НИИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ МЗРОССИИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НИИ ТУБЕРКУЛЕЗА РАМН
НОВОСИБИРСКИЙ НИИ ТУБЕРКУЛЕЗА МИНЗДРАВА РОССИИ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ ФИРМА «ЛИТЕХ»

БОЧКАРЕВ Е.Г., ДЕНИСОВА Т.С., ГЕНЕРОЗОВ Э.В., ГОВОРУН В.М., НИКИТЧЕНКО Е.Ю., ЧЕРНОУСОВА Л.Н., КУЗНЕЦОВ П.В.

ГЕНОДИАГНОСТИКА ВО ФТИЗИАТРИИ

МОСКВА 2000 г.

Введение

Обнаружение микобактерий туберкулезного комплекса в клинических образцах является одним из основных диагностических подходов во фтизиатрии. В настоящее время традиционные микробиологические методы выявления возбудителя по своей эффективности уже не удовлетворяют клиницистов. Быстрый метод бактериоскопии обладает низкой чувствительностью: для обнаружения микобактерий туберкулеза (МБТ) необходимо, чтобы 1 мл материала содержал не менее 100 тыс. микробных клеток. Люминесцентная микроскопия увеличивает чувствительность бактериоскопии на 10-30%. Чувствительность бактериологического посева значительно выше – 20-100 МБТ, однако, исследование занимает длительное время - один-два месяца. В связи с этим МБТ в нашей стране выявляют в среднем лишь у 50-60% больных активным туберкулезом.

Дальнейшее развитие лабораторных методов исследования во фтизиатрии было обеспечено в первую очередь фундаментальными исследованиями в области химии иммунологии и генетики. В последнее время развиваются методы, объединенные понятием генодиагностика.

Генодиагностика - это комплекс методов, позволяющих обнаруживать последовательности нуклеиновой кислоты, специфичные для определенного вида возбудителя инфекционного заболевания. Генодиагностика - относительно новый раздел диагностики, возникший гораздо позже методов, основанных на микробиологических и иммунологических принципах. Поэтому возможности и области его применения еще не всегда хорошо известны микробиологам, эпидемиологам и фтизиатрам.

Для обнаружения микроорганизмов, трудно культивируемых в лабораторных условиях, внутриклеточных паразитов, персистирующих форм микроорганизмов, атипичных форм бактерий наиболее рационально и эффективно применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР).

За последние годы в зарубежной печати появились работы, характеризующие ПЦР как метод, обладающий высокой чувствительностью, специфичностью и быстротой (в течение 4–5 часов) выявления МБТ . Эти преимущества позволяют диагносцировать возбудителя на ранних стадиях заболевания и в различных биологических материалах [27,38,39,40,47].

Внедрение молекулярно-биологических методов уже сейчас позволяет выявлять резистентность к химиопрепаратам и проводить типирование микобактерий туберкулеза в достаточно короткие сроки.

Целью настоящего пособия является оценка места молекулярно-биологических методов диагностики микобактерий туберкулеза в сравнении с традиционными микробиологическими, определение показаний к их применению, интерпретации полученных результатов с клинической точки зрения.

Сравнительная характеристика лабораторных методов исследования во фтизиатрии

Бактериоскопические методы исследования

При бактериоскопии мазка, окрашенного по Цилю-Нильсену, МБТ могут быть обнаружены при наличии не менее 100.000 -1.000.000 бактериальных клеток в 1 мл патологического материала. Такое значительное количество МБТ встречается при распространенных, преимущественно легочных формах заболевания (диссеминированная, фиброзно-кавернозная, цирротическая). Методы накопления (флотация) повышают выявляемость МБТ по сравнению с обычной микроскопией на 10% [17].

Люминесцентная микроскопия при туберкулезе в настоящее время является эффективным бактериоскопическим методом лабораторной диагностики, широко применяющимся в микробиологических лабораториях Российской Федерации. Чувствительность метода люминесцентной микроскопии 10.000 – 100.000 МБТ в 1 мл материала [17].

Культуральный метод исследования

Культуральный метод выявления МБТ дает положительные результаты при наличии в исследуемом материале от 20 до 100 жизнеспособных микробных клеток в 1 мл. Однако он трудоемок и длителен в связи с тем, что МБТ являются в основном медленно растущими организмами, и рост их колоний наблюдают в течение 2-3 месяцев.

Для культивирования микобактерий туберкулеза используют различные питательные среды: агаризованные твердые, полужидкие и жидкие (синтетические и полусинтетические). Для увеличения результативности культурального метода рекомендуется применять посев материала одновременно на несколько (две-три) различных питательных сред. Чаще всего используют посевы на яично-картофельную среду (по Левенштейну-Иейнсену), считающиеся более достоверным способом выявления МБТ. Особое значение приобретает исследование на нескольких питательных средах при внелегочных формах туберкулеза, характеризующихся скудным, в отличие от легочных, бактериовыделением. В настоящее время доказано преимущество одновременного посева мочи на три питательные среды: основная - Левенштейна-Йенсена, дополнительные - среды Фин-II и среда В.А.Аникина.

Продолжительность роста МБТ ограничивает диагностические возможности клиницистов. МБТ выявляются лишь при 52-65% случаев активного туберкулеза легких, а в клинике внелегочного туберкулеза удельный вес их выявления еще ниже. При туберкулезных менингитах лишь в 3% случаев обнаруживается рост микобактерий на питательных средах. Незначительным является удельный вес высеваемости у больных туберкулезом мочеполовой системы. Частота высевания микобактерий туберкулеза при нефротуберкулезе варьирует от 26,7% до 73% случаев [16].

Наблюдаются случаи, когда больные после лечения выделяют значительное количество маложизнеспособных или мертвых МБТ. В таких случаях посевы дают отрицательные результаты, и бактериоскопические методы являются единственными, с помощью которых удается обнаружить возбудителя туберкулеза.

Значительные трудности представляет обнаружение микобактерий у лиц со скудным их выделением. Среди впервые выявленных больных у одной трети бактериовыделение является однократным [17].

В настоящее время во фтизиатрии принята разработанная в Российском НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ комплексная методика исследования мочи на МБТ: из одной и той же порции одновременно выполняется люминесцентная микроскопия ее осадка, окрашенного аурамином, и осуществляется посев материала не менее чем на две питательные среды. Микобактерии, потерявшие кислотоустойчивость, но сохранившие жизнеспособность, лучше выявляются посевом, а потерявшие жизнеспособность, но сохранившие кислоустойчивость - бактериоскопией.

Культуральный метод позволяет проводить определение чувствительности и устойчивости МБТ к противотуберкулезным антибиотикам.

Система BACTEC

За рубежом широкое распространение получила радиометрическая система BACTEC для быстрого обнаружения живых МБТ в жидкой питательной среде. Микобактерии культивируют в жидкой BACTEC среде, где в качестве источника углерода используется меченая ^{14}C пальмитиновая кислота. При положительных данных бактериоскопического исследования рост МБТ обнаруживали радиометрически на 7-10-й день и на 14-21-й дни при отрицательных данных.

К недостаткам этого метода, ограничивающим возможность его широкого применения, относятся:

- высокая себестоимость исследования;
- необходимость применения радиоактивных изотопов и специального радиометрического оборудования, сложность работы с изотопной технологией;
- необходимость дополнительного посева на плотную питательную среду при возникновении проблем с идентификацией или интерпретацией результатов.

Биологический метод исследования

Биологический метод применяется для выявления не только типичных, но и разнообразных, биологически измененных, форм возбудителя, в частности L-трансформированных и фильтрующихся форм.

Самым восприимчивым к туберкулезной инфекции лабораторным животным является морская свинка. Считается, что ее заражение позволяет диагносцировать туберкулез при наличии в материале, использованном для заражения, 1-5 микробных клеток.

Серьезными недостатками биологического метода являются его высокая стоимость, необходимость специальных условий, длительность проведения анализа и зависимость результатов от чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам. Под их влиянием многие штаммы снижают или теряют свою вирулентность.

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) получил широкое распространение в диагностике различных инфекционных заболеваний в связи с высокой чувствительностью и специфичностью анализа, высокой производительностью, простотой проведения анализа и регистрации результатов, возможностью использования микроколичества диагностического материала и автоматизации процесса. ИФА используют для определения как антител, так и антигенов в биологических жидкостях.

В 1976 году E.Nassau с соавт. первыми применили его для серодиагностики туберкулеза, использовав в качестве антигена фильтрат M. tuberculosis H37Rv.

При использовании ИФА специфические антитела выявляются у 80% больных активным туберкулезом, в том числе и костно-суставным. Однако образование антител меняется в зависимости от активности туберкулезного процесса, распространенности и давности заболевания, и в процессе противотуберкулезного лечения.

Несмотря на значительное число публикаций, посвященных применению методов ИФА для серодиагностики туберкулеза, проблема диагностики не является решенной, поскольку чувствительность анализа колеблется от 68 до 92%, а специфичность - от 86 до 97%, то есть число ложноположительных реакций среди здоровых или лиц с нетуберкулезными заболеваниями колеблется от 3 до 14%. Недостаточная специфичность анализа связана с наличием общих антигенов между МБТ и другими непатогенными микобактериями.

Полимеразная цепная реакция

Применение ПЦР для детекции микобактерий туберкулезного комплекса

Метод ПЦР основан на ферментативной амплификации выбранных специфических участков генома бактерий рода *Mycobacterium tuberculosis M. bovis, M. africanum, M. microti*), их дальнейшей детекции и идентификации. Аналитическая чувствительность метода, определяемая при последовательных разведениях суспензии бактериальных клеток, очень высока и составляет от 1 пг до 5 фг микобактериальной ДНК, что эквивалентно выявлению 1-10 бактериальных клеток.

В настоящее время существует ряд разработок по использованию ПЦР в диагностике туберкулеза, но до сих пор не найдена оптимальная маркерная последовательность в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, обеспечивающая максимальную специфичность и чувствительность анализа, что препятствует широкому применению ПЦР с целью выявления МБТ в практическом здравоохранении.

Для инициирования ПЦР при определении микобактерий туберкулеза в клинических образцах используются различные праймеры. Одни направлены на амплификацию фрагментов ДНК генов, кодирующих микобактериальные антигены, такие как белок теплового шока (белок 65 kD), антиген b (38 kD) , MPB 64; другие - на амплификацию

повторяемых последовательностей в хромосоме микобактерий туберкулезного комплекса; третьи - на амплификацию рибосомальной РНК.

В 1989 г. A. Brisson-Noel с соавт. одни из первых опубликовали свои материалы, посвященные быстрой диагностике туберкулеза методом ПЦР. Было исследовано 35 клинических образцов (мокрота, содержимое желудка, содержимое абсцесса, периферическая кровь), из которых только два положительных в ПЦР не соответствовали отрицательным результатам, полученным стандартными методами (микроскопия, культуральные исследования). Эти две пробы были получены от больного, который получал в течение четырех недель специфическое лечение. Для постановки реакции были взяты праймеры, подобранные из нуклеотидной последовательности гена, кодирующего белок 65 kD. Выбор данного белка обусловлен тем, что он играет важную роль в детерминировании иммунитета, а также для определения патогенных свойств *Mycobacterium tuberculosis*. Этот белок широко представлен у различных микобактерий и является перекрестнореагирующим. Ген, кодирующий белок 65 kD, содержит как общие для всех микобактерий участки, так и вариабельные участки, нуклеотидные последовательности которых являются видоспецифическими. В связи с этим, для окончательной идентификации амплифицированного фрагмента, авторы подвергали продукт ПЦР гибридизации. В качестве зонда использовали видоспецифический участок для M.tuberculosis.

Более удачной оказалась маркерная последовательность, кодирующая ген антигена *Mycobacterium tuberculosis* 38 kD. Этот антиген не является иммунологически значимым для человека, но он высокоспецифичен в отношении микобактерий туберкулезного комплекса. Эта нуклеотидная последовательность представлена в геноме микобактерий туберкулезного комплекса в единственном числе. При оценке специфичности ПЦР R. Yuen с соавт. в качестве мишени выбрали фрагмент гена, кодирующего видоспецифичный для *M. tuberculosis* белок 38 kD. Тестированию подвергли 31 штамм M. tuberculosis, 15 атипичных микобактериальных видов и некоторых бактерий верхних дыхательных путей. Амплифицированный продукт в 239 н.п. был обнаружен во всех штаммах *M. tuberculosis*, в стандартных штаммах *M. bovis* и *M.africanum*, в других тестируемых штаммах реакция была отрицательной. Используя праймеры, комплементарные последовательности гена белкового антигена 38 kD, Y.Miyazaky с соавт. удалось определить методом ПЦР 100 КОЕ/ мл. При проведении nested ПЦР в течение 35 циклов - 0,1 КОЕ мл.

Использование повторяемых последовательностей в качестве мишени для ПЦР обеспечивает амплификацию с большой чувствительностью, т.к. число копий этих последовательностей в хромосоме микобактерий туберкулезного комплекса колеблется от 9 до 16. При обнаружении МБТ используют повторяемые последовательности IS6110 и IS986, специфичные для микобактерий туберкулезного комплекса. Использование праймеров для синтеза повторяющихся в ДНК МБТ участков обеспечивает большую чувствительность анализа - до 0,1 пг ДНК, т.е. до одного микроорганизма [19]. В большинстве случаев чувствительность варьирует от 74 до 91%, а специфичность - от 72 до 100%.

Метод РНК-амплификации используется в ПЦР для амплификации 16S рибосомальной РНК *M. tuberculosis.* Использование 16S rRNA мишени для ПЦР весьма выгодно, т.к. 16S rRNA - компонент микобактериальных рибосом и экспрессируется в большом количестве копий (от 10^3 до 10^4 на клетку). B.Boddinghaus с соавт. показали, что при обратной транскрипции rRNA образуется от 10^3 до 10^4 ДНК копий на клетку для амплификации в ПЦР. Кроме того, внутри 16S rRNA гена имеются общие для микобактерий последовательности, что позволяет амплифицировать ДНК для диагностики микобактериальных инфекций. Для дальнейшей идентификации микобактерий необходима гибридизация продукта ПЦР с высокоспецифичными зондами. Чувствительность 16S rRNA тестов достаточно высока (от 82 до 100%), специфичность 99-100%. Однако этот метод технически сложен и трудоемок, требует дорогостоящих реактивов и проведения реакции гибридизации для окончательной идентификации общего продукта ПЦР.

Метод ПЦР может быть также применен для типирования микобактерий в эпидемиологических исследованиях. Так, выявление вариаций в последовательности гена, кодирующего белок 32 kD, а также в последовательности, разделяющей гены 16S и 23S РНК, позволяет проводить идентификацию различных видов *M. tuberculosis* и штаммов одного вида [18] .

Возможности ПЦР-анализа настолько широки, что позволили обнаружить ДНК *M. tuberculosis* в останках людей, умерших за 2000-1500 лет до нашей эры, а также у перуанских мумий 1000-летней давности.

На эффективность ПЦР-анализа существенным образом влияет метод обработки клинического материала [5] . В ПЦР-диагностике туберкулеза для исследований обычно используют мокроту, промывные воды бронхов, бронхиальные аспираты, плевральную жидкость, мочу, спинномозговую жидкость, кровь, биоптаты лимфоузлов и других тканей.

Особенно ярко преимущества ПЦР проявляются при внелегочных формах инфекции, когда туберкулезную этиологию заболевания удавалось установить в 26,5% при помощи ПЦР и в 14,5% при культивировании. [7] .

Успешное лечение больных туберкулезом невозможно без контроля за эффективностью химиотерапии. В ходе ее проведения, в то время как результаты культурального и микроскопического методов были отрицательными, с помощью ПЦР удалось обнаружить *M. tuberculosis* в 27% образцов через 2 мес. после начала лечения, в 13% - через 3 мес. и в 7% - через 6 мес. лечения. [15].

Заболевания, вызванные нетуберкулезными микобактериями (микобактериозы) часто имеют сходную с туберкулезом клинико-рентгенологическую картину. Вследствие этого больные микобактериозоми получают не показанные им химиопрепараты, к которым потенциально патогенные микобактерии имеют резистентность. Ранняя же диагностика микобактериозов и этиотропное лечение, как правило, обуславливают благоприятный исход. Метод ПЦР позволяет дифференцировать виды микобактерий. A. Bahrmand с соавт. при изучении 329 образцов мокроты методом ПЦР использовали праймеры, специфичные для *M. bovis*, и получили положительный результат в 274 образцах. В то же время при культивировании микобактерии туберкулеза обнаружены в 224 образцах. Для 55 образцов, отрицательных по результатам ПЦР, были использованы праймеры, специфичные для *M. fortuitum* и *M.kansasi*. 21 образец из 55 содержали нетуберкулезные микобактерии.

В таблице 1 приведена сравнительная характеристика по чувствительности и продолжительности исполнения микробиологических методов и ПЦР.

Таблица 1. Сравнительная чувствительность и продолжительность исполнения различных лабораторных методов выявления микобактерий туберкулезного комплекса

Метод	Чувствительность	Продолжительность исследования
Микроскопия с окрашиванием по Цилю-Нильсену	100.000 - 1.000.000 МБТ в 1 мл	1 – 2 часа
Люминесцентная микроскопия	10.000-100.000 МБТ в 1 мл	1- 2 часа
Культуральный посев	20-100 МБТ в 1 мл	1- 2 месяца
ПЦР	1-10 МБТ в 1 мл	5 часов

Данные клинического применения во фтизиатрии наборов реагентов, использующих метод полимеразной цепной реакции для детекции *M.tuberculosis*

В настоящее время актуальным для здравоохранения является клиническая интерпретация результатов ПЦР-исследований во фтизиатрии. Нами накоплен 4-х летний опыт практического применения разработанного в научно-производственной фирме Литех при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ диагностического набора Политуб, предназначенного для выявления микобактерий туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis* и *M. bovis*) в широком спектре клинических образцов (мокрота, плевральная жидкость, бронхоальвеолярный лаваж, соскоб эндометрия). Были проведены клинические испытания диагностической системы Политуб в ведущих российских фтизиатрических клиниках. Набор утвержден Министерством здравоохранения РФ 4.11.97 г. и согласно Приказа № 219 от 20.07.98 г.разрешен к применению в качестве изделия медицинского назначения (ТУ-9398-410-17253567-97).

В рамках клинических испытаний в 1997 г. проведено сравнительное исследование двух тест-систем: Amplicor MTB (производства фирмы Roche) и Политуб(НПФ Литех). Было проанализировано 56 проб мокроты больных туберкулезом легких. В таблице 2 приведены данные сравнительного исследования проб мокроты культуральным методом и методом ПЦР (диагностические наборы «Политуб» и «Amplicor MTB») в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к наборам. Как следует из представленных данных, совпадение результатов исследования с применением наборов «Политуб», «AmplicorMTB» и культурального метода наблюдалось в 15 случаях из 23, в 8-ми случаях отмечено несовпадение результатов культурального и молекулярно-биологических методов исследования, в восьми случаях несовпадение результатов ПЦР-исследования при применении наборов «Политуб» и «AmplicorMTB». Удельный вес совпадений при выявлении МБТ данными тест-системами в целом был равен 87,3% (49 проб из 56).

В таблице 3 представлены данные сравнительного исследования методом ПЦР этих же проб мокроты (диагностические наборы «Политуб» и «Amplicor MTB»), при этом обработка проб и выделение ДНК проводились по методу, предлагаемому к набору «Политуб». Удельный вес совпадений результатов приближался к 100% [14].

Пробы мокроты были предоставлены централизованной бактериологической лабораторией Московского НПЦ борьбы с туберкулезом Комитета здравоохранения Москвы.

Таблица 2. Данные сравнительного исследования проб мокроты культуральным методом и методом ПЦР (диагностические наборы «Политуб» и «Amplicor MTB»)

Номера биопроб	Набор "Политуб"	Набор "Amplicor MTB"		Культуральный Метод
1	-	0,015	-	-
2	-	0,423	+	-
3	+	0,09	-	+
4	+/-	0,039	-	-
5	-	0.025	-	-
6	-	0,022	-	-
7	++	>2	+	+
8	-	0,017	-	-
9	-	0,020	-	-
10	++	>2	+	+
11	-	0,018	-	-
12	-	0,33	+/-	-
13	-	0,032	-	-
14	-	0,18	-	-
15	-	0,22	+/-	-

16	+/-	0,70	-	-
17	+/-	0,037	-	-
18	+/-	0.023	-	-
19	+	0,134	+/-	-
20	-	0.020	-	-
21	-	0,431	+	-
22	-	0.017	-	-
23	-	0,003	-	-

Таблица 3. Данные сравнительного исследования проб мокроты методом ПЦР (диагностические наборы «Политуб» и «AmplicorMTB») с их обработкой и выделением ДНК по методу, предлагаемому в наборе «Политуб».

Номер Биопробы	Набор «Политуб»	Набор "Amplicor MTB"	
1	++	1,944	+
2	+	0,678	+
3	+/-	0,009	-
4	++	1,740	+
5	++	>4	+
6	+	0,518	+
7	++	3,709	+
8	+	1,450	+
9	+/-	0,057	+/-
10	++	2,80	+
11	++	>4	+
12	-	0,09	-
13	+	3,90	+
14	+/-	0,119	+/-
15	-	0,01	-
16	-	0,09	-
17 (+ контроль с 5 fg ДНК МБТ	+	0,014	+
18 (+ контроль с 1000 МБТ	+	1,1	+
19 (+ контроль с 10.000 МБТ)	+	3,6	+

Диагностический набор «Политуб» прошел клиническую апробацию в клиниках Центрального НИИ туберкулеза РАМН и Новосибирского НИИ туберкулеза Минздрава России.

В таблице 4 приведены данные сравнительного исследования бронхоальвеолярного лаважа больных туберкулезом органов дыхания и неспецифическими заболеваниями легких методами ПЦР и бактериологического посева.

Таблица 4. Данные сравнительного исследования бронхоальвеолярного лаважа больных туберкулезом органов дыхания и неспецифическими заболеваниями легких (НЗЛ) методами ПЦР и бактериологического посева (данные Кузнецова П.В., Киншт В.Н., Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Формы туберкулеза, НЗЛ	Кол-во биопроб	Выявление ДНК методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом посева (кол-во биопроб)
Туб. бронхов	4	4 (100%)	1 (25%)
Деструкт. формы (диссем., инфильтр., фибр.-каверн.)	54	51 (94,4%)	48 (88,8%)
Недеструкт. формы (дисс., очаговый, инфильтр.)	34	21 (38,8%)	7 (13%)
Хр.бронхит, пневмония	29	Не выявлено	Не выявлено

Как видно из представленных в таблице 4 данных, в группе больных туберкулезом бронхов методом ПЦР достигнута более высокая чувствительность по сравнению с культуральным посевом. У больных деструктивными формами болезни с массивным бактериовыделением метод ПЦР имел незначительное преимущество перед культуральным, при недеструктивных формах снова проявляется преимущество молекулярно-биологических методов диагностики. Исследование биопроб у лиц контрольной группы с НЗЛ не выявило МБТ обеими методами.

В таблице 5 представлены данные сравнительного исследования плеврального экссудата методами ПЦР и бактериологического посева, проведенные с целью дифференциальной диагностики туберкулезного и нетуберкулезного плевритов.

Таблица 5. Данные сравнительного исследования плеврального экссудата методами ПЦР и бактериологического посева, проведенного с целью дифференциальной диагностики туберкулезного и нетуберкулезного плевритов (Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ).

Этиологическая характеристика плеврита	Кол-во биопроб	Выявление ДНК методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом посева (кол-во биопроб)
Туберкулезный	4	4 (100%)	Не выявлено
Нетуберкулез-ный	25	не выявлено	Не выявлено

Благодаря применению ПЦР у всех больных туберкулезным плевритом в экссудате были выявлены микобактерии, у лиц с неспецифическим плевритом оба метода дали отрицательный результат.

При сравнении чувствительности ПЦР с культуральным исследованием она варьирует от 70 до 95%. Эти результаты находятся в прямой зависимости от качества питательных сред и количества сделанных посевов. Сравнение высеваемости микобактерий с использованием двух или трех питательных сред с данными, полученными методом ПЦР, показывает его недостаточную чувствительность. В работах, где для посева используется одна среда Левенштейна-Йенсена, чувствительность ПЦР выше культурального метода. [13, 15].

Комбинированное применение молекулярно-биологических и культуральных методов значительно повышает эффективность выявления МБТ по сравнению с изолированным применением бактериоскопии и посева на плотные питательные среды (табл.6). Как видно из представленной таблицы, при посеве на плотную среду у подавляющего большинства больных, бактериоскопически абациллярных после проведенного курса химиотерапии, микобактерии дали рост только на 30-60 день. При посеве мокроты на жидкую питательную среду рост микобактерий отмечен у всех 19-ти больных в более ранние сроки – на 16-30 день. Методом ПЦР ДНК микобактерий были выявлены в первый день исследования, но только у девяти человек из 19-ти. Посев мокроты на жидкую питательную среду с последующей детекцией ДНК методом ПЦР позволили выявить микобактерии в достаточно короткий срок (3-18 дней) у остальных десяти больных [23].

Таблица 6. Сравнительные исследования мокроты методами бактериоскопии, посева на плотную (Левенштейна-Йенсена) и жидкую (BBL MGIT) питательные среды, ПЦР у 19-ти абациллярных (по данным бактериоскопии) больных (отдел микробиологии ЦНИИ туберкулеза РАМН)

Метод диагностики	Отсутствие роста МБТ (кол-во больных)	Наличие роста МБТ (кол-во больных)	Время выращивания МБТ или выявления ДНК МБТ
Посев на плотную питательную среду	2	17	30-60 дней
Посев на жидкую питательную среду	-	19	16-30 дней
ПЦР	-	9	1-й день
Посев на жидкую питательную среду с последующим выявлением ДНК методом ПЦР	-	10	3-18 дни

В настоящее время метод ПЦР еще недостаточно адаптирован для исследования биопроб при внелегочных локализациях туберкулезного процесса (моча, ликвор, кровь, биоптаты, экссудат), характеризующихся низким содержанием микобактериальной ДНК. Более адекватной интерпретации данных ПЦР-исследования будут способствовать применение различных способов выделения ДНК и режимов амплификации, одновременное исследование различных биологических образцов от одного больного, применение туберкулино-провокационных проб [5, 6, 7, 8].

В клинико-диагностической лаборатории НПФ «Литех» была проведена адаптация набора «Политуб» для диагностики урогенитального туберкулеза, характеризующегося олигобациллярностью (от 2 до 10 клеток в пробе мочи) интермиттирующего характера .

Было проведено исследование мочи от 95 больных, находящихся на обследовании в противотуберкулезном диспансере г.Королева, Российском НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, Российской медицинской академии последипломного образования МЗ РФ (РМАПО). Из них верифицированный туберкулез мочеполовой системы имели 20 человек, нетуберкулезные изменения мочеполовой системы - 31, туберкулез органов дыхания в сочетании неспецифическими заболеваниями легких – 10, туберкулез внутригрудных лимфоузлов – 25, дети с «виражом» туберкулиновой реакции – 8, туберкулезный увеит –1.

После предварительной подготовки проб (низкоскоростное центрифугирование и прогревание) проводили обнаружение МБТ с использованием диагностического набора «Политуб». Параллельно с проведением диагностики методом ПЦР мочу от тех же больных исследовали традиционными методами (люминесцентная микроскопия, бактериологический посев) в РНИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ и РМАПО МЗ РФ.

Выявление МБТ в моче возможно только при очень высокой чувствительности анализа. Существует два способа повышения чувствительности метода ПЦР. Один предполагает более полное выделение ДНК МБТ, другой – повышение чувствительности амплификации.

Повысить чувствительность амплификации можно двумя путями: увеличить количество циклов одностадийной ПЦР до 45-ти или провести двухстадийную ПЦР, используя помимо внешних внутренние праймеры ("nested-PCR").

Для определения чувствительности разных путей амплификации была проведена ПЦР с использованием контрольной ДНК. С этой целью было сделано стандартное разведение контрольной ДНК *Mycobacterium bovis* BCG деионизованной водой от 10 ng до 1 fg ДНК в пробе. Для определения оптимальных условий получения необходимой чувствительности решено поставить реамплификацию во 2-ой стадии на 5, 10 и 15 циклах (таблица 7).

По результатам исследования были подобраны оптимальные условия выделения и амплификации ДНК-матрицы, с помощью которых проведено исследование 103 клинических образцов.

Таблица 7. Определение чувствительности ПЦР при различных режимах амплификации

Кол-во стадий и циклов амплификации	Количество контрольной ДНК в пробе								
	1 fg	5 fg	10 fg	100 fg	1 pg	10 pg	100 pg	1 ng	10 ng
1 ст.35 ц.	-	+ / -	+ / -	+	+	+	+	+	+
2 ст. 5 ц.	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2 ст. 10 ц.	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2 ст. 15 ц.	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Из приведенной таблицы видно, что фрагмент ДНК при использовании одностадийной амплификации слабо выявляется при концентрации его в пробе 5 и 10 fg и четко выявляется при наличии ДНК в количестве 100 fg и более. Такую чувствительность нельзя признать достаточной при диагностике олигобациллярных форм туберкулеза. Использование двухстадийной ПЦР приводит к повышению чувствительности до 5 fg только при 10 и 15 циклах реамплификации, в связи с чем в последующих исследованиях применяли именно такие условия постановки реакции.

Таким образом, использование двухстадийной ПЦР позволяет достоверно выявлять ДНК микобактерий туберкулезного комплекса, так как амплификация с использованием в качестве матрицы полученного на 1-ой стадии внутреннего фрагмента является аналогом гибридизации. Реамплификация повышает чувствительность выявления патогена в тех случаях, когда он находится в клиническом материале в единичных экземплярах и не выявляется при помощи других методов диагностики.

В таблице 8 приведены данные сравнительного исследования мочи методами ПЦР и бактериологического посева при туберкулезных и нетуберкулезных заболеваниях различных локализаций.

Низкий удельный вес выявления микобактерий туберкулеза методами ПЦР и бактериологического посева у лиц с верифицированным туберкулезом мочеполовой системы объясняется эрадикацией микобактерий вследствие проводимой на момент обследования химиотерапией. Выявление методом ПЦР МБТ в моче при туберкулезе легких, внутригрудных лимфоузлов, туберкулезном увеите и тубинфицированности детей объясняется гематогенным заносом возбудителя из других, пораженных активным процессом органов. Наличие микобактерий в моче на фоне неспецифических воспалительных заболеваний мочеполовой системы свидетельствует о невыявленном инфицировании или неактивном туберкулезном процессе .

Вишневская Е.Б. [6] при исследовании образцов тканей от больных нетуберкулезными заболеваниями костей и гениталий, имеющих одновременно активный туберкулез иного, чем исследуемый орган, в 30-40% случаев методом ПЦР выявила микобактерии туберкулеза. При неактивном туберкулезе или тубинфицировании положительные результаты ПЦР-исследования таких образцов наблюдались в 20-30% случаев.

Таблица 8. Сравнительные исследования мочи методами ПЦР (набор " Политуб") и бактериологического посева, проведенные с целью дифференциальной диагностики туберкулезных и нетуберкулезных заболеваний различных органов (ПТД г. Королева, РНИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, кафедра туберкулеза РМАПО МЗ РФ)

Этиологическая характеристика заболеваний	Количество биопроб	Выявление МБТ методом ПЦР	Выявление МБТ методом бак.посева
Верифицированный туберкулез мочеполовой системы	22	1 (4,5%)	1 (4,5%)
Нетуберкулезные изменения мочеполовой системы	33	3 (9,1%)	Не выявлено
Туберкулез и неспецифические заболевания легких	12	2 (16,7%)	Не выявлено
Туберкулез внутри грудных лимфоузлов у детей	27	6 (22,2%)	Не выявлено
Дети с «виражом» туберкулиновой реакции	8	1 (12,5%)	Не выявлено
Увеит туберкулезный	1	1 (100%)	Не выявлено
Всего	103(100%)	14 (13,6%)	1(0,97%)

Таким образом, при интерпретации результатов ПЦР-анализа для дифференциальной диагностики мочеполового туберкулеза необходимо учитывать наличие туберкулеза других органов и фазу активности процесса.
В таблице 9 приведены данные сравнительного исследования ликвора методами ПЦР (набор “Политуб”) и бактериологического посева, проведенные в клинике Новосибирского НИИ туберкулеза МЗ РФ.

Таблица 9. Сравнительные исследования спинномозговой жидкости методами ПЦР и бактериологического посева, проведенные с целью дифференциальной диагностики туберкулезного и нетуберкулезного менингитов (Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Этиологическая характеристика менингита	Кол-во биопроб	Выявление ДНК МБТ методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом бак.посева (кол-во биопроб)
Туберкулезный	8	7 (87,7%)	3 (37,5%)
Нетуберкулезный	6	Не выявлено	Не выявлено

Как видно из представленной таблицы, у 87,7% больных туберкулезным менингитом методом ПЦР в ликворе были выявлены МБТ, культуральным – только в 37,5% случаев. У лиц с неспецифическим менингитом микобактерии не были выявлены обоими методами.
В таблице 10 представлены данные сравнительных исследований мочи, проведенных с целью дифференциальной диагностики туберкулезных и нетуберкулезных поражений органов мочеполовой системы.

Таблица 10. Сравнительное исследование мочи методами ПЦР и бактериологического посева, проведенные с целью дифференцильной диагностики туберкулезных и нетуберкулезных заболеваний мочеполовой системы (данные Новосибирского НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Этиологическая характеристика заболеваний мочеполовой с-мы	Кол-во биопроб	Выявление ДНК МБТ методом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление ДНК МБТ бак. посева (кол-во биопроб)
Верифицированный Туберкулез	19	16 (84,2%)	1 (5,3%)
Нетуберкулезные изменения	413	Не выявлено	Не выявлено

У лиц с верифицированным в дальнейшем туберкулезом в 84,2% случаев методом ПЦР были выявлены ДНК микобактерий, культуральным методом - только в 5,3%. У значительного контингента лиц ПЦР-исследование позволило отвергнуть туберкулезную этиологию изменений.

Туберкулиново-провокационные пробы основаны на подкожном введении в организм туберкулина (сгущеннной культуральной жидкости от микобактерий туберкулеза, содержащей в качестве активного начала туберкулопротеины, полученные при аутолизе микобактерий) и оценке возникающих после введения реакций: реакции со стороны организма в целом (общая реакция), кожи в месте инъекции (уколочная реакция) и реакция со стороны пораженного специфическим процессом органа (очаговая реакция). В настоящее время наиболее широко применяется так называемая проба Коха, представляющая собой подкожное введение туберкулина АТК или

ППД-Л в дозе от 20 до 100 ТЕ. Оценка степени очаговой реакции со стороны пораженного органа наиболее значима с клинической точки зрения. Во фтизиурогинекологии применяются количественные методы анализа клеточных элементов осадка мочи – определение динамики минутной лейкоцитурии (проба Амбурже) до и после подкожного введения туберкулина. Достоверным признаком активного туберкулеза является возрастание минутной лейкоцитурии в 3 – 5 раз, в то же время при исходной пиурии проба может недостоверной. В клинике внелегочного туберкулеза нашли свое применение и другие модификации пробы Коха: туберкулиново-гемическая, туберкулиново-белковая, туберкулиново-иммунологическая, туберкулиново-иммунохимическая, туберкулиново-ренографическая и другие пробы.

Кузнецов П.В., Киншт В.Н. (Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ) предложили исследовать биопробы мочи методом ПЦР через 48 часов после введения 50 ТЕ туберкулина ППД-Л. В таблице 11 приведены данные сравнительного исследования мочи больных туберкулезом мочеполовой системы с целью определения активности процесса. У лиц с активным туберкулезом методом ПЦР в 73,9% случаев были выявлены МБТ, культуральным - в 8,7%.

У лиц с неясной активностью процесса после проведения пробы Коха с 50 ТЕ через 48 часов в 59,7% случаев были выявлены МБТ и лишь в 6,5 % -культуральным.

Таблица 11. Сравнительное исследование мочи методами ПЦР и бактериологического посева, проведенные у лиц больных туберкулезом органов мочеполовой системы с целью определения активности процесса (данные Новосибирского НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Форма туберкулеза, Фаза активности	Кол-во биопроб	Выявление ДНК МБТ методом ПЦР кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом бак.посева (кол-во биопроб)
Туберкулез почек,активный	23	17 (73,9%)	3 (8,7%)
Туберкулез мочеполовой системы с неясной активностью (через 48 часов после проведения пробы Коха с 50 ТЕ)	77	46 (59,7%)	5 (6,5%)

Как следует из представленных данных, применение туберкулиново-провокационной пробы значительно усиливает диагностическую значимость ПЦР-исследования при туберкулезе мочеполовой системы.

Очень интересными являются данные молекулярно-биологических исследований, подтверждающие гематогенную диссеминацию туберкулезного процесса.

Выделение ДНК МБТ из крови и биоптатов представляет определенные трудности из-за большого содержания в них ингибиторов ПЦР - гепарина и гемоглобина. В связи с этим следует подбирать оптимальный способ выделения ДНК для каждого диагностического образца.

В лаборатории молекулярной диагностики ЦНИИ туберкулеза РАМН использовались три способа - с разрушением клеточной стенки гуанидином, фенол-хлороформный и с использованием протеиназы К. Для оценки и сравнения эффективности различных способов выделения ДНК возбудителя были исследованы биоптаты почек, печени, легкого, селезенки и кровь от лабораторных животных (морских свинок и мышей). Заражение их производилось интраперитонеально культурами МБТ и забой осуществляли через три месяца. Фенол-хлороформный способ выделения ДНК из биоптатов различных органов экспериментально зараженных туберкулезом животных оказался самым эффективным. Удельный вес положительных реакций здесь варьировал от 81,48% (селезенка) до 93,3% (легкое) - в среднем 86%. Эффективность выделения ДНК из печени, почек и крови составила 84,45%, 82,2% и 8,5% соответственно. Из ткани легкого ДНК успешно выделялась при использовании любого способа экстракции. Наиболее трудно выделялась ДНК микобактерий из крови. Самым эффективным способом выделения ДНК при этом оказался гуанидиновый [22].

Альварес Фигероа М.В. и соавт. [1] в крови экспериментально зараженных животных методом ПЦР выявляли микобактерии туберкулеза (набор реагентов «АмплиСенс МТБ-ком»). В группе животных, получавших противотуберкулезные химиопрепараты, ДНК МБТ определялись лишь до начала лечения и переставали выявляться в течение первого месяца от начала химиотерапии, несмотря на то, что морфологические исследования свидетельствовали о продолжающемся туберкулезном воспалении различных органов. В группе животных, не получавших лечения, ДНК микобактерий выявлялись в течение всего периода от момента заражения.

Туберкулиново-провокационная проба может вызвать возникновение кратковременной микобактериемии, обусловленной резким повышением сосудистой проницаемости вследствие выброса биологически активных веществ и активации имеющегося очага специфического воспаления с образованием в нем микронекрозов. Выявление методом ПЦР индуцированной введением туберкулина микобактериемии может представлять собой значительную практическую ценность.

В таблице 12 приведены данные сравнительного исследования нативной крови лиц с внелегочными поражениями через 48 часов после проведения пробы Коха с 50 ТЕ в целях подтверждения или исключения их туберкулезной этиологии (Новосибирский НИИ туберкулеза МЗ РФ). Выделение ДНК из крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции.

Как следует из представленных данных у подавляющего большинства лиц с туберкулезным поражением мочеполовой и лимфоидной систем методом ПЦР были выявлены ДНК микобактерии туберкулеза. Специфичность реакции была подтверждена отсутствием их у лиц с нетуберкулезными заболеваниями. Культуральным методом ни у кого из обследованных не были выявлены МБТ.

Таблица 12. Сравнительное исследование нативной крови методами ПЦР и бактериологического посева у больных с внелегочными поражениями, проведенные после пробы Коха с 50 ТЕ с целью подтверждения их туберкулезной этиологии (данные Новосибирского НИИ туберкулеза МЗ РФ)

Этиологическая характеристика изменений мочеполовой и лимфоидной систем	Кол-во биопроб	Выявление ДНК МБТметодом ПЦР (кол-во биопроб)	Выявление МБТ методом бак. посева (кол-во биопроб)
Туберкулез мочеполовых органов	34	24 (70,6%)	Не выявлено
Туберкулез периферических лимфоузлов	6	4 (66,6%)	Не выявлено
Туберкулез периферических лимфоузлов у детей (на фоне виража туберкулиновой реакции)	12	10 (83,3%)	Не выявлено
Нетуберкулезные заболевания мочеполовой и лимфоидной систем	169	Не выявлено	Не выявлено

Калюк А.Н. [16] считает, что в качестве скринингового исследования наряду с микроскопией мазка необходимо проведение ПЦР. Это является экономически целесообразным при расхождении результатов микроскопии и ПЦР более, чем на 5%. При положительном ПЦР-анализе и отрицательном микроскопическом можно начинать противотуберкулезную химиотерапию, не проводя культурального посева. Лица с положительным микроскопическим результатом и отрицательным ПЦР-анализом не должны получать химиопрепараты до момента выделения чистой культуры. Поскольку диагностическая чувствительность ПЦР-исследования не менее, чем на 20% выше микроскопического, то предлагаемая схема не только повышает эффективность диагностики, но и приносит значительный экономический эффект.

По данным Савенкова В.И. и соавт. [21] методом ПЦР в 64 % случаев выявляются микобактерии при негативных результатах бактериологических исследований (набор реагентов «Амплитуб»). Учитывая особую чувствительность метода, можно предположить, что высокий удельный вес положительных результатов по данным ПЦР-исследования при отрицательных данных микроскопии и посева клинического материала является следствием обнаружения ДНК нежизнеспособных микобактерий туберкулеза либо длительным персистированием в организме больного измененных форм МБТ (L-формы).

ДНК микобактерий могут сохраняться в организме клинически излеченного или инфицированного туберкулезом в течение длительного периода времени. Их выявление не может являться единственным подтверждением активности туберкулеза и служит лишь основанием для проведения общепринятых дифференциально-диагностических исследований, дальнейшего наблюдения за больным.

Приведенные выше данные многочисленных клинико-лабораторных исследований свидетельствуют об успешном внедрении метода полимеразной цепной реакции в практику противотуберкулезной службы. В настоящее время основным является определение показаний к применению ПЦР во фтизиатрии, ее диагностической значимости (в сравнении с микроскопическими и культуральными методами) и клиническая интерпретация получаемых с ее помощью результатов.

Возможности генодиагностики в идентификации резистентности микобактерий туберкулезного комплекса к противотуберкулезным химиопрепаратам

Возрастающее число мультирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* представляет собой серьезную проблему для современного здравоохранения. Лечение пациентов, инфицированных мультирезистентными штаммами, требует применения более токсичных и дорогостоящих химиопрепаратов, длительной госпитализации и, тем не менее, часто остается неэффективным, обуславливая высокий удельный вес инвалидизации и смертности.

Основным в решении этой проблемы является своевременная детекция мультирезистентных штаммов на ранних стадиях заболевания, которая позволит контролировать дальнейшее распространение конкретного выявленного штамма и подобрать оптимальную схему химиотерапии. Тем не менее, определение спектра лекарственной резистентности классическими методами на селекционных средах занимает от 3-х недель до 3-х месяцев, что делает полученный результат ретроспективным.

Альтернативным и более перспективным вариантом решения этой проблемы является использование генотипических методов анализа, основанных на выявлении точечных мутаций или других генетических детерминант, обеспечивающих резистентность к антибиотикам. Этот подход стал возможным благодаря определенному успеху в исследовании молекулярных основ резистентности *Mycobacterium tuberculosis* к таким противотуберкулезным препаратам, как рифампицин [52, 53], изониазид [24, 48, 57], фторхинолоны [50], стрептомицин [36] и канамицин [49]. Его отличительной чертой является небольшой срок выполнения анализа, составляющий 2-3 дня.

Рифампицин является одним из основных туберкулостатиков, что обуславливает высокий удельный вес резистентных к нему штаммов. Актуальность выявления резистентности к рифампицину обусловлена тем, что до 80 - 90% рифампицин-резистентных клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* устойчивы и к изониазиду, что позволяет считать рифампицин-резистентные штаммы своеобразным косвенным "маркером" мультирезистентности [30, 36].

Около 95% резистентных к рифампицину штаммов *Mycobacterium tuberculosis* содержат точечные мутации, делеции или вставки в гене *rpo*B, кодирующем b - субъединицу РНК-полимеразы. Современные методы генодиагностики резистентности к рифампицину основаны на детекции мутаций, большая часть которых компактно локализована в высоко консервативной области *rpo*B гена [52].

Следует отметить, что эффективность такого подхода для детекции резистентных штаммов во многом зависит от того, насколько полно исследованы и охарактеризованы ассоциированные с резистентностью мутации. Считается, что тип и частота встречаемости определенных мутаций в *rpo*B гене достаточно консервативны среди микобактериальных штаммов, распространенных в различных географических районах [52, 56]. В то же время, в ряде исследований была отмечена и определенная географическая вариабельность таких мутаций [29, 37, 46, 51]. К сожалению, штаммы, выявляемые на территории Российской Федерации и стран СНГ, в этом отношении остаются пока малоисследованными.

В 1997-99 г.г. в ЦНИИ туберкулеза РАМН, НИИ фтизиопульмонологии ММА им.И.М.Сеченова, Московском НПЦ борьбы с туберкулезом и НИИ физико-химической медицины МЗ РФ проводили детекцию и характеризовали мутации, обуславливающие резистентность к рифампицину в клинических изолятах *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких граждан Российской Федерации.

В качестве материала для исследования использовали клинические штаммы *Mycobacterium tuberculosis*, выделенные культуральным методом из мокроты больных с подтвержденным диагнозом туберкулеза легких. Всего было проанализировано 100 клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Из них 48 было представлено чувствительными и 52 резистентными к рифампицину и/или мультирезистентными штаммами.

Все исследуемые штаммы были предварительно тестированы на чувствительность к основным противотуберкулезным препаратам методом разведения на среде Левенштейна-Йенсена (метод абсолютных концентраций) [28]. В соответствии с критериями чувствительности на агаризованных питательных средах

резистентными считались штаммы *Mycobacterium tuberculosis*, растущие при следующих или больших концентрациях антибиотиков:

Рифампицин 40 мкг/мл
Изониазид 1 мкг/мл
Этамбутол 8 мкг/мл
Стрептомицин 10 мкг/мл
Пиразинамид 100 мкг/мл
Канамицин 45 мкг/мл

ДНК из клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis,* выращенных на среде Левенштейна-Йенсена, выделяли в ходе обработки с гуанидинтиоцианатом по методу Р.Бума и соавт. [26], а затем нуклеотидную последовательность ПЦР фрагментов определяли по модифицированному методу Сэнгера с использованием набора для термоциклического секвенирования *fmol* DNA Sequencing System ("Promega").

Показано, что приблизительно в 95% случаев мутации, обуславливающие резистентность *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину локализованы, в высоко консервативной области *rpo*B гена с 511 по 533 кодон [37, 52, 56]. В ходе прямого секвенирования была проанализирована нуклеотидная последовательность *rpo*B гена с 498 по 540 кодон во всех клинических изолятах. Для удобства сравнения была использована предложенная Теленти [52] нумерация кодонов, основанная на гомологичных позициях кодонов в *rpo*B гене *E.coli*.

В 51 из 52 (98%) фенотипически резистентных к рифампицину штаммах были выявлены специфические мутации, охарактеризованные ранее, как ответственные за развитие резистентности. В 48 фенотипически чувствительных штаммах и одном резистентном мутаций в исследуемой области *rpo*B гена обнаружено не было. Всего в исследованной нами выборке было обнаружено 12 типов мутаций, затрагивающих 6 кодонов *rpo*B гена, из которых 10 - единичные нуклеотидные замены, одна вставка и одна двойная мутация, сочетающая единичную нуклеотидную замену с делецией целого кодона.

Таблица 14. Мутации, обнаруженные в *rpo*B гене устойчивых к рифампицину клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.

Номер кодона	Тип мутации	Количество штаммов	
		n	В % от проанализированных
533 ctg (L)	Ctg-ccg (L-P)	1	2%
531 tcg (S)	Tcg-ttg (S-L)	23	46%
	tcg-tgg (S-W)	1	
526 cac (H)	cac-gac (H-D)	5	23%
	cac-tac (H-Y)	3	
	cac-ctc (H-L)	2	
	cac-cgc (H-R)	2	
516 gac (D)	gac-gtc (D-V)	9	23%
	gac-tac (D-Y)	2	
	gac-ggc (D-G)	1	
Двойная мутация: 514 ttc (F) 515 atg (M)	ttc-ttg (F-L) atg (M) - делеция	1	2%
Вставка между 513 caa (L) и 514 ttc (F)	Вставка - ttc (F)	1	2%
Не обнаружено мутаций		1	2%

Как следует из результатов секвенирования, доминирующими в исследуемой выборке оказались мутации, затрагивающие 531, 526 и 516 кодоны *rpo*B гена. При этом количественное распределение мутаций в 531 (46%) и 526 (23%) кодонах оказалось близко к среднестатистическим значениям в 42%-50% и 27%-35%, соответственно, полученным в двух масштабных исследованиях, проведенных в 9-ти и 11-ти странах [52, 56]. В то же время, число мутаций, приходящихся на 516 кодон оказалось почти в 2,5 раза большим при сравнении с теми же данными [52, 56]. Необычная двойная мутация, сочетающая замену в 514 кодоне **F** на **L** и делецию метионина в позиции 515, была обнаружена в одном из проанализированных нами штаммов. Так же обнаруженные в единичном случае мутация в 533 кодоне и вставка фенилаланина между 513 и 514 кодоном были охарактеризованы ранее и встречаются довольно редко (2%) [37].

В единственном из 52 фенотипически резистентных штаммов в области с 511 по 533 кодон *rpo*B гена не было обнаружено никаких генетических изменений. Рифампицин-резистентные штаммы *Mycobacterium tuberculosis*, не имеющие мутаций в указанном районе, встречаются в среднем с частотой 5% от общего числа резистентных [37]. Вероятно, что мутации в таких штаммах затрагивают другие области *rpo*B гена. В частности, недавно были охарактеризованы мутации, локализованные в 381, 481, 505, 508 и 509 кодонах [41, 42, 51]. В то же время, нельзя исключать и наличие других, неисследованных механизмов резистентности.

В целом, анализ *rpo*B гена в исследованной нами выборке клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* показал стандартное распределение известных мутаций, за исключением относительно высокого удельного веса мутаций в 516 кодоне и не охарактеризованной ранее делеции. Отсутствие выраженного географического полиморфизма в распределении мутаций свидетельствует о возможности применения для анализа таких штаммов генотипических методов, рассчитанных на детекцию стандартного спектра мутаций.

Одним из основных критериев при выборе метода анализа следует считать его информативность. Случаи обнаружения нейтральных мутаций в классической области между 511 и 533 кодоном [51] свидетельствуют о необходимости не только констатации наличия мутации в исследуемом гене, но и идентификации ее типа и точного положения. Кроме того, уровень резистентности в ряде случаев в значительной степени зависит от положения и типа мутации. В частности, большинство мутаций в 531 и 526 кодоне приводит к высокому уровню резистентности с минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) превышающей 40 мкг/мл, тогда как уровень резистентности, обуславливаемый мутациями в кодоне 516, может быть ззначительно ниже [25, 44].

Кроме секвенирования, для детекции мутаций в *rpo*B гене наиболее часто применяют методы конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) [52], гибридизации с линейными зондами (LiPA) [31, 33] и РНК/РНК гетеродуплексного анализа (RNA/RNA mismatch assay) [42]. Два последних в настоящее время коммерчески реализованы в виде наборов INNO-LiPA Rif.TB ("Innogenetics") и MisMatch Detect II ("Ambion"), успешно применяющихся для детекции стандартных мутаций как при работе с микобактериальной культурой, так и непосредственно с клиническими образцами [55]. Тем не менее, за исключением четырех основных мутаций, точно идентифицируемых набором LiPA Rif.TB, положение и тип остальных замен при помощи перечисленных методов можно определить достаточно условно. В этом отношении прямое секвенирование *rpo*B гена выглядит наиболее информативным методом. Решение этой проблемы видится в применении методов пробоподготовки, позволяющих в ходе обработки клинического образца специфически сепарировать микобактерии от неспецифических бактерий, поскольку высокая консервативность rpoB гена обуславливает амплификацию соответствующего локуса.

Генерозов Э.В. и совт. [11, 12] исследовали эффективность системы выделения микобактерий, основанной на принципе иммуносепарации . Пробоподготовка состояла в следующем: в образцы гомогенизированной с NaOH и N-ацетил-L-цистеином и затем нейтрализованной мокроты вносили иммуномагнитный сорбент, состоящий из ферромагнитных частиц, связанных с моноклональными антителами к МБТ. После инкубации магнитные частицы собирали на сменных пластиковых наконечниках с магнитным сердечником. Собранный материал подвергали лизису в микрообъеме с Тритоном X-100 при 95 ^{o} C и использовали для проведения ПЦР [10].

Всего в ходе исследования было проанализировано 12 образцов мокроты. Каждый из образцов делили на три части, одну из которых сразу обрабатывали вышеуказанным способом. Выделенную ДНК использовали для ПЦР-амплификации rpoB гена и последующей детекции мутаций методом прямого секвенирования. Вторая часть использовалась для 5-ти дневного культивирования в среде Школьниковой, после чего образцы обрабатывали методом иммуносепарации и анализировали на наличие мутаций. Третья часть материала мокроты была использована для классических культуральных исследований с определением чувствительности к рифампицину как на среде Левенштейна-Йенсена, так и с помощью автоматического флуоресцентного детектора роста микобактерий MB/ Bac (Organon Teknica).

В ходе работы удалось успешно амплифицировать исследуемый фрагмент rpoB гена в большинстве образцов, полученных непосредственно из мокроты и во всех образцах, полученных после пятидневного культивирования. Специфичность амплификации rpoB гена была подтверждена в ходе прямого секвенирования соответствующих ПЦР-фрагментов. В шести из 12-ти образцов были выявлены специфические мутации в rpoB гене, ассоциированные с резистентностью к рифампицину. Пять из них представлены наиболее встречающейся мутацией в 531 кодоне и одна – точечной мутацией в 526 кодоне. Сравнение данных по лекарственной устойчивости, полученных в ходе параллельного микробиологического исследования этих же образцов, показало их соответствие с результатами прямого секвенирования rpoB гена в 11-ти из 12-ти (91%) проанализированных случаев. Описанная процедура пробоподготовки проста в исполнении, не требует применения дорогостоящего оборудования и позволяет эффективно сепарировать микобактерии в клиническом материале для последующих этапов исследования.

В целом, с учетом изложенного, прямое секвенирование ПЦР фрагментов *rpo*B гена выглядит наиболее универсальным генотипическим методом детекции резистентности к рифампицину. Наибольшая информативность такого подхода позволяет максимально полно охарактеризовать весь спектр возможных мутаций и правильно оценить резистентность исследуемых штаммов, а в ряде случаев и их эпидемиологические особенности. Немаловажно, что при большей информативности по сравнению с другими методами себестоимость одного анализа путем прямого секвенирования, чем при использовании набора INNO-LiPA Rif.TB и составляет $3. С технической точки зрения, анализы такого типа можно проводить в специально оборудованных лабораториях противотуберкулезных диспансеров республиканского, краевого и областного подчинения.

Как диагностический прием прямое секвенирование применимо и для выявления резистентности *Mycobacterium tuberculosis* к другим противотуберкулезным препаратам. Данный подход был успешно опробован нами для детекции мутаций в гене *kat*G, обуславливающих резистентность *Mycobacterium tuberculosis* к изониазиду [неопубликованные данные]. К сожалению, молекулярные механизмы резистентности ко многим противотуберкулезным препаратам исследованы недостаточно полно, что пока лимитирует использование генотипических методов для прямой детекции резистентности. Тем не менее, полученные нами данные свидетельствуют, о том, что, в отношении выявления устойчивости к рифампицину, такой подход уже сейчас представляет реальную альтернативу микробиологическим методам и позволит вести эффективный мониторинг клинических штаммов в реальном масштабе времени.

Применение методов генодиагностики в эпидемиологических исследованиях

Данные о распределении мутаций в локусах антибиотикорезистентности *Mycobacterium tuberculosis* могут представлять и определенный эпидемиологический интерес. Предполагаемая ранее частота селективно отобранных единичных генетических изменений в 10^{-7} - 10^{-8} [54] не соответствует современному темпу увеличения числа резистентных штаммов. Очевидно, что инфицирование первично резистентными бактериями происходит более часто,

чем считалось ранее. В ряде случаев удавалось установить и индивидуальную эпидемиологическую взаимосвязь между пациентами, инфицированными штаммами, несущими уникальные двойные мутации [37]. Тем не менее, как правило, штаммовые особенности *Mycobacterium tuberculosis* и полиморфизм мутаций в *rpo*B гене напрямую не связаны, и для объективной эпидемиологической информации необходимо одновременно с детекцией резистентности проводить молекулярное типирование штамма [35, 45].

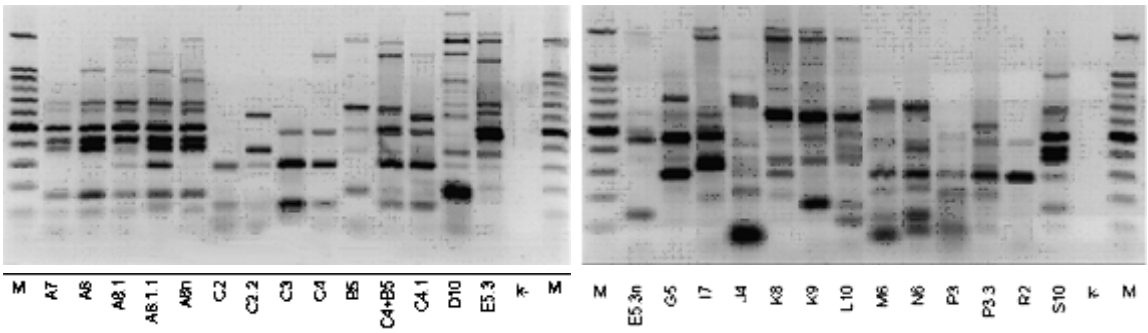
В 1999 г. Генерозовым Э.В. и соавт. [11] было осуществлено комбинированное исследование группы из 65 клинических изолятов микобактерий туберкулеза, выделенных от больных из различных регионов Российской Федерации. Спектр мутаций, ассоциированных с резистентностью к рифампицину, был определен в ходе прямого секвенирования ПЦР-фрагментов groB гена.В исследуемой группе было обнаружено 11 типов мутаций, затрагивающих пять кодонов groB гена. Доминирующими в исследуемой выборке оказались мутации, затрагивающие 531 (62,7%), 526 (18,6%) и 516 (10,2%) кодоны groB гена.

Генотипирование исследуемой выборки штаммов было осуществлено методами IS61 110-RFLP и DRE-PCR. Первый метод основан на анализе полиморфизма длин рестрикционных фрагментов элемента IS6110. Этот элемент встречается в геноме от 1-ой 25-ти копий и варьирует по своему положению. Метод DRE-PCR – основан на полиморфизме элемента IS6110 и поли GC-богатых повторов. Поскольку оба этих генетических маркера являются повоторяющимися элементами генома, то метод получил название – ПЦР по двойным повторным элементам.

Применение метода IS6110-RFLP позволило дискриминировать исследованные изоляты на 42 генетически независимые группы, а использование метода DRE-PCR – дискриминировать группу из 27 групп (по номенклатуре CDC).

Рисунок 6.

Уникальные электрофоретические профили, полученные в ходе DRE-PCR анализа 65 клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*. **М** – маркер молекулярного веса (100bp DNA Ladder, "Promega"), **К-** отрицательный контроль.



Конечная компиляция результатов генотипирования, полученных этими методами, позволила выделить в исследуемой выборке 52 штамма. Анализ полученных генетических вариантов выявил преобладание W- штаммов M.tuberculosis.

Заключение

Внедрение молекулярно-биологических методов диагностики, основанных на применении полимеразной цепной реакции, значительно повышает эффективность выявления микобактерий туберкулезного комплекса по сравнению с традиционными микробиологическими методами (бактериоскопия, люминесцентная микроскопия, посев). При туберкулезе органов дыхания преимущество ПЦР наиболее ощутимо при недеструктивных и ограниченных формах болезни. При внелегочных формах болезни, характеризующихся олигобациллярностью, более адекватной диагностике будут способствовать использование различных способов выделения ДНК, одновременное исследование различных по характеру биологических образцов от одного больного и применение туберкулино-провокационных проб .

Сочетание молекулярных методов типирования микобактерий туберкулеза с методами прямой детекции (секвенирование) резистентности к химиопрепаратам позволит в дальнейшем проводить не только статистические мониторинговые эпидемиологические исследования, но и получать достоверные результаты в клинически значимом масштабе времени.

Литература

1. Альварес Фигероа М.В., Лепеха Л.Н., Никоненко Б.В., Шипулина О.Ю., Шипулин Г.А. Выявление M. tuberculosis в крови методом ПЦР (экспериментальная модель). / В сб.: Генодиагностика в современной медицине. Материалы 3-ей Всероссийской конференции. М., 2000.-с.277-279.

2. Альтшулер М.Л., Генерозов Э.В., Денисова Т.С., Владимирский М.А., Андросова М.Н., Черноусова Л.Н., Шашкина Е.Ф., Адамович Н.В., Говорун В.М. Выявление мутаций в гене groB, обуславливающих резистентность M. tuberculosis к рифампицину. / В сб.: Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы II Всероссийской конференции. М., 1998.-с.94-95.

3. Андросова М.В., Владимирский М.А., Алексеева Г.И. Иммунологический метод идентификации Mycobacterium tuberculosis и M. bovis BCG на основе применения моноклональных антител. // Проблемы туберкулеза. - 1989. - № 6.-с.12-16.5

4. Бардисявичене И., Сосновская А. Сравнительная эффективность BACTEC 460 TB и ИФА в диагностике туберкулеза легких. // В сб.: Проблемы ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза. Материалы научно-практической конференции. Обнинск, 1996.-с-35.

5. Вишневская Е.Б. Особенности выделения ДНК для ПЦР при туберкулезе внелегочных локализаций. // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 5.-с.23-26.

6. Вишневская Е.Б. Проблемы ПЦР-диагностики внелегочного туберкулеза. / В сб.: Генодиагностика в современной медицине. Материалы 3-ей Всероссийской конференции. М., 2000.-с.281-282.
7. Вишневский Б.И., Мирлина Е.Д. ПЦР-диагностика микобактерий туберкулеза методом полимеразной цепной реакции при туберкулезе различных локализаций. // В сб.: Проблемы ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза. Материалы научно-практической конференции. Обнинск, 1996.-с. 14.
8. Вишневский Б.М., Мирлина Е.Д. Чувствительность и специфичность теста, основанного на полимеразной цепной реакции, при диагностике туберкулеза периферических лимфатических узлов. // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 4.-с.25-28.
9. Владимирский М.А. Иммунологические и биотехнологические методы в повышении эффективности диагностики и лечения туберкулеза: Автореф. дисс. доктора мед. наук. - М. - 1993.
10. Владимирский М.А., Шипина Л.К., Филиппов В.И., Мороз А.М., Иртуганова О.А., Смирнова Н.С., Леви Д.Т. Эффективность системы пробоподготовки мокроты на основе иммуномагнитной сепарации для выявления микобактерий туберкулеза методом ПЦР / В сб.: Генодиагностика в современной медицине. Материалы 3-ей Всероссийской конференции. М., 2000.-с.283-284
11. Генерозов Э.В., Акопиан Т.А., Говорун В.М., Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Хоменко А.Г. Молекулярная характеристика полирезистентных клинических штаммов M. tuberculosis из России. / В сб.: Генодиагностика в современной медицине. Материалы 3-ей Всероссийской конференции. М., 2000.-с.273-274.
12. Генерозов Э.В., Акопиан Т.А., Владимирский М.А., Мороз А.М., Литвинов В.И., Иртуганова О.А., Говорун В.М. Прямой генетический анализ резистентности к рифампицину изолятов M.tuberculosis в образцах мокроты. / В сб.: Генодиагностика в современной медицине. Материалы 3-ей Всероссийской конференции. М., 2000.-с.274-276.
13. Голышевская В.И., Черноусова Л.Н., Шашкина Е.Ф., Ларионова Е.Е., Коваленко О.О., Денисова Т.С., Говорун В.М., Бочкарев Е.Г. Применение ПЦР для диагностики туберкулеза легких. / В сб.: Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы II Всероссийской конференции. М., 1998.-с.93.
14. Денисова Т.С., Говорун В.М. Возможности применения метода ПЦР (ДНК-диагностики) для выявления микобактерий туберкулезного комплекса. / В сб.: Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний. Материалы II Всероссийской конференции. М., 1998.-с.96-100.
15. Дзадзиева М.Ф., Жербутович Н.В. Диагностическая ценность ПЦР при туберкулезе. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1997. - № 5.-с.10-13.
16. Калюк А.Н. Комплексные бактериологические исследования в диагностике туберкулеза. // Туберкулез и экология. - 1995. - № 3.-с.28-31.
17. Козулицына Т.И. Микробиологические исследования./ В руководстве для врачей: Туберкулез органов дыхания. М.,1981.- с.136-149.
18. Мирлина Е.Д., Ланцов В.А. Диагностические возможности метода ПЦР при генитальном туберкулезе у женщин. // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 1.-с.22-26.
19. Нестеренко Л.Н. Использование молекулярно-биологических методов в диагностике и типировании штаммов Mycobacterium tuberculosis. / В сб.: Молекулярные основы патогенеза и диагностики туберкулеза и другой легочной патологии. Материалы научно-практической конференции. М., 1995.-с.50.
20. Приймак А.А., Владимирский М.А., Шипина Л.К., Калюк А.Н., Денисова Т.С., Народницкий Б.С., Калинина М.В. ПЦР - быстрый и высокочувствительный метод определения возбудителя туберкулеза в биологических материалах. // Пульмонология - 1995. - № 3.-с.16-20.
21. Савенков В.И., Шишхов Д.М., Ященко В.В. Место генодиагностики в лабораторных методах исследования туберкулеза. / В сб.: Генодиагностика в современной медицине. Материалы 3-ей Всероссийской конференции. М., 2000.-с.287-290.
22. Смирнова Т.Г., Савинкова С.Н., Мартынова Л.П. Выявление ДНК микобактерий у животных с экспериментальным туберкулезом. / В сб.: Иммунодиагностика и иммунореабилитация при лепре, туберкулезе и других хронических заболеваниях. Материалы симпозиума. Астрахань.,1998.-с.16-17.
23. Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Севастьянова Э.В., Денисова Т.С., Генерозов Э.В., Бочкарев Е.Г., Голышевская В.И. Повышение эффективнгости диагностики абациллярного туберкулеза при сочетании ПЦР-анализа с культуральным посевом./ В сб.: Генодиагностика в современной медицине. Материалы 3-ей Всероссийской конференции. М., 2000.-с.290-291
24. Banerjee A., Dubnau E., Quemard A., Balasubramanian V, Um K.S., Wilson T., Collins D., de Lisle G., Jacobs W.R.Jr., *Science.* 1994. 263:227-230.
25. Bodmer, T., Zurcher, G., Imboden, P., and Telenti A., *J. Antimicrob. Chemother*. 1995. 35:345-348.
26. Boom, R., Sol C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.H., Wertheim, P.M.E., van Dillen, J.Van der Noordaa., *J.Clinical Microb*. 1990. 28(3):495-503.
27.Brisson-Noel A., Lecossier D., Nassif X. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet, 1989; 2:1069-1071.
28. Canetti G., Froman S., Grosset J., et al. *Bull World Health Organization.* 1963. 29:565-579.
29. Caugant D.A., Sandven P., Eng J., Jeque J.T., Tonjum T., *Microb. Drug Resist*. 1995. 1:321-326.
30. Cole ST, Telenti A., *Eur Respir J Suppl.* 1995. Sep;20:701S-713S
31. Cooksey RC, Morlock GP, Glickman S, Crawford JT., *J Clin Microbiol*. 1997. 35(5):1281-1283.
32. David H. Persing. In vitro nucleic acid amplification techniques. Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications, 1993.
33. De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinckx L, Rossau R, Traore H, Portaels F., *Tuber Lung Dis*. 1995. 76(5):425-430.
34. Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Bottger E., *Mol Microbiol*. 1993. 9:1239-1246.
35. Godfrey-Faussett P, Stoker NG, Scott JA, Pasvol G, Kelly P, Clancy L., *Tuber Lung Dis*. 1993. 74(4):240-243.
36. Heym B., Honore H., Truffot-Pernot C., Banerjee A., Schurra C., Jacobs W.R., van Embden J.D.A., Grosset J.H., and Cole S.T., *Lancet.* 1994. 344:293-298.

37. Kapur V., Li L.L., Iordanescu S., Hamrick M.R., Wanger A., Kreiswirth B.N., and Musser J.M., *J. Clin. Microbiol*. 1994. 32:1095-1098.
38. Kox L.F.F., Rhienthong D., Medo Miranda A. A more reliableble PCR for detection of M.tuberculosis in clinical samples.J.Clin.microb., 1994;32:672-678.
39. Lassence A., Leccossier D. Detection of mycobacterial DNA from patients with tuberculosis pleurisy by means of the PCR:comarison of two protocols. Thorax, 1992; 47:265-269.
40. Manjunath N., Shankar P., Rajan L. Evalution of a PCR for the diagnosis of tuberculosis.Tubercle, 1991;72:21-27.
41. Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E J., *J Clin Microbiol*. 1998. 36(1):20-23.
42. Nash KA, Gaytan A, Inderlied C.B., *J Infect Dis*. 1997. 176(2):533-536.
43. Nolan C.M., Abe C., Sticht-Groh V., Gilis T.P., *Antimicrob. agents Chemother* . 1994. 38:2380-2386.
44.Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K, *Antimicrob Agents Chemother*. 1996. 40(4):1053-1056
45. Rigouts L, Portaels F. *Tuber Lung Dis*. 1994. 75(2):160.
46. Rinder H., Dobner, P., Feldmann, K., Rifai, M., Bretzel, G., Rusch-Gerdes, S., and Loscher, T. *Microb. Drug Resist*. 1997. 3:195-197.
47. Shankar P., Manjunath N., Mohan K. Rapid diagnosis of tuberculosis meningites by PCR. Lancet, 1991;387:5-7.
48. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, Stover CK., *Science*. 1996. 14;272(5268)-p.1641-1643.
49.Suzuki Y., Katsukawa C., Tamaru A., Abe C., Makino M., Mizuguchi Y., and Taniguchi H., *J. Clin. Microbiol*. 1998. 36: 1220-1225.
50 .Takiff H. E, Salazar L, Guerrero C, et al., *Antimicrob Agents Chemother*. 1994. 38:773-780.
51. Taniguchi, H., Aramaki, H,. Nikaido, Y., Mizuguchi, Y., Nakamura, M,. Koga, T., Yoshida, S-i., *FEMS Microb. Lett*.- 1996.-v. 144-p.103-108.
52. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, and Bodmer T., *Antimicrob. Agents Chemother*. 1993. 37 :2054-2058.
53. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J.,Matter L., Shopfer K.,Bodmer T., Lancet.1993.341:647-650.
54. Tsukamura, M., *Tubercle.*1972.53:111-117.
55.Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniewski FA., *J Clin Microbiol*. 1998. 36(7):1969-1973.
56.Williams D.L., Waguespack C., Eisenach K., Crawford J.T., Portaels F., Salfinger M., Nolan C.M., Abe C., Sticht-Groh V., Gilis T.P. Antimicrob.aagents Chemother.1994.38:2380-2386.
57. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S., *Nature*. 1992. 358.:591-593.