

ВНЕДРЕНИЕ В БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ МЕТОДА БИОЧИПОВ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВАМ

И.А. Смазнова, В.С. Терешин, А.И. Полозов, С.В. Гаврилюк, В.В. Заякин, А.М. Мороз, И.Я. Нам

Работа поддержана грантами Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ФЦП 02.740.11.0285 и Аналитической ведомственной целевой программы 2.1.1/224

Метод биочипов был использован для диагностики микобактерий туберкулеза и определения устойчивости к антибиотикам. Работа проводилась на образцах, полученных от пациентов ГУЗ «Брянский областной противотуберкулезный диспансер», в сотрудничестве с Московским городским научно-производственным центром борьбы с туберкулезом. Метод биочипов обладает высокой производительностью, чувствительностью, позволяет провести диагностику за 1-2 рабочих дня. Полученные данные совпадают с лабораторными результатами микробиологических исследований и использованы для выбора стратегии лечения больных.

Ключевые слова: биочипы, бионанотехнология, туберкулез, диагностика, устойчивость к антибиотикам

Введение

Туберкулез является опасным, социально значимым заболеванием человека. Эпидемия туберкулеза стала проблемой национальной безопасности в России.

В Брянской области, по данным главного врача Брянского областного противотуберкулезного диспансера Гаврилюка С.В., в связи с аварией на Чернобыльской АЭС длительное время было запрещено флюорографическое обследование населения, что привело к значительному росту больных туберкулезом в регионе. В настоящее время проводится регулярное флюорографическое обследования жителей области, и ежегодно по Брянской области выявляется более одной тысячи заболевших. Заболеваемость населения Брянской области туберкулезом находится на среднем в ЦФО уровне и составляет 89 человек на 100 тыс., смертность — 17 человек на 100 тыс. населения.

Эффективность лечения туберкулеза и борьбы с распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза во многом зависит от скорости обнаружения микобактерии, идентификации типа возбудителя и определения лекарственной чувствительности. Таким образом, оперативность, достоверность и точность диагностики являются определяющими факторами для успешного лечения больных туберкулезом.

Обзор литературы.

В настоящее время в абсолютном большинстве бактериологических лабораторий Российской Федерации для определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза используется культуральная диагностика с посевом анализируемого материала на плотные питательные среды, содержащие чистые субстанции основных противотуберкулезных препаратов в стандартных концентрациях [1]. Ответ о наличии возбудителя и его лекарственной чувствительности при использовании данного метода может быть получен не ранее 8-12 недель [2]. При этом до получения результатов определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза больным обычно назначают противотуберкулезные препараты первого ряда (рифампицин и изониазид) в составе I режима химиотерапии, независимо от того, каким по лекарственной чувствительности штаммом они заражены, хотя подбор схемы лечения с учетом характера устойчивости микобактерий туберкулеза в значительной степени определяет ее эффективность [3]. Применение I режима химиотерапии при высоким уровне первичной множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза приводит к индукции лекарственной устойчивости и создает условия для формирования большого контингента хронически больных туберкулезом легких, в том числе с — множественной лекарственной устойчивостью.

Принципиально проблема быстрого обнаружения, идентификации возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности была решена в результате разработки технологии биологических микрочипов [4].

Идея создания биологического микрочипа возникла в конце 1980-х годов одновременно в Великобритании, Югославии и СССР. В Советском Союзе эти работы были инициированы и

проводились в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН под руководством выдающегося ученого, академика А.Д. Мирзабекова [5]. В 1999 году американская газета «Sunday Times» опубликовала имена 20 ученых, работы которых окажут наибольшее влияние на развитие технологий XXI века. Возглавлял этот список академик РАН А.Д. Мирзабеков – «русский изобретатель первого в мире биочипа, который революционизирует медицинскую диагностику» [6].

Под руководством А.Д. Мирзабекова в лаборатории биочипов Института молекулярной биологии РАН совместно с Московской медицинской академией им. И.М.Сеченова, ЦНИИ туберкулеза РАМН, ГНЦ "Вектор" МЗ РФ были разработаны биочипы для идентификации микобактерии туберкулеза и ее резистентных форм [7] как в культуре, так и в биологических пробах пациентов: «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2».

Биочип «ТБ-БИОЧИП» способен идентифицировать несколько штаммов микобактерии по характерному полиморфизму в гене 16S рРНК и одновременно с достоверностью 98% выявлять мутации во фрагменте гена *rpoB*, который определяет устойчивость микобактерии к рифампицину. Биочип содержит олигонуклеотидные пробы на 30 наиболее распространенных мутаций, обуславливающих резистентность к рифампицину.

Резистентность МБТ к рифампицину чаще всего возникает вследствие появления мутаций в гене *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы. Несмотря на довольно значительный размер фермента *Rpo B* – 1172 аминокислоты у МБТ, почти все мутации происходят в сегменте гена *rpoB*, состоящем из 81 основания и кодирующем аминокислоты 507 – 533. Концентрация мутаций, вызывающих устойчивость к рифампицину в этом сегменте, получившем название «участок, определяющий устойчивость к рифампицину» (УОУР), облегчает их выявление молекулярными методами. В 96% случаев у штаммов, резистентных к рифампицину, мутации находятся в УОУР. Большинство мутаций в кодонах 516, 526 и 531 обуславливают устойчивость к рифампицину высокого уровня (минимальная ингибирующая концентрация (МИК) > 32 мкг/мл), однако при некоторых заменах отмечаются более низкие МИК: например, Asp516>Tyr (2 мкг/мл), His526>Leu (8 мкг/мл) и His526>Asn (8 мкг/мл).

Устойчивость МБТ к изониазиду обусловлена мутациями, по меньшей мере, в трех генах: около половины всех устойчивых к препарату МБТ содержат мутации в гене *katG*, кодирующем каталазу-пероксидазу. В результате мутации изменяется кристаллическая структура фермента, что, в свою очередь, ведет к снижению способности каталазы-пероксидазы окислять изониазид, и, как следствие, у МБТ возникает устойчивость к препарату. Мутации расположены на всем протяжении гена, наиболее часты замены в кодонах 65, 125, 511, 513, 521 и 617 гена *katG*;

ген *inhA*, кодирующий редуктазу белка-переносчика еноилацильного радикала (БПА). Около 20% штаммов возбудителя, устойчивых к изониазиду, содержат мутации в данном гене, и почти все они происходят в области промотора, по всей видимости, увеличивая его экспрессию; мутации в генах *oxyR* и *ahpC* являются компенсаторной реакцией на снижение каталазно-пероксидазной активности, контролируемой генами *katG* и *inhA*. Мутации промотора, вызывающие сверхрегуляцию *ahpC*, были выявлены приблизительно у 10% штаммов возбудителя, устойчивых к изониазиду.

Биочип «ТБ-БИОЧИП» содержит 72 иммобилизованных дискриминирующих зонда, 3 маркерные ячейки для корректного обсчета интенсивности флуоресценции с использованием программного обеспечения и 2 ячейки пустого геля, играющие роль отрицательного контроля. Гелевые ячейки, содержащие олигонуклеотиды, объединены в 21 группу таким образом, чтобы сравнение интенсивности флуоресцентных сигналов ячеек внутри каждой группы позволяло сделать заключение о наличии/отсутствии мутации (минорного полиморфизма), приводящей к замене одного аминокислотного остатка. На чипе также расположены ячейки, содержащие олигонуклеотиды, комплементарные последовательности IS6110, уникальной для *Mycobacterium tuberculosis complex*, что позволяет дифференцировать МБТ от других микобактерий.

Интерпретация результатов гибридизации осуществляется при сравнении интенсивности флуоресцентных сигналов в ячейках, принадлежащих к одной группе. Максимальный флуоресцентный сигнал свидетельствует о наличии совершенного гибридизационного дуплекса.

В настоящее время в России оба набора для диагностики туберкулеза «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» получили разрешение «Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития» на применение в качестве диагностического средства. «ТБ-БИОЧИП» применяется для выявления МБТ и одновременного определения лекарственной чувствительности МБТ к рифампицину и изониазиду (разрешение от 12 ноября 2004 года) и «ТБ-

БИОЧИП-2» используют для определения лекарственной чувствительности к фторхинолонам (разрешение от 8 августа 2006 года).

Анализ биочипов занимает около суток [8, 9], в то время как стандартный микробиологический анализ требует нескольких недель, что совершенно неприемлемо при быстром течении болезни. Метод биочипов прост, сравнительно недорог и ускоряет время проведения анализа от нескольких недель до 1 дня [10, 11]. Метод был апробирован в ряде клиник, головным учреждением является отдел проблем лабораторной диагностики Московского городского научно-практического Центра борьбы с туберкулезом.

Использование тест-систем «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2»:

1. Тест-система «ТБ-БИОЧИП» предназначена для выявления возбудителя туберкулеза в диагностическом материале из органов дыхания человека (мокрота, бронхоальвеолярные смывы, плевральный экссудат) и определения его лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе.

2. Тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» предназначена для выявления возбудителя туберкулеза в диагностическом материале из органов дыхания человека (мокрота, бронхоальвеолярные смывы, плевральный экссудат) и определения его лекарственной чувствительности к фторхинолонам методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе.

В 2009 году ИННО-центр биотехнологии выполнил работу по заказу Департамента экономического развития по теме «Исследование инновационного потенциала Брянской области с целью развития трансфера технологий в сфере фундаментальных исследований, биотехнологий», в Брянском государственном университете был создан Центр трансфера технологий. Деятельность Центра направлена на привлечение в Брянскую область инновационных технологий в области медицины, растениеводства, ветеринарной медицины, селекции растений, животноводства.

Поскольку ранняя диагностика методом биочипов таких социально значимых заболеваний как туберкулез и лейкоз детей имеет огромное значение для успешного лечения больных, то нами было предложено внедрение этого метода в Брянской области. На внебюджетные средства БГУ в ИННО-центре биотехнологии был приобретен прибор «Чип-детектор-01» производства ООО «ИМБ-Биочип» стоимостью 980 тыс. руб. Был заключен договор о сотрудничестве с ГУЗ «Брянский областной противотуберкулезный диспансер» и Московским городским научно-практическим центром борьбы с туберкулезом МГНПЦБТ.

Результаты и их обсуждение

Диагностика образцов пациентов ГУЗ БОПТД методом биочипов была проведена в отделе проблем лабораторной диагностики МГНПЦБТ. Каждый пациент обследовался троекратно, на образцах мокроты от 31 пациента отделения №1 БОПТД было проведено 93 анализа с помощью метода биочипов, определены штаммы микобактерии, лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза к изониазиду и рифампицину.

В данном исследовании были включены больные, у которых микобактерии туберкулеза были выделены методом микроскопии — 23 человека. Эти пациенты составили первую группу (основную). Вторую группу составили больные, у которых микобактерии туберкулеза в мокроте методом микроскопии не обнаружены — 8 человек.

Из 31 обследованного больного мужчин было 24 (77,4%) и 7 женщин (22,6%).

Преобладал инфильтративный — 13 (41,9%), и диссеминированный туберкулез — 11 (35,4%), фиброзно-ковернозный туберкулез обнаружен у 4 (12,7%) больных, казеозная пневмония, цирротический туберкулез, множественные туберкулемы выявлены у 1 больного, соответственно (по 3,2%) (рис.1).

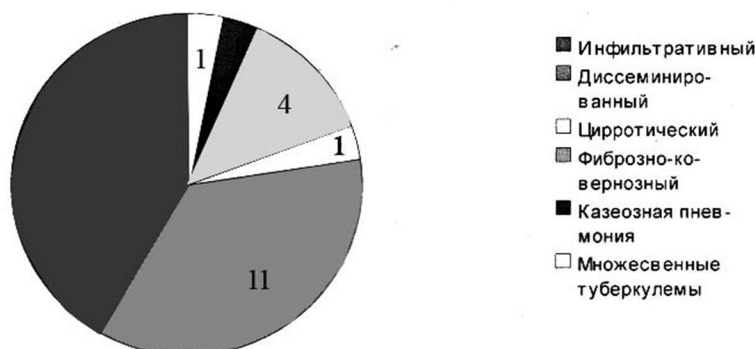


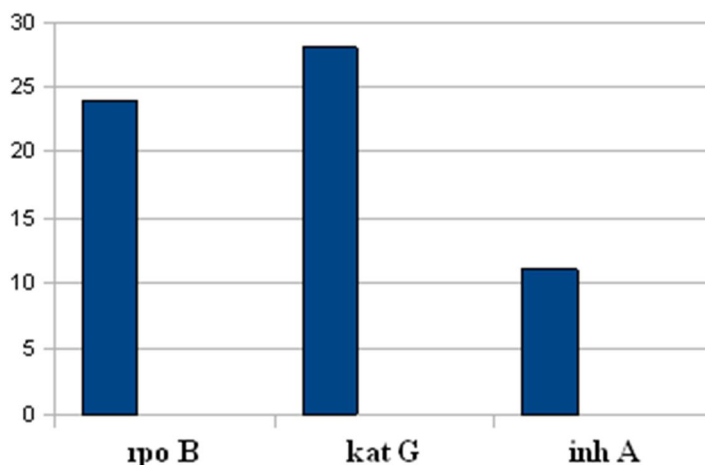
Рис. 1 Характеристика пациентов по клиническим формам туберкулеза.

Параллельно с экспресс-методом определения лекарственной чувствительности («ТБ-БИОЧИП») была определена лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза культуральным методом абсолютных концентраций. В данное исследование были включены больные, выделявшие микобактерии туберкулеза, устойчивые к изониазиду и рифампицину одновременно, у них определены мутации в генах *kat G*, *inhA*, *oxy R-aph C*, ответственные за устойчивость к изониазиду, а также в гене *rpo B*, ответственном за устойчивость к рифампицину.

На рис. 2 приведены данные по мутациям МБТ, которые определяют устойчивость к разным антибиотикам и их сочетанию.

Лекарственная устойчивость к изониазиду выявлена в 28 пробах в гене *kat G*, в 11 пробах в гене *inh A*, мутаций в гене *oxy R – aph C* выявлено не было.

Одновременное выявление мутаций в генах *kat G* и *inh A* обнаружено в 8 пробах у 3 больных. Всего мутаций в генах *kat G* выявлено у 13 больных, а в генах *inh A* у 4 больных. Мутации в гене *rpo B*, ответственным за устойчивость к рифампицину, выявлено в 24 пробах клинического материала, у 9



больных.

Рис 2. Характеристика мутаций в генах *kat G*, *inh A*, *oxy R – aph C* и *rpo B*.

Сочетание мутаций в генах *rpo B*, *kat G*, *inh A*, ответственные за возникновение множественной лекарственной устойчивости обнаружено в 20 пробах у 9 больных. Сочетание *rpo B + kat G* встречалось в 13 случаях (6 больных), а сочетание *rpo B + inh A* в 3 пробах (1 больной). Сочетание *rpo B + kat G + inh A* в 6 пробах (2 больных).

В таблице 1 приведены сводные результаты обследования больных по типам мутаций:

Таблица 1

Результаты анализа проб больных туберкулезом БОПТБ методом биочипов

№ группы	Типы мутаций				Устойчивость		Кол-во больных
	<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>oxyRaphC</i>	изониазид	рифамп.	
1	-	-	-	-	-	-	8
2	wt	wt	wt	wt	-	-	9
3	wt	Ser315Thr	T15	wt	+		4
	wt	Ser315Thr	wt	wt	+		
4	His526Cys	Ser315Thr	wt	wt	+	+	8
	Ser531Leu	wt	T15	wt	+	+	
	Asp516Val	Ser315 Thr	wt	wt	+	+	
	Ser531Leu	wt	wt	wt	+	+	
	Ser531Leu	Ser315Thr	wt	wt	+	+	
ИТОГО							29

Отчет о результатах применения метода биочипов для ранней диагностики микобактерии туберкулеза и штаммов МБТ, устойчивых к лекарственным средствам, был подготовлен доктором медицинских наук, заведующим 1-ым терапевтическим отделением ГУЗ «БОПТБ» В.С. Тершиным.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Технология микрочипов для выявления лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду позволяет своевременно назначать адекватную химиотерапию больным туберкулезом, что приводит к быстрому абсциллированию, уменьшению сроков стационарного лечения, а в конечном итоге, к значительному экономическому эффекту.

2. Своевременное назначение резервных противотуберкулезных препаратов по эффективности действия сопоставимо с результатами лечения впервые выявленных больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом. Своевременное назначение препаратов резервного ряда сокращает сроки абсциллирования мокроты, значительно ускоряет темпы респираторных процессов в легких по сравнению с группой больных, у которых коррекцию лечения производили по результатам метода абсолютных концентраций спустя 2-3 месяца лечения.

3. Совпадение результатов молекулярно-генетического и классического бактериологического методов составляет 95,3% случаев.

4. С помощью микрочиповой технологии удается выявить 80-85% всех случаев наличия множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза у обследуемых больных туберкулезом в течение 2 суток, что соответствует данным, полученным в нашем исследовании.

5. Метод «ТБ-БИОЧИП» перспективен для определения чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам, поскольку имеет следующие важные преимущества перед другими методами определения МБТ:

сроки определения чувствительности – 1 сутки;

возможность анализа ДНК микобактерий туберкулеза, выделенной из любого биологического материала при поступлении пациента в диспансер;

высокая специфичность;

высокая чувствительность анализа.

Эти преимущества делают тест-систему «ТБ-БИОЧИП» крайне необходимой для применения в Брянском противотуберкулезном диспансере. Вместе с тем, следует отметить высокую стоимость проведения анализа, поскольку при 3-кратной повторности затраты на одно обследование составят около 3.5-4 тысяч рублей. Однако средства, сэкономленные при лечении одного больного, позволят получить экономию в десятки тысяч рублей на каждом больном, которому своевременно назначили правильное медикаментозное лечение. Внедрение метода биочип-диагностики в лечебных учреждениях Брянской области экспресс-диагностики возбудителя туберкулеза поможет не только сократить сроки излечения больных и уменьшить средства, затрачиваемые на лечение одного больного, но и уменьшить количество больных по области в целом.

Работа проводилась при поддержке грантов: ФЦП № 02.740.11.0285, АВЦП № 2.1.1./224.

The biochip method has been used to diagnosticate of the tuberculosis mycobacteria forms and their drug resistance. Samples of the Bryansk region TB dispensary patients were analysed in the Moscow developmental tuberculosis centre. The biochip method specified by high productivity and sensibility takes 1-2 workdays for results. Results are in agreement in early microbiologic investigations and used for antituberculosis strategy.

The key words: biochips, bionanotechnology, tuberculosis, diagnostic, drug resistance.

Список литературы

1 Козулицына Т.И. Микробиологические исследования / В руководстве для врачей: Туберкулез органов дыхания. М., 1981. с.136-149.

2 Иртуганова О. А., Смирнова Н. С., Слогодская Л. В. и др. Бактериологические методы определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза // В сб.: Туберкулёз сегодня: проблемы и перспективы. М. 2000. С. 73-75.

3 Барило В.Н. с соавт. Ускоренное определение чувствительности *Micobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам в системе Bactec MGIT 960 и на «ТБ-БИОЧИП»// Туберкулез и болезни легких.2009. №11. с. 56-60.

4 Кузьмин А. В., Васильева И. А., Черноусова Л. Н. Эффективность химиотерапии деструктивного туберкулёза лёгких, основанной на результатах экспресс-детекции лекарственной чувствительности к изониазиду и рифампицину тест-системой «ТБ-Биочип» // Пробл. туб. 2006. № 8. с. 17-23

5 Мирзабеков А., Прокопенко Д., Четкин В. Применение матричных биочипов с иммобилизованной ДНК в биологии и медицине// В сб.: Информационные медико-биологические технологии, под общ. ред. В.А. Княжева, К.В. Судакова, (2002) стр. 166-197. Изд. Дом ГЭОТАР-МЕД, Москва.

6 Mirzabekov, A. DNA sequencing by hybridization- a megasequencing method and a diagnostic tool? // Trends in Biotechnology ,1994, 12, 27-32.

7 О.И. Скотникова, А.С. Заседателев, В.М. Михайлович, А. Ю., Соболев, Д. А. Грядунов, Е. Л. Исаева, С.А. Лапа. Методы для идентификации мутаций // Под редакцией В.И.Литвинова,

А.М.Мороза. Глава в монографии «Лабораторная диагностика туберкулеза», МНПЦБТ, 2002, стр. 91-115.

8 Мороз А.М., Носова Е.Ю., Галкина К.Ю., Краснова М.А., Букатин А.А. Определение лекарственной чувствительности *Micobacterium tuberculosis* с помощью биочипов./Методические рекомендации №42. М. 2008. с. 3-12.

9 Исакова Ж.Т. “Практическое значение тест-системы «ТБ-Биочип» в экспресс-идентификации штаммов *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью”. "Клин. лаб. диагностика", 2009, № 2, с. 50 - 51.

10 Под ред. Перельмана М.И. Фтизиатрия: национальное руководство. М.: ГЭОТАР - МЕДИА, 2007. с. 153-180.

11 Скотникова О.И., Носова Е.Ю., Бадлеева М.В., Дорожкова И.Р., Мороз А.М. Новые технологии определения лекарственной чувствительности // Пробл.туберкулеза. – 2004. - № 6. - с.15-18.

Об авторах

Смазнова И.А. – Брянский государственный университет имени академика. И.Г. Петровского, iyanaml@yandex.ru

Терешин В.С. – [ГУЗ «Брянский областной противотуберкулезный диспансер», г. Брянск](#)

Полозов А.И. – [ГУЗ «Брянский областной противотуберкулезный диспансер», г. Брянск](#)

Гаврилюк С.В. – [ГУЗ «Брянский областной противотуберкулезный диспансер», г. Брянск](#)

Заякин В.В. – Брянский государственный университет имени академика. И.Г. Петровского, iyanaml@yandex.ru

Мороз А.М. – [Московский городской научно-практический Центр борьбы с туберкулезом](#)

Нам И.Я. – Брянский государственный университет имени академика. И.Г. Петровского, iyanaml@yandex.ru