

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Філатова О.В.

УДК 616.24-002.5-07-08

ЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО МЕТОДУ ВИДІЛЕННЯ ДНК У ЛІКУВАННІ ВПЕРШЕ ДІАГНОСТОВАНОГО ХІМІОРЕЗИСТЕНТНОГО ТУБЕРКУЛЬОЗУ ЛЕГЕНЬ*

Філатова О.В.

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» м. Полтава

Проанализированы результаты молекулярно-генетического исследования ДНК из мокроты больных туберкулезом. Установлено, что при выявлении резистентности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам (изониазиду и рифампицину) и назначенного корректного лечения, повышается эффективность лечения впервые диагностированного химиорезистентного туберкулеза. Критериями эффективности были: сроки прекращения бактериовыделения и заживления деструктивных изменений в легких. Результаты проведенного исследования позволяют рекомендовать молекулярно-генетический метод выделения ДНК для коррекции лечения химиорезистентного туберкулеза.

Ключевые слова: химиорезистентный туберкулез, молекулярно-генетический метод ДНК.

Вивчення проблеми захворюваності на хіміорезистентний туберкульоз визначається в Україні та в світі постійним збільшенням хворих. Виявлення давніх випадків туберкульозу з деструкцією, поширеним процесом, неправильне лікування, порушення режиму хворими, незадовільне постачання медикаментів, сприяли зростанню випадків резистентності, що вважається причиною зростання епідемії туберкульозу. Сьогодні не достатньо вивчена проблема лікування вперше діагностованого деструктивного туберкульозу легень з первинною резистентністю МБТ до протитуберкульозних препаратів, актуальність якої має особливе значення, якщо врахувати, що первинну резистентність сучасними методами можна визначити через 2-4 місяці після встановлення діагнозу. В цей період хворому повинно бути призначене коректне лікування протитуберкульозними препаратами але оптимальний режим їх використання до цього часу ще не обґрунтований. Мета: підвищити ефективність лікування вперше діагностованого хіміорезистентного інфільтративного (n=30) та дисемінованого (n=30) туберкульозу легень за допомогою молекулярно-генетичного методу ДНК. Встановити за мінімальні строки до якого з протитуберкульозних препаратів (ізоніазиду чи рифампіцину) відмічається резистентність та одразу призначити коректне лікування. Серед обстежених пацієнтів переважали чоловіків було – 46 (76,6%), жінок 14 (23,4%). Серед чоловіків переважав вік 40-49 років, у жінок 20-29 відповідно. У групі з інфільтративним туберкульозом найбільшими виявились

показники мультирезистентності МБТ, вона була виявлена у 18 (60%) хворих, моно резистентність була у 12 (40%) пацієнтів. З дисемінованим туберкульозом показники були майже однаковими: монорезистентність у 10 (33,4%), мультирезистентність у 20 (66,6%). Отримані дані після лікування свідчать про актуальність застосування молекулярно-генетичного методу у сучасній фтизіатрії. Підвищується ефективність лікування (загоєння деструктивних змін в легенях, припинення бактеріовиділення).

Вступ

Останні роки характеризуються зниженням ефективності лікування туберкульозу легень, що пов'язано з негативними соціальними чинниками, наростаючою резистентністю *Mycobacterium tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів, що мають схильність до швидкого формування лікарської стійкості [1, 2, 3, 4]. В останні роки серед клінічних ізолятів микобактерій туберкульозу (МБТ) все частіше стали зустрічатися штами з резистентністю одночасно майже до всіх сучасних протитуберкульозних препаратів, використовуваних в клініці [5, 6, 7]. За оцінкою ВОЗ, близько 50 млн осіб на Землі інфіковані мультирезистентними штамми МБТ. Збудник туберкульозу має ряд унікальних особливостей. Виявлено достатнє число генів, здатних виробити білкові продукти, відповідальні за проникнення мікроба всередину клітин господаря і його внутрішньоклітинне існування [8, 9, 10, 11, 12]. Враховуючи внутрішньоклітинну локалізацію М.

* Цитування при атестації кадрів: Філатова О.В. Значення молекулярно-генетичного методу виділення днк у лікуванні вперше діагностованого хіміорезистентного туберкульозу легень // Проблеми екології і медицини. – 2013. – Т. 17, № 1-2. – С. 87–91.

tuberculosis та особливості її оболонки, транспорт генів резистентності представляється утрудненим, і у випадку резистентних штамів домінують мутаційні зміни хромосомних генів [13, 14, 15, 16]. Таким чином, вірогідність виникнення та відбору стійких штамів у великих популяціях мікобактерій на сьогоднішній день досить висока [17, 18, 19, 20].

Мета: підвищити ефективність лікування вперше діагностованого хіміорезистентного інфільтративного та дисемінованого туберкульозу лень за допомогою молекулярно-генетичного методу ДНК. Встановити за мінімальні строки до якого з протитуберкульозних препаратів (ізоніазиду чи рифампіцину) відмічається резистентність та одразу призначити коректне лікування.

Матеріали та методи дослідження

Було досліджено 60 хворих – 30 з інфільтративним та 30 з дисемінованим туберкульозом. Пацієнти захворіли вперше, у всіх були порожнини деструкції та бактеріовиділення. Всі хворі були з Полтави та Полтавської області. Серед обстежених пацієнтів переважали чоловіки – 46 (76,6%), жінок було 14 (23,4%).

Аналіз стійкості мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів (табл. 1). У групі з інфільтративним туберкульозом найбільшими виявились показники мультирезистентності МБТ, вона була виявлена у 18 (60%) хворих, монорезистентність була у 12 (40%) пацієнтів. З дисемінованим туберкульозом показники були майже однаковими: монорезистентність у 10 (33,4%), мультирезистентність у 20 (66,6%).

Таблиця 1

Характеристика резистентності по формах захворювання

Форма туберкульозу	Всього хворих	Монорезистентність	Мультирезистентність
Інфільтративний n=30	30	12	18
Абс %	100	40	60
Дисемінований n=30	30	10	20
Абс %	100	33,4	66,6

У хворих з інфільтративним туберкульозом домінували скарги на кашель 10 (33,4%), та слабкість 6 (20%). Дещо менше турбувала втрата ваги 2 (6,7%), підвищення температури 3 (10%) та одишка 2 (6,7%). У пацієнтів хворих на дисемінований процес картина інша: скарги на кашель 25 (83,4%), втрату ваги 21(70%), слабкість 27 (90%). Дещо менше турбувала підвищення температури 20 (6,67%) та одишка 10 (33,4%). Нами вивчено показники ШОЕ та лейкоцитів в обох групах на початку лікування. Прискорення ШОЕ та лейкоцитозу, більш виявлялись у хворих на дисемінований процес. ШОЕ від 30 до 60 мм/год і вище частіше зустрічалася також з цією формою. Прискорення ШОЕ (до 30 мм/год) у 21 (70%) випадків відмічене з інфільтративним туберкульозом, з дисемінованим – у 24 (80%) відповідно. Розглянемо розповсюдженість туберкульозного процесу в легенях. Рентгенологічне обстеження хворих показало, що розповсюдженість патологічного процесу в легенях була різноманітною. Деструкція спостерігалась у всіх хворих. При аналізі таблиці можна сказати, що з інфільтративним процесом найбільшою була розповсюдженість 1-2 см у 25 (83,3%), з дисемінованим найбільше <2-х см 16 (53,4%). В розробку бралися бацилярні хворі, у яких бактеріовиділення обов'язково підтверджувалося мікроскопічним та культуральним дослідженням з подальшим визначенням чутливості мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів.

Комплексна оцінка масивності бактеріовиділення за даними мікроскопії дозованого мазка і методу посіву з кількісним підрахунком колоній на щільному поживному середовищі була проведена 60 пацієнтам. Мікроскопічно скудне бактеріовиділення домінувало у

пацієнтів з інфільтративним туберкульозом – 20 осіб (66,6%), дещо менше воно спостерігалось з дисемінованим туберкульозом – 5 осіб (16,7%). Помірне у 9 (30%) та 14 (46,7%) хворих відповідно, масивне бактеріовиділення було у пацієнтів з інфільтрацією 1 (3,4%) та дисемінацією 11 (36,6%) відповідно. Культурально скудне бактеріовиділення домінувало також у пацієнтів з інфільтрацією – 17 (56,6%), дещо менше воно спостерігалось з дисемінованим процесом – 4 (13,4%). Помірне бактеріовиділення дещо більше виявлялося з дисемінацією – 14 (46,6%), з інфільтрацією воно було у 13 (43,4%). Масивне бактеріовиділення не спостерігалось у пацієнтів з інфільтрацією 0 (0%), та з дисемінацією 12 (40%) відповідно. З культури мікобактерій туберкульозу виділені ДНК досліджувались на чутливість до ізоніазиду та рифампіцину молекулярно-генетичним методом. У всіх пацієнтів досліджували харкотиння та виділену з неї культу М. tuberculosis за допомогою локусів groB та katG. За результатами визначення мутацій в генах, відповідальних за чутливість збудника туберкульозу до вище згаданих протитуберкульозних препаратів, призначалися схеми хіміотерапії.

Знаючи резистентність МБТ, ми з самого початку лікування підвищили дозування фторхінолонів (етіонаміду та левофлоксацину) з урахуванням часу прийому пероральних препаратів. Через 4 години після прийому таблеток, коли бактеріостатична активність у крові досягла максимуму, ми вводили вище згадані препарати внутрішньовенно, тим самим підвищуючи їх властивості.

Таблиця 2

Режими хіміотерапії в залежності від стійкості МБТ до протитуберкульозних препаратів

Стійкість МБТ	Режим хіміотерапії	
	Інтенсивна фаза	Підтримуюча фаза
H	R0,6+Z 2,0+E 1,2+S1,0+PAS 400,0	R 0,6+E 1,2+Ofx 0,8
R	H 0,6+Z 2,0+E 1,2+PAS 400,0+Lfx 1,0	H 0,6+R 0,6+Z 2,0+ Et1,0
H+R	Z2,0+E1,2+K1,0+PAS400,0+Pt 1,0	Z2,0+E1,2+Ofx0,8+PAS400,0+ Pt 1,0

Отримані результати оброблені та проаналізовані комп'ютерною програмою «MS Excel 2007». Також аналіз даних проводили за допомогою прикладного пакету «Statistica 6.0». Дані для категоризованих показників представлені в тексті абсолютними величинами, а для безперервних показників, стандартними методами варіаційної статистики: розраховували середні величини, середньоквадратичні відхилення та середні помилки середніх арифметичних величин. За допомогою критерія Стюдента оцінювали різницю середніх величин в порівнюваних групах (p). Достовірною різницею вважали ту, що перебувала в межах достовірності Стюдента менше 0,05.

Результати та їх обговорення

В кінці стаціонарного лікування було зібрано скарги у хворих обох формами туберкульозу. З інфільтра-

тивною формою скарг ніхто з пацієнтів не виявляв, з дисемінованою скаржився на невелику слабкість тільки 1 (3,4%) хворий. Зміни в крові після лікування у вигляді прискорення ШОЄ та лейкоцитозу, майже були однаковими при обох формах. ШОЄ від 30 до 60 мм/год і вище не визначалося. Прискорення ШОЄ (до 15 мм/год) з інфільтративним - у 28 (93,4%), з дисемінованим 81,6% ((p<0,05)). Незначний лейкоцитоз був у 1 (3,4%) хворого на дисемінований туберкульоз.

На рисунку 1 в групі з інфільтративним процесом мікроскопічно вдалося досягти абацилювання через 6 місяців лікування у 15 (50%), з дисемінованим у 12 (40%) (p<0,05) хворих. Через 7-8 місяців абацилювання наступило у 24 (80%) з інфільтрацією та у 20 (66,6%) (p<0,05) дисемінацією. На 9-10 місяць лікування абацилювання припинилося у всіх хворих.

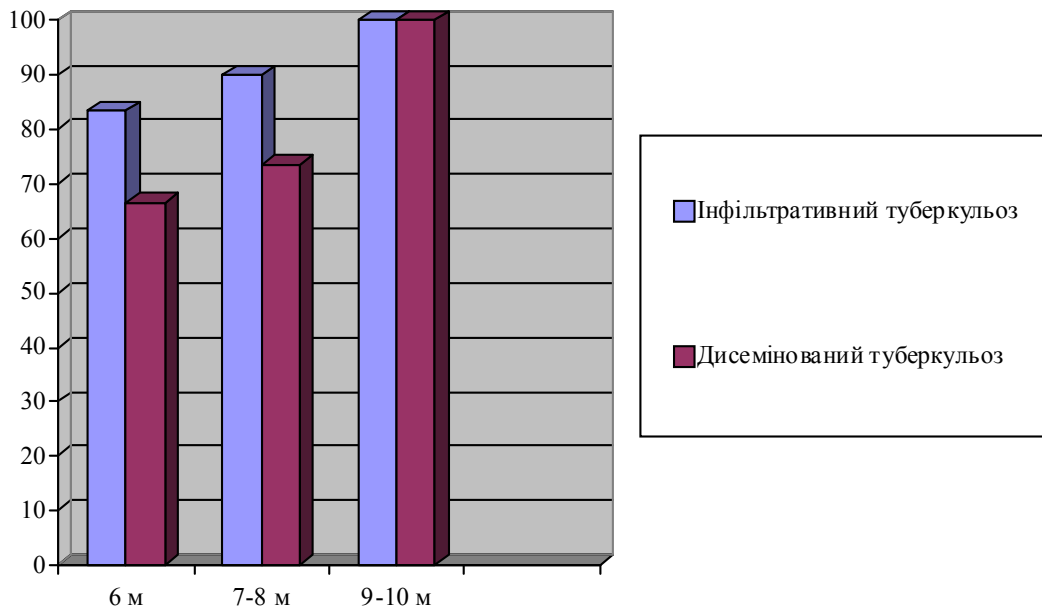


Рисунок 1. Динаміка строків абацилювання методом

мікроскопії в обох групах наприкінці лікування.

Культурально абацилювання припинилося через 6 місяців лікування у першій 25 (83,4%), у другій 20 (66,7%) (p<0,05). Через 7-8 місяців абацилювання на-

ступило у 27 (90%) з інфільтративним туберкульозом та у 22 (73,4%) (p<0,05) з дисемінованим. На 9-10 місяць лікування вдалося досягти абацилювання у всіх хворих в обох групах (рис. 2).

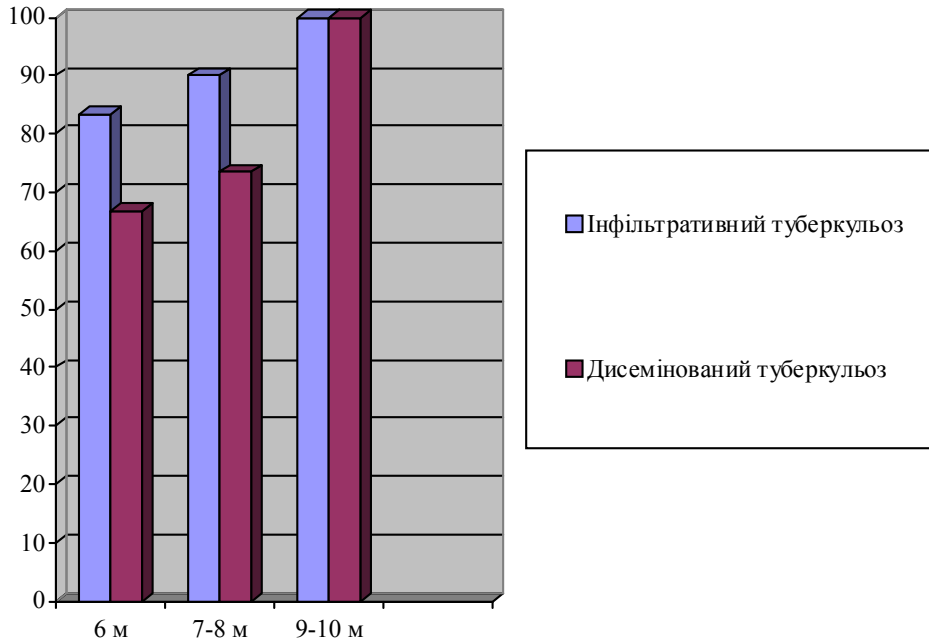


Рисунок 2. Динаміка строків абацилювання культуральним методом в обох групах наприкінці лікування.

В першій та другій групі через 4-6 місяців лікування патологічні тіні розсмоктались та загоїлися деструкції у 20 (66,7%) та у 14 (46,7%) ($p < 0,05$) відповідно.

Через 8-9 місяців загоєння деструкції відмічалось у всіх пацієнтів (рис. 3).

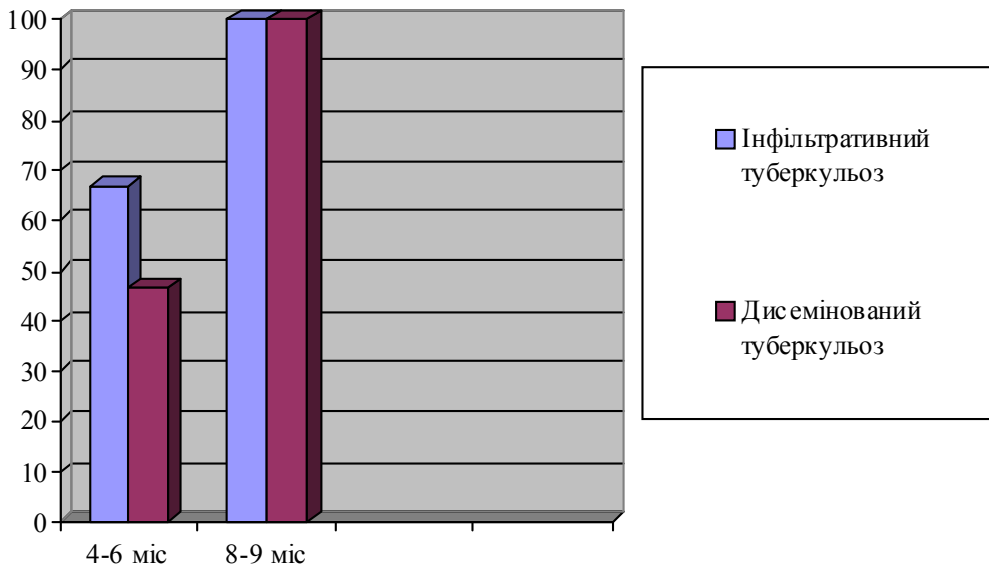


Рисунок 3. Динаміка строків розсмоктування вогнищ та рубцювання деструкцій в обох групах наприкінці лікування

Висновки

1. Отримані показники свідчать про те, що використання патогенетичної терапії у вперше виявлених хворих на деструктивний туберкульоз легень після отримання даних про стійкість мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів дозволяє підвищити ефективність лікування як за показниками абацилювання мокротиння, так і по загоєнню деструк-

тивних змін в легенях, у порівнянні з лікуванням хворих тільки по протоколу.

2. Наприкінці стаціонарного лікування скарги у хворих обох груп були такими: у основній групі скаржились на кашель 2 пацієнти (3,4%), у контрольній – 4 (6,6%) ($p < 0,05$). Скаржився на слабкість 1 (1,6%) хворий основної групи, та 2 (3,4%) ($p < 0,05$) з контрольної групи. Прискорення ШОЄ спостерігалось у основній групі у 7 (11,6%), у контрольній у 14 (23,4%) ($p < 0,05$). Лейкоцитоз мав місце у 1 (1,6%) хворого основної

групи, та у 3(5%) ($p < 0,05$) у контрольній. При аналізі розсмоктування вогнищ та рубцювання деструкцій через 6 місяців та при виписці, ми отримали наступні дані. В основній та контрольній групі через 6 місяців лікування патологічні тіні розсмоктувались у 56 (93,3%) та у 52 (86,6%) відповідно ($p < 0,05$). Через 9 місяців рубцювання деструкції було у 60 (100%) хворих в обох групах. Через 6 місяці абацільювання методом мікроскопії наступило у 50 (83,3%) в основній групі та у 46 (76,6%) ($p < 0,05$) в контрольній. Через 7-8 місяців припинення бактеріовиділення у 56 (93,4%) в основній групі, та у 51 (85%) в контрольній ($p < 0,05$). На 9-10 місяць лікування вдалося досягти абацільювання у всіх хворих в обох групах. Абацільювання культуральним методом в обох групах представлено далі. Через 6 місяці абацільювання наступило у 52 (86,6%) в основній групі та у 47 (78,4%) в контрольній ($p < 0,05$). Через 7-8 місяців в основній групі мікроскопічно бактеріовиділення припинилось у 57(95%) пацієнтів, в контрольній у 54 (90%) ($p < 0,05$). На 9-10 місяць лікування припинилось абацільювання у всіх хворих в обох групах.

3. Молекулярно-генетичний аналіз *M. tuberculosis* показав, що у всіх пацієнтів була резистентність до ізоніазиду та рифампіцину. Пацієнтів що мали резистентність до ізоніазиду, було більше, з дисемінованим туберкульозом в обох групах 7 (23,4%) та 4 (13,4%), відповідно ($p < 0,05$).

4. З інфільтративною формою скарг ніхто не виявив, з дисемінованою скаржився на невелику слабкість тільки 1 (3,4%) хворий. Зміни в крові після лікування у вигляді прискорення ШОЕ та лейкоцитозу, майже були однаковими при обох формах. Суттєвого підвищення ШОЕ не визначалося. Незначний лейкоцитоз був у 1 (3,4%) хворого на дисемінований туберкульоз. При аналізі розсмоктування вогнищ та рубцювання деструкцій, ми отримали наступні дані. В першій та другій групі через 4-6 місяців лікування патологічні тіні розсмоктувались у 20 (66,7%) та у 14 (46,7%) відповідно ($p < 0,05$). Через 8-9 місяців загоєння деструкції відмічалось у всіх пацієнтів. В групі з інфільтративним процесом мікроскопічно вдалося досягти абацільювання через 6 місяців лікування у 15 (50%), з дисемінованим у 12 (40%) хворих ($p < 0,05$). Через 7-8 місяців абацільювання наступило у 24 (80%) з інфільтрацією та у 20 (66,6%) дисемінацією ($p < 0,05$). На 9-10 місяць лікування абацільювання припинилося у всіх хворих. Культурально абацільювання припинилося через 6 місяців лікування у першій 25 (83,4%), у другій 20 (66,7%) ($p < 0,05$). Через 7-8 місяців абацільювання наступило у 27 (90%) з інфільтративним туберкульозом та у 22 (73,4%) з дисемінованим ($p < 0,05$). На 9-10 місяць лікування вдалося досягти абацільювання у всіх хворих в обох групах.

5. Таким чином, вище наведені дані свідчать про те, що додавання запропонованої патогенетичної терапії та застосування молекулярно-генетичного методу, після якого можливо призначити коректне лікування, підвищують ефективність лікування вперше діагностованого деструктивного хіміорезистентного туберкульозу легень.

Література

1. Бажора Ю. И. Молекулярно-генетические и биофизические методы исследования в медицине / Ю. И. Бажора, В. И. Кресюн, В. Н. Запорожан. – К. : Здоров'я, 1996. – 208 с.
2. Биологические свойства лабораторных штаммов и клинических изолятов микобактерий, полирезистентных к противотуберкулезным препаратам / А. А. Кор-

- неев, В. И. Гольшевская, Э. В. Севастьянова [и др.] // Проблемы туберкулеза. – 1999. – № 2. – С. 44–47.
3. Вишневский Б. И. Частота и структура лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза при различных локализациях заболевания / Б. И. Вишневский, Л. Н. Стеклова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 12. – С. 5–8.
4. Выявление мутаций в кодоне 306 *EMB* гена для молекулярно-генетической характеристики клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / М. В. Афанасьев, А. Д. Боровская, Е. Н. Ильина [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2009. – № 5. – С. 48–53.
5. Иванова А. А. Тактика лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких / А. А. Иванова, М. В. Павлова, Л. И. Арчакова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 5 – С. 14–16.
6. Кононец А. С. Эффективность лечения впервые выявленных больных туберкулезом легких с высокой лекарственной устойчивостью возбудителя / А. С. Кононец, В. Ю. Мишин // Инфекционные болезни. – 2008. – Т. 6, № 4. – С. 68–71.
7. Лекарственная чувствительность *Mycobacterium tuberculosis* в сопоставлении с их жизнеспособностью, цитотоксичностью, генотипом и течением процесса у больных туберкулезом органов дыхания / О. А. Маничева [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 12. – С. 18–22.
8. Молекулярно-генетические и бактериологические методы диагностики *M. Tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью / Ф. Ф. Агаев [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 9. – С. 32–35.
9. Молекулярно-генетические технологии в этиологической диагностике диссеминированного туберкулеза легких / В. Ю. Журавлев, О. В. Нарвская, А. А. Вязовая [и др.] // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 3. – С. 77–81.
10. Мякишева Т. В. Сравнительная характеристика течения лекарственно-устойчивого и лекарственно-чувствительного туберкулеза легких у впервые выявленных больных молодого возраста / Т. В. Мякишева, В. Ю. Мишин // Пульмонология. – 2009. – № 3. – С. 96–100.
11. Нестеренко Л. Н. Использование молекулярно-биологических методов в диагностике и типировании штаммов *M. Tuberculosis* / Л. Н. Нестеренко // Молекулярные основы патогенеза и диагностики туберкулеза и другой легочной патологии : материалы научно-практической конференции. – М., 1995. – С. 37–38.
12. Новые технологии определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* / О. И. Скотникова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 6. – С. 40–41.
13. Новожилова И. А. Значимость определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза для успешного лечения туберкулеза легких / И. А. Новожилова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 4. – С. 29–30.
14. Первичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у больных с впервые выявленным деструктивным туберкулезом легких / И. П. Зиновьев, Н. А. Эсаулова, В. Г. Новиков, И. А. Коковихина // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2009. – № 4 – С. 37–39.
15. Cohn D. L. Drug resistance (DR) to anti-tuberculosis medications: global drug resistance rates / D. L. Cohn, F. Bustreo, M. Raviglione // The Europ. Resp. Dis. – 1995. – Vol. 8, Suppl. 19. – P. 505.
16. Dixie E. S. The global treat of Drug-Resistant Tuberculosis / E. S. Dixie, G. G. Kenneth // The New England Journal of Medicine. – 1998. – Vol. 338, № 23. – P. 1689–1690.
17. Geerligs W. A. Multidrug-resistant tuberculosis: long-term treatment outcome in the Netherlands / W. A. Geerligs, R. Van Altena, W. C. M. De Lange // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2000. – Aug., Vol. 4 (8). – P. 758–764.
18. Iseman M. D. Drug-resistant tuberculosis / M. D. Iseman, L. A. Madsen // Clinics in Chest Medicine. – 1993. – Vol. 10, № 3. – P. 65–70.
19. Willcox P. A. Drug-resistant tuberculosis / P. A. Willcox // Curr Opin Pulm Med. – 2000. – May, Vol. 6 (3). – P. 198–202.

20. The threat of multidrug-resistant tuberculosis: results of 1 yr of surveillance in the Lombardy region of Italy / G. Salamina, L. Sodano, F. Mezzetti, M. L. Moro //

Monaldi Arch Chest Dis. – 1999. – Aug., Vol. 54 (4). – P. 332–336.

English version: VALUE MOLECULAR GENETIC METHODS OF DNA EXTRACTION IN THE TREATMENT OF NEWLY DIAGNOSED CHEMORESISTANCE TUBERCULOSIS*

Filatova O.V.

Higher State educational if Ukraine "Ukrainian Medical Dental Academy", Poltava

The results of the genetic research of DNA from the sputum of patients with tuberculosis. Found that the detection of Mycobacterium tuberculosis resistance to antituberculosis drugs (isoniazid and rifampicin) and assigned the correct treatment, increases the effectiveness of the treatment of newly diagnosed tuberculosis chemoresistance. Performance criteria were: the timing of bacteriological and healing the destructive changes in the lungs. The results of this study allow us to recommend the molecular-genetic method of DNA extraction for the correction of the treatment of tuberculosis chemoresistance.

Key words: chemoresistant tuberculosis, molecular-genetic method of DNA.

Learning problems himiorezystentnyy TB incidence is determined in Ukraine and worldwide steady increase of patients. Detection of long-standing cases of tuberculosis with destruction, common process, improper treatment, violations of the sick, poor supply of medicines have increased cases of resistance that is the cause of increase in TB. Today is not sufficiently studied the problem of treatment of newly diagnosed destructive pulmonary tuberculosis with primary resistance of Mycobacterium tuberculosis to anti-TB drugs, the relevance of which is of particular importance given that the modern methods of primary resistance can be determined in 2-4 months after diagnosis. During this period, the patient should be assigned the correct anti-TB drugs but the best mode to use them at this time is not justified. Objective: To increase the effectiveness of treatment of newly diagnosed himiorezystentnoho infiltrative (n = 30) and disseminated (n = 30) TB lenen using molecular genetic methods DNA. Set the minimum time which of anti-TB drugs (isoniazid or rifampicin) resistance is observed and immediately assign the correct treatment. Among the patients studied were dominated by men - 46 (76,6%), 14 women (23,4%). Among men prevailed age 40-49, women 20-29, respectively. In the group with infiltrative tuberculosis appeared to be the major indicators multyrezystentnosti Office, it was found in 18 (60%) patients had mono-resistance in 12 (40%) patients. With disseminated tuberculosis rates were almost identical: monorezystentnist in 10 (33,4%), multyrezystentnist in 20 (66,6%). The data obtained after treatment show the relevance of the application of molecular genetic methods in modern Tuberculosis. Increases the effectiveness of therapy (healing destructive changes in lungs, stopping bacteria).

Introduction

Recent years are characterized by a decrease the effectiveness of treatment of pulmonary tuberculosis, which is associated with negative social factors, the

increasing resistance of Mycobacterium tuberculosis to anti-TB drugs that are prone to rapid formation of drug resistance [1, 2, 3, 4]. In recent years among clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis (MBT) has been increasingly meet both strains with resistance to almost all modern anti-TB drugs used in the clinic [5, 6, 7]. WHO estimates that about 50 million people on Earth are infected with multidrug resistant strains. The causative agent of tuberculosis has some unique features. We found a sufficient number of genes that can produce protein products responsible for the penetration of microbes into the host cells and its intracellular existence [8, 9, 10, 11, 12]. Due to the intracellular localization of M. tuberculosis and especially its membrane transport resistance genes seems difficult, in the case of resistant strains dominate the mutational changes of chromosomal genes [13, 14, 15, 16]. Thus, the probability of occurrence and selection of resistant strains of Mycobacterium large populations today is quite high [17, 18, 19, 20].

Objective: To increase the effectiveness of treatment of newly diagnosed himiorezystentny infiltrative and disseminated tuberculosis using molecular genetic methods DNA. Set the minimum time which of anti-TB drugs (isoniazidi or rifampicini) resistance is observed and immediately assign the correct treatment.

Materials and methods

60 patients were studied - 30 of 30 infiltrative and disseminated tuberculosis. Patients sick the first time, all had cavities and bacterial degradation. All patients were from Poltava and Poltava region. Among the patients studied was dominated men - 46 (76,6%) women were 14 (23,4%).

Analysis of resistance of Mycobacterium tuberculosis to anti-TB drugs (Table 1). In the group with infiltrative tuberculosis appeared to be the major indicators multyrezystant, it was found in 18 (60%) patients had monorezystant 12 (40%) patients. With disseminated tuberculosis rates were almost identical: monorezystant in 10 (33,4%), multyrezystent in 20 (66,6%).

*Table 1
Characterization of resistance to forms of the disease*

* To cite this English version: Filatova O.V. Value molecular genetic methods of dna extraction in the treatment of newly diagnosed chemoresistance tuberculosis // Problemy ekologii ta medytyny. - 2013. - Vol 17, № 1-2. - P. 92 -96.

Form	Total TB	Patients Monorezistant	Patients Multyrezistant
Infiltrative n=30	30	12	18
Abs %	100	40	60
Disseminated n=30	30	10	20
Abs %	100	33,4	66,6

In patients with infiltrative tuberculosis dominated by complaints of cough 10 (33,4%), and weakness of 6 (20%). Some less worried about losing weight 2 (6,7%), fever 3 (10%) and stuffiness 2 (6,7%). In patients with disseminated process picture is different: complaints of cough 25 (83,4%), weight loss 21 (70%), fatigue 27 (90%). Some less worried fever 20 (6,67%) and stuffiness 10 (33,4%).

We studied the performance of ESR and WBC in both groups at the beginning of treatment. Shows that changes in the blood as accelerating SHOYE and leukocytosis, are identified more patients with disseminated process. SHOYE from 30 to 60 mm / h and above are also more common with this form. Acceleration SHOYE (30 mm /h) in 21 (70%) cases marked with infiltrative tuberculosis, disseminated - in 24 (80%), respectively.

Consider the prevalence of tuberculosis in the lungs. X-ray examination of patients showed that the prevalence of pathological process in the lungs was varied. The destruction was observed in all patients. When analyzing the table we can say that the infiltrative process was greatest prevalence of 1-2 cm in 25 (83,3%) with disseminated most <2cm 16 (53,4%).

Taken in the development of bacillary patients in whom bacterial necessarily confirmed by microscopic and culture results, followed by determination of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to anti-TB drugs. Comprehensive Assessment of massiveness bacteria according to dosage smear microscopy and by culture

with quantitative counting of colonies on nutrient dense medium was performed 60 patients. Microscopically poorly bacteria dominated in patients with infiltrative tuberculosis - 20 people (66,6%), somewhat less than it was observed with disseminated tuberculosis - 5 people (16,7%). Moderate in 9 (30%) and 14 (46,7%) patients, respectively, had a massive bacterial infiltration in patients with 1(3,4%) and dissemination 11 (36,6%), respectively. Poorly bacterial culture dominated in patients with infiltration - 17 (56,6%), somewhat less than it was observed with disseminated process - 4 (13,4%). Somewhat more moderate bacterial dissemination turned out - 14 (46,6%), with infiltration it was in 13 (43,4%). Massive bacteria were observed in patients with infiltration 0 (0%), and dissemination of 12 (40%), respectively.

In cultures of Mycobacterium tuberculosis isolated DNA were tested for susceptibility to isoniazidi and rifampicini molecular genetic methods. All patients studied specimens and isolated from her cult M. tuberculosis by rpoB locus and katG. According to the definition of mutations in genes responsible for sensitivity of Mycobacterium tuberculosis to the above mentioned anti-TB drugs intended regimens. Knowing the resistance of MBT, we initially treat increased dosage of fluoroquinolones (levofloxacini and Ethionamidi) including the time for oral medication. After 4 hours after taking the pill when bacteriostatic activity in the blood peaked, we introduced above mentioned drugs intravenously, thereby enhancing their properties.

Table 2
Chemotherapy regimen based on resistance to Mycobacterium tuberculosis TB drugs

Resistant	Chemotherapy regimens	
	Intensive phase	Maintenance phase
H	R0,6+Z 2,0+E 1,2+S1,0+PAS 400,0	R 0,6+E 1,2+Ofx 0,8
R	H 0,6+Z 2,0+ E 1,2 + PAS 400,0+Lfx 1,0	H 0,6+R 0,6+Z 2,0+ Et 1,0
H+R	Z 2,0+E 1,2+K 1,0+PAS 400,0+Pt 1,0	Z 2,0+ E 1,2 +Ofx 0,8 + PAS 400,0+ Pt 1,0

The results are processed and analyzed by a computer program «MS Excel 2007». Also, analysis of the data was performed using software packages «Statistica 6.0». Data for the indicators are categorized in the text of the absolute values and for continuous parameters, standard methods of variational statistics: averages calculated RMS deviation and average values of arithmetic errors. Using the criterion Student estimated difference of averages in the two groups (p). Significant difference was considered one that was within the accuracy Student less than 0,05.

Results and Discussion

At the end of inpatient treatment were collected complaints in patients with both tuberculosis. With infiltrative form of complaints, none of the patients did not

show with disseminated complained of slight weakness only 1 (3,4%) patients. Zminy levels after treatment in the form of accelerated SHOYE and leukocytosis, were almost identical in both forms. SHOYE from 30 to 60 mm / h and was not measured. Acceleration SHOYE (15 mm / h) with infiltrative - in 28 (93,4%), 81,6% with disseminated ((p <0,05)). Slight leukocytosis was 1 (3,4%) patient with disseminated tuberculosis. The figure number 1 in the group with microscopically infiltrative process abatsylyuvannya achieved after 6 months of treatment in 15 (50%) with disseminated in 12 (40%) (p <0,05) patients. After 7-8 months abatsylyuvannya occurred in 24 (80%) of infiltration and in 20 (66,6%) (p<0,05) dissemination. At 9-10 months of treatment abatsylyuvannya stopped in all patients.

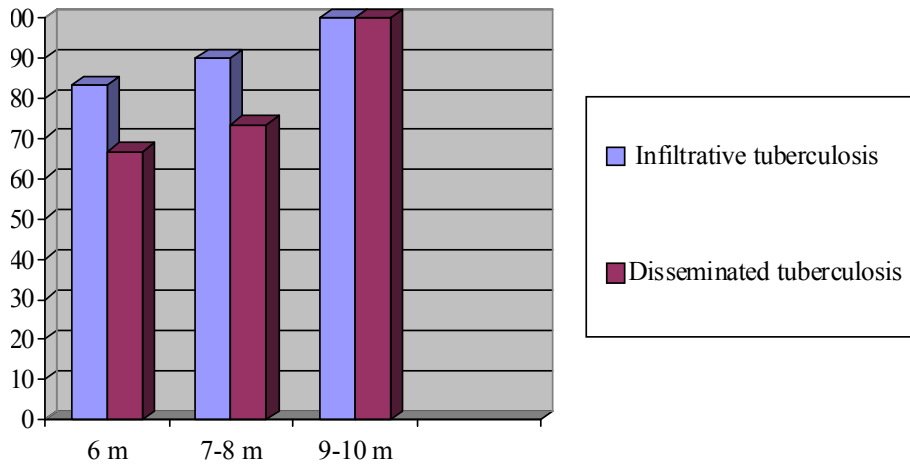


Figure 1. Dynamics terms bacillates by microscopy in both groups at the end of treatment

Culture bacillates stopped after 6 months of treatment in the first 25 (83,4%) in the second 20 (66,7%) ($p < 0,05$). After 7-8 months bacillates occurred in 27

(90%) with infiltrative tuberculosis and in 22 (73,4%) ($p < 0,05$) with disseminated. At 9-10 months of treatment bacillates achieved in all patients in both groups (Fig. 2).

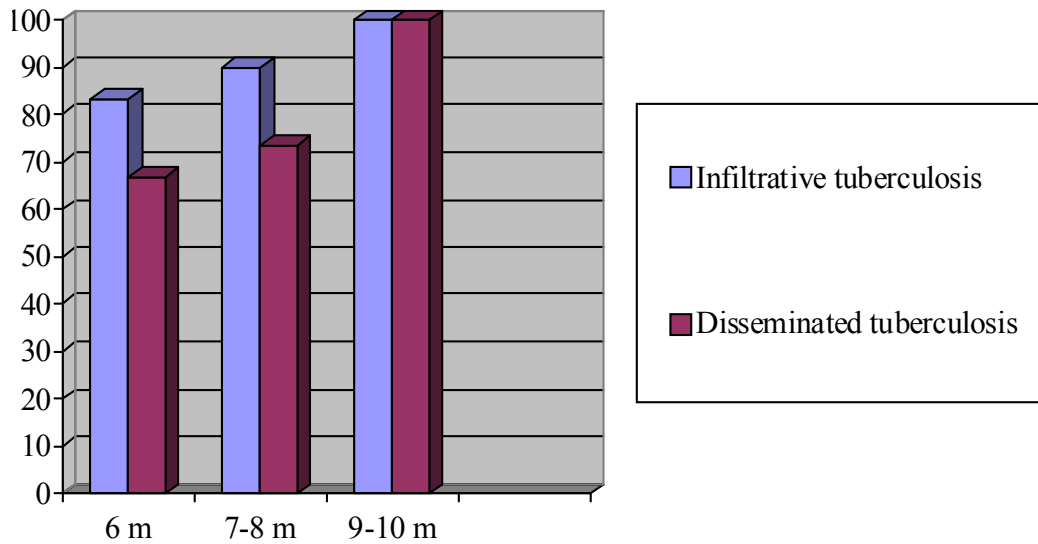


Figure 2. Dynamics terms bacillates culture method in both groups at the end of treatment

In the first and second group after 4 - 6 months of treatment, abnormal shadows resorption destruction and healed in 20 (66,7%) and in 14 (46,7%) ($p < 0,05$),

respectively. After 8-9 months of healing degradation was noted in all patients (Fig. 3).

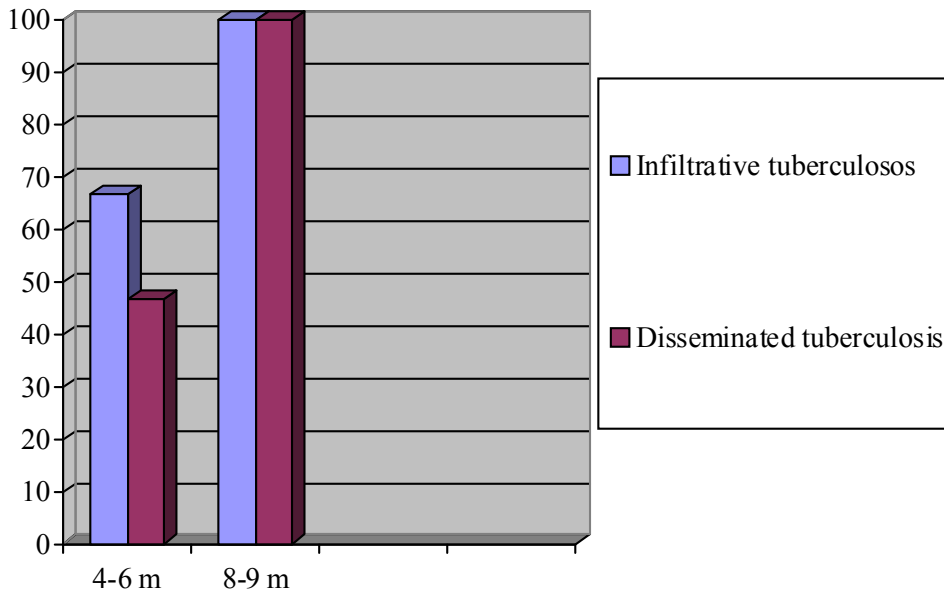


Figure 3. Dynamics timing resolution of lesions and scarring destruction in both groups at the end of treatment

Conclusions

1. These figures indicate that the use of immunosuppressive therapy in newly diagnosed patients with destructive pulmonary tuberculosis after receiving data on resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to anti-TB drugs can increase the effectiveness of treatment in terms of both abacilates phlegm and healing to destructive changes in the lungs, compared with treatment of patients with only minutes.

2. At the end of hospitalization in patients with complaints of both groups were as follows: in the study group complained of cough 2 patients (3,4%) in the control - 4 (6,6%) ($p < 0,05$). Complained of weakness 1 (1,6%) patients of the group, and 2 (3,4%) ($p < 0,05$) from the control group. Acceleration SHOYE observed in the study group in 7 (11,6%) in the control group in 14 (23,4%) ($p < 0,05$). Leukocytosis occurred in 1 (1,6%) patients of the main group and in 3 (5%) ($p < 0,05$) in the control. In the analysis of resorption lesions and scarring destruction after 6 months and at discharge, we received the following information. In the study and control group after 6 months of treatment resorption abnormal shadow in 56 (93,3%) and 52 (86,6%), respectively ($p < 0,05$). After 9 months of destruction was scarring in 60 (100%) of the patients in both groups. Through 6 months abacilates by microscopy occurred in 50 (83,3%) in the intervention group and 46 (76,6%) ($p < 0,05$) in the control. After 7-8 months of suspension of bacteria in 56 (93,4%) in the intervention group and in 51 (85%) in the control group ($p < 0,05$). At 9-10 months of treatment abacilates achieved in all patients in both groups. Abacilates culture method in both groups are presented below. After 6 months abacilates occurred in 52 (86,6%) in the intervention group and 47 (78,4%) in the control group ($p < 0,05$). After 7-8 months in the intervention group stopped microscopic bacteria in 57 (95%) patients in the control group in 54 (90%) ($p < 0,05$). At 9-10 months of treatment stopped abacilates all patients in both groups.

3. Molecular genetic analysis of *M. tuberculosis* showed that all patients had resistance to isoniazidi and rifampicini. Patients who had resistance to isoniazidi was

more of disseminated tuberculosis in both groups, 7 (23,4%) and 4 (13,4%), respectively ($p < 0,05$).

4. With infiltrative form of complaints nobody showed, with disseminated complained of slight weakness only 1 (3,4%) patients. Changes in the blood after treatment in the form of accelerated SHOYE and leukocytosis, were almost identical in both forms. Significant increase SHOYE not measured. Slight leukocytosis was 1 (3,4%) patient with disseminated tuberculosis. In the analysis of resorption lesions and scarring destruction, we obtained the following data. In the first and second group after 4 - 6 months of treatment resorption abnormal shadow in 20 (66,7%) and in 14 (46,7%), respectively ($p < 0,05$). After 8-9 months of healing degradation was noted in all patients. In the group with microscopically infiltrative process abacilates achieved after 6 months of treatment in 15 (50%), and disseminated in 12 (40%) patients ($p < 0,05$). After 7-8 months abacilates occurred in 24 (80%) of infiltration and in 20 (66,6%), dissemination ($p < 0,05$). At 9-10 months of treatment abacilates stopped in all patients. Culture abacilates stopped after 6 months of treatment in the first 25 (83,4%) in the second 20 (66,7%) ($p < 0,05$). After 7-8 months abacilates occurred in 27 (90%) with infiltrative tuberculosis and in 22 (73,4%) with disseminated ($p < 0,05$). At 9-10 months of treatment abacilates achieved in all patients in both groups.

5. Thus, the data above indicate that the proposed addition of immunosuppressive therapy and the use of molecular genetic method, after which you can assign the correct treatment, increase the effectiveness of treatment of newly diagnosed destructive pulmonary tuberculosis himiorezistentny.

References

1. Bazhora Yu. I. Molekulyarno-geneticheskie i biofizicheskie metody issledovaniya v medizine / Yu. I. Bazhora, V. I. Kresyun, V. N. Zaporozhan. - K. : Zdorov'ya, 1996. - 208 s.
2. Biologicheskie svoystva laboratornykh shtammov i klinicheskikh izolyatorov mikobakteriy, polirezistentnykh k protivotuberkuleznym preparatam / A. A. Korneev, V. I. Golyshvskaya, E. V. Sevast'yanova [i dr.] // Problemy tuberkuleza. - 1999. - № 2. - S. 44-47.
3. Vishnevskiy B. I. Chastota i struktura lekarstvennoy ustoychivosti mikobakteriy tuberkuleza pri razlichnykh

- lokalizacijach zabolevaniya / B. I. Vishnevskiy, L. N. Steklova // Problemy tuberkuleza i bolezney legkich. – 2008. – № 12. – S. 5–8.
4. Vyyavlenie mutaziy v kodone 306 EMVV gena dlya molekulyarno-geneticheskoy charakteristiki klinicheskikh shtammov Mycobacterium tuberculosis / M. V. Afanas'ev, A. D. Borovskaya, E. N. Il'ina [i dr.] // Problemy tuberkuleza i bolezney legkich. – 2009. – № 5. – S. 48 - 53.
 5. Ivanova A. A. Taktika lecheniya lekarstvenno-ustoychivogo tuberkuleza legkich / A. A. Ivanova, M. V. Pavlova, L. I. Archakova // Problemy tuberkuleza i bolezney legkich. – 2003. – № 5 – S. 14–16.
 6. Kononez A. S. Effektivnost' lecheniya vperve vyyavlenykh bol'nykh tkberkulezom legkich s vysokoy lekarstvennoy ustoychivost'yu vozбудitelya / A. S. Kononez, V. Yu. Mishin // Infekzionnye bolezni. – 2008. – T. 6, № 4. – С. 68–71.
 7. Lekarstvennaya chuvstvitel'nost' Mycobacterium tuberculosis v sopostavlenii s ich zhiznesposobnost'yu, ziotoksichnost'yu, genotipom i techeniem prozessa u bol'nykh tuberkulezom organov dyhaniya / O. A. Manicheva [i dr.] // Problemy tuberkuleza i bolezney legkich. – 2008. – № 12. – S. 18–22.
 8. Molekulyarno-geneticheskie i bakteriologicheskie metody diagnostiki M. Tuberculosis s mnozhestvennoy lekarstvennoy ustoychivost'yu / F. F. Agaev [i dr.] // Tuberkulez i bolezni legkich. – 2009. – № 9. – S. 32–35.
 9. Molekulyarno-geneticheskie tehnologii v etiologicheskoy diagnostike disseminirovannogo tuberkuleza legkich / V. Yu. Zhuravlev, O. V. Narvskaya, A. A. Vyazovaya [i dr.] // Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii. – 2010. – № 3. – S. 77–81.
 10. Myakisheva T. V. Sravnitel'naya charakteristika techeniya lekarstvenno-ustoychivogo i lekarstvenno-chuvstvitel'nogo tuberkuleza legkich u vperve vylennykh bol'nykh mladogo vozrasta / T. V. Myakisheva, V. Yu. Mishin // Pul'monologiya. – 2009. – № 3. – С. 96–100.
 11. Nesterenko L. N. Ispol'zovanie molekulyarno-biologicheskikh metodov v diagnostike i tipirovanii shtammov M. Tuberculosis / L. N. Nesterenko // Molekulyarnye osnovy patogeneza i diagnostiki tuberkuleza i drugoy legochnoy patologii : materialy nauchno-prakticheskoy konferenzii . – M., 1995. – S. 37–38.
 12. Novye tehnologii opredeleniya lekarstvennoy chuvstvitel'nosti Mycobacterium tuberculosis / O. I. Skotnikova [i dr.] // Problemy tuberkuleza i bolezney legkich. – 2004. – № 6. – S. 40–41.
 13. Novozhilova I. A. Znachimost' opredeleniya lekarstvennoy ustoychivosti mikobakteriy tuberkuleza dlya uspeshnogo lecheniya tuberkuleza legkich / I. A. Novozhilova // Problemy tuberkuleza i bolezney legkich. – 2004. – № 4. – S. 29–30.
 14. Pervichnaya lekarstvennaya ustoychivost' mikobakteriy tuberkuleza u bol'nykh s vperve vyyavlenym destruktivnym tuberkulezom legkich / I. P. Zinov'ev, N. A. Esaulova, V. G. Novikov, I. A. Kokovichina // Problemy tuberkuleza i bolezney legkich. – 2009. – № 4 – S. 37–39.
 15. Cohn D. L. Drug resistance (DR) to anti-tuberculosis medications: global drug resistanse rates / D. L. Cohn, F. Bustreo, M. Raviglione // The Europ. Resp. Dis. – 1995. – Vol. 8, Suppl. 19. – P. 505.
 16. Dixie E. S. The global treat of Drug-Resistant Tuberculosis / E. S. Dixie, G. G. Kenneth // The New England Journal of Medicine. – 1998. – Vol. 338, № 23. – P. 1689–1690.
 17. Geerligts W. A. Multidrug-resistant tuberculosis: long-term treatment outcome in the Netherlands / W. A. Geerligts, R. Van Altena, W. C. M. De Lange // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2000. – Aug., Vol. 4 (8). – P. 758–764.
 18. Iseman M. D. Drug-resistant tuberculosis / M. D. Iseman, L. A. Madsen // Clinics in Chest Medicine. – 1993. – Vol. 10, № 3. – P. 65–70.
 19. Willcox P. A. Drug-resistant tuberculosis / P. A. Willcox // Curr Opin Pulm Med. – 2000. – May, Vol. 6 (3). – P. 198–202.
 20. The threal of multidrug-resistant tuberculosis: results of 1 yr of surveillance in the Lombardy region of Italy / G. Salamina, L. Sodano, F. Mezzetti, M. L. Moro // Monaldi Arch Chest Dis. – 1999. – Aug., Vol. 54 (4). – P. 332–336.