обследованных 41 больных туберкулезом легких(70,7%) диагностировано клиническое излечение. У пациентов с клиническим излечением результаты исследования мокроты на МБТ с помощью ПЦР были отрицательными у 15 человек(51,7%), бактериоскопии – у 28(96,5%), посева – у 29(100%) обследованных.

Положительные результаты ПЦР в этой группе отмечены у 14 из 29 пациентов(48,2%). Таким образом, у 14 больных туберкулезом легких с клиническим излечением заболевания положительный результат ПЦР сочетался с отрицательными данными посева мокроты на МБТ, что предположительно свидетельствует о нежизнеспособности выявленных микобактерий.

У 3(7,32%) человек, обследованных через 4-5 месяцев лечения, результаты ПЦР и посева оставались положительными.

Полученные данные свидетельствуют о том, что результат определения МБТ в мокроте методом ПЦР продолжает оставаться положительным через 2-3 месяца лечения у 70,0-76,27% обследованных больных. В отдаленные сроки химиотерапии(4-10 и более месяцев) выявление ДНК МБТ продолжает оставаться высоким у клинически излеченных пациентов, несмотря на отрицательный результат посева(48,2%).

Контроль эффективности лечения больных туберкулезом легких методом ПЦР-анализа должен проводиться в комплексе с посевами на выявление жизнеспособности.

Метод ПЦР может использоваться как дополнительный при контроле эффективности химиотерапии.

#### Список литературы

1. Brisson-Noel A., Nassif X. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of micobacterial DNA in clinical samples. Lancet, 1989, 2, p.1069-1071.
2. Бочкарев Е.Г., Денисова Т.С., Генерозов Э.В. и др. Генодиагностика во фтизиатрии. М., 2000,с.65.
3. Исмаилова А.Т. Современные аспекты диагностики и оценки эффективности лечения туберкулеза. Автореф. канд. дисс. Республика Казахстан, Алматы, 2003,с.10-13.
4. Владимирский М.А., Шипина Л.К., Иртуганова О.А. и др. Применение ПЦР-анализа в клинике туберкулеза. Диагностика, контроль эффективности лечения и определение лекарственной чувствительности микобактерий. Клиническая лабораторная диагностика. 2004,9,с.30.
5. Александров А.А., Владимирский М.А., Шипина Л.К. и др. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики и оценки эффективности химиотерапии туберкулеза легких. Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006,1,с.52-54.
6. Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Севастьянова Э.В. и др. Роль ПЦР-анализа в комплексных бактериологических исследованиях во фтизиатрии. Проблемы туберкулеза. 2000,3,с.58-60.

Рецензент: к.мед.н., доцент Асамбаев А.С.