

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДНК МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В БИОПСИЙНОМ МАТЕРИАЛЕ И БРОНХОАЛЬВЕОЛЯРНОМ ЛАВАЖЕ, ПОЛУЧЕННОМ ОТ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ С ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ**

*Долгова Е.А.<sup>1</sup>, Альварес Фигероа М.В.<sup>1</sup>, Шипулина О.Ю.<sup>1</sup>, Шахгильдян В.И.<sup>2</sup>, Сафонова О.П.<sup>1</sup>, Шипулин Г.А.<sup>1</sup>*

*ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора<sup>1</sup>, ИКБ №2, Москва<sup>2</sup>.*

### **Введение**

В последнее время большую значимость приобретает распространение ВИЧ-ассоциированного туберкулеза. Согласно данным ВОЗ Российская Федерация относится к числу наиболее неблагоприятных европейских стран по обозначенной проблеме [5]. На поздних стадиях ВИЧ-инфекции на фоне выраженного иммунодефицита изменяется иммунопатогенез заболевания в связи с чем верификация диагноза традиционными микробиологическими методами диагностики туберкулеза вызывает затруднения [1,4,7,10]. В то же время, своевременное выявление туберкулеза у ВИЧ-инфицированных пациентов приобретает особое значение, так как в условиях иммунодефицита промедление с началом лечения быстро приводит к генерализации процесса и смерти больного, а также к росту распространенности туберкулезной инфекции. Обнаружение ДНК микобактерий туберкулеза (МБТ) методом ПЦР в клиническом материале является достоверным и часто единственным маркером заболевания у ВИЧ-инфицированных пациентов [3].

Информативность ПЦР при исследовании того или иного вида материала, зависит как от локализации процесса, способа получения клинического материала, так и от эффективности выделения ДНК и наличия ингибиторов ПЦР в исследуемом образце [9]. С помощью технологии Real-time PCR появилась возможность определять концентрацию ДНК в исследуемых пробах [6,8] и, таким образом, оценивать эффективность выявления МБТ в том или ином виде клинического материала.

### **Цель**

Сравнить эффективность выявления ДНК МБТ в биопсийном материале и бронхо-альвеолярном лаваже (БАЛ), полученном при проведении бронхоскопии у ВИЧ-инфицированных больных.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования явились образцы БАЛ и биоптата легких и/или бронхов (забор которых осуществлялся одновременно при проведении диагностической бронхоскопии у каждого из 140 ВИЧ-инфицированных пациентов с дифференциальной диагностикой

туберкулеза легких), поступившие в лабораторию ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора из ИКБ №2 г. Москвы. Материал получен от 109 мужчин и 31 женщины в возрасте от 18 до 51 года.

Пробоподготовка осуществлялась согласно методическим указаниям по забору, транспортировке и хранению клинического материала для ПЦР-диагностики, разработанным в ФГУН ЦНИИЭ, Роспотребнадзора. 1 мл БАЛ центрифугировался 10 минут при 10 тыс.г., затем надосадочная жидкость аккуратно отбиралась до метки 100 мкл и из оставшегося осадка выделялась ДНК. Биопсийный материал размером 3-5 мм<sup>3</sup> тщательно растирался в эппендорфе тefлоновым пестиком, в 50 мкл PBS-буфера. В гомогенизованную ткань добавлялось 500 мкл PBS-буфера, материал осаждался на вортексе. Отбиралось 200 мкл супернатанта, который центрифугировался 10 минут при 10 тыс. г. Супернатант отбирался, осадок ресуспендировался в 100 мкл PBS-буфера. Выделение ДНК проводилось с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Для выявления ДНК МБТ и определения ее концентрации в клинических образцах была использована тест-система «АмплиСенс® *Mycobacterium tuberculosis*-Fl» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) на основе ПЦР с ГФ-детекцией результатов в режиме реального времени и набор калибраторов. Калибраторы представляли собой генно-инженерную конструкцию, полученную путем клонирования в плазмиду pGIM участка ДНК микобактерий, содержащего инсерционный элемент IS6110. Аналитическая чувствительность ПЦР-тест-системы «АмплиСенс® *Mycobacterium tuberculosis*-Fl» составляет  $2,5 \times 10^2$  коп/мл. Для проведения ПЦР использовали «RotorGene 3000» («Corbett Research», Австралия), с установленным на нем программным обеспечением «RotorGene 6.0» («Corbett Research», 2005).

### **Результаты**

При анализе двух исследуемых видов материала, полученных от 140 больных, ДНК МБТ была обнаружена у 41 больного (29,2%). Среди них у 18 больных (группа 1) ДНК МБТ одновременно детектировалась и в БАЛ, и в биоптатах (12,8%), у 16 больных (группа 2) ДНК МБТ была обнаружена только в БАЛ и не обнаруживалась в биоптатах (11,4%), и у 7 больных (группа 3) ДНК МБТ была обнаружена только в биоптатах (5%). В группе 1 средняя концентрация ДНК МБТ в БАЛ составила  $1,3 \times 10^6$  коп IS 6110/мл, в биоптатах -  $2,0 \times 10^6$  коп IS 6110/мл. У 9 пациентов концентрация ДНК МБТ в БАЛ превышала концентрацию ДНК МБТ в биоптатах, у 10 пациентов наблюдалась обратная ситуация. В группе 2 средняя концентрация ДНК МБТ в БАЛ составила  $2 \times 10^5$  коп IS 6110/мл. В 3 группе средняя концентрация ДНК МБТ в биоптатах составила  $6,8 \times 10^3$  коп IS 6110/мл (См.табл.1).

Таблица 1.

Группа	Вид материала	Максимальная нагрузка, коп IS 6110/мл	Минимальная нагрузка, коп IS 6110/мл	Медиана, коп IS 6110/мл	Средняя нагрузка, коп IS 6110/мл	Всего
1	БАЛ	$1,6 \times 10^7$	$3,5 \times 10^3$	$6,4 \times 10^4$	$1,3 \times 10^6$	18
	биоптат	$1,6 \times 10^7$	$7 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^6$	
2	БАЛ	$1,5 \times 10^6$	$8 \times 10^2$	$5,6 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$	16
3	биоптат	$2,2 \times 10^4$	$5 \times 10^2$	$3,7 \times 10^3$	$6,8 \times 10^3$	7

Из представленных в таблице данных видно, что средняя концентрация ДНК МБТ, выделенной с помощью набора «ДНК сорб-В» из биопсийного материала коррелирует с концентрацией ДНК, выделенной из бронхо-альвеолярного лаважа.

### Выводы

1. При использовании набора «ДНК сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), имеющего универсальное предназначение при работе с разными видами клинического материала при выявлении ДНК микобактерий, бактериальная нагрузка ДНК МБТ зависела от качества забора клинического материала и не зависела от его вида.

2. Для более достоверной верификации диагноза туберкулез необходимо использовать все виды материалов, которые возможно получать в результате проводимой бронхоскопии.

### Список литературы

1. Бабаева И.Ю., Фролова О.П., Демихова О.В. Рентгенологические особенности диссеминированного туберкулеза легких на поздних стадиях ВИЧ-инфекции. Проблемы туберкулеза и болезней легких - 2006 - № 10

2. Министерство здравоохранения РФ ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ. Забор, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики. Методические рекомендации. М., 2003

3. Шахгильдян В.И., Литвинова Н.Г., Морозова С.В., Шипулина О.Ю., Ташкевич О.А. Клиническое значение обнаружения ДНК микобактерий туберкулеза, цитомегаловируса, токсоплазмы в бронхоальвеолярном лаваже и биоптатах бронхов у ВИЧ-инфицированных больных с легочной патологией. Эпидемиология и инфекционные болезни – 2006 - № 6 – С.1-6

4. Andersen P. M., Pollock J.M., Doherty T.M. Specific immunebased diagnosis of tuberculosis. Lancet - 2000 - №356 (9235) - p.1099-1104

5. De Colombani P., Banatvala N., Zaleskis R., Maher D. European framework to decrease the burden of TB/HIV. Eur Respir J., 2004 - № 24 - p. 493–501

6. Desjardin L. E., Chen Y., Perkins M. D. et. al. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. – 1998 – №36 – p. 1964–1968
7. Elliott, A. M., Namaambo, K., Allen et. al. Negative sputum smears results in HIV-positive patients with pulmonary tuberculosis in Lusaka, Zambia. Tuber Lung Dis. – 1993. - №74 - p.191–194
8. Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. Real time quantitative PCR. Genome Res.- 1996 – №6 – p. 986-994
9. Kirschner P. et al // JCM. – 1996. – №2. - p.304-312
10. Maniar J.K., Kamath R.R., Mandalia S., Shah K., Maniar A. HIV and tuberculosis: Partners in crime. Indian J. Dermatol Venereol Leprol – 2006 - №72 - p.276-82