

- больных инфильтративным туберкулезом легких // Пробл. туб. — 1997. — № 3. — С. 21—22.
2. Куликов В. П. Цветное дуплексное сканирование в диагностике сосудистых заболеваний. — Новосибирск, 1997.
 3. Кульчавеня Е. В., Хомяков В. Т. Возможности лазеротерапии в комплексном лечении мочевого пузыря туберкулеза // Туб. и экол. — 1995. — № 4. — С. 41—43.
 4. Кульчавеня Е. В., Хомяков В. Т., Жукова И. И. Туберкулез половых органов у мужчин в Западной Сибири // Урология. — 2004. — № 4. — С. 34—37.
 5. Лазерная терапия заболеваний мочевого пузыря / Москвин С. В., Муфатед М. Л., Буйлин В. А. и др. — М., 2004.
 6. Лопаткин Н. А. Руководство по урологии. — М., 1998.
 7. Чернеховская Н. Е., Свистунова А. С., Свистунов Б. Д. Туберкулез на рубеже веков. — М., 2000.
 8. Ягафарова Р. К. Особенности клиники, диагностики и оптимизация этиопатогенетической терапии мочевого пузыря туберкулеза в современных эпидемиологических условиях: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — СПб., 1999.
 9. Nickel J. C., Sorensen R. // J. Urol. (Baltimore). — 1996. — Vol. 155. — P. 1950—1955.

Поступила 28.09.07

РЕЗЮМЕ

Р. Г. Шакиров, В. Н. Павлов, Р. К. Ягафарова. — ЛАЗЕРОТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА САНАТОРНОМ ЭТАПЕ РЕАБИЛИТАЦИИ

В условиях специализированного санатория "Глуховская" было обследовано и пролечено 79 пациентов с туберкулезом простаты. Все больные были разделены на 2 группы: основную и контрольную.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2008

УДК 616-002.5:579.252.55]-07:577.2

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

¹М. А. ВЛАДИМИРСКИЙ, ²Ю. С. АЛЯПИКИНА, ²Д. А. ВАРЛАМОВ, ²Я. И. АЛЕКСЕЕВ, ¹Л. К. ШИПИНА, ³М. В. ШУЛЬГИНА, ⁴Л. В. ДОМОТЕНКО, ⁵К. Р. БЫКАДОРОВА, ⁶Н. Н. ГАЩЕНКО, ⁷Л. Б. ЕНДОУРОВА, ⁸О. В. ИВАНОВА, ⁹Е. А. ИЛЬИНА, ¹⁰О. А. ЛЕВКОВА, ¹¹Т. В. МАРКОВА, ¹²В. П. НАЗЕМЦЕВА, ¹³Е. П. ПАВЛОВА, ¹⁴А. И. ПОЛОЗОВ, ¹⁵Н. В. ШИШКИНА

¹НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И. М. Сеченова, ²ЗАО "Синтол", Москва, ³НП Центр внешнего контроля качества лабораторных исследований, Москва, ⁴НИИ прикладной микробиологии, Оболensk, ⁵ОПТД, Ростов-на-Дону, ⁶КПТД, Краснодар, ⁷ОПТД, Мурманск, ⁸ОПТД, Кемерово, ⁹ОПТД, Нижний Новгород, ¹⁰ОПТД, Воронеж, ¹¹ПТД № 4, Москва, ¹²ОПТД, Калининград, ¹³ОПТД, Псков, ¹⁴ОПТД, Брянск, ¹⁵ОПТД, Саратов

Распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ) является одной из наиболее серьезных проблем борьбы с туберкулезом во всем мире, в частности в России [1, 32]. Оно в значительной степени связано с низкой эффективностью, точнее длительностью проведения, анализа лекарственной чувствительности МБТ при использовании традиционных микробиологических методов.

Развитие молекулярно-биологических методов быстрого определения чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам основано на амплификации с использованием полимеразной реакции (ПЦР) специфических участков генов, кодирующих мишени лекарственных веществ, с определением мутаций, связанных с возникновением устойчивости. Основные методы анализа: определение мутаций с помощью секвенирования (определение нуклеотидных последовательностей) полученных ампликонов [13, 18]; гибридизация ампликонов на полосках (стрипах) с олигонуклеотидными ДНК-зондами, комплементарными к известным мутациям, — метод line probe assay (LPA) [6, 8]; гибридизация с ДНК-зондами в формате микробиочипа [2—5, 9], технологии, основанные на ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) [11, 15, 17, 19, 23].

Пациентам основной группы в комплексе с этиологическим и патогенетическим лечением дополнительно проводили терапию низкоинтенсивным лазерным излучением. Проведенные исследования показали, что в группе пациентов, получавших низкоинтенсивное лазерное излучение, отмечались более быстрое купирование дизурических явлений, исчезновение или уменьшение признаков копулятивной дисфункции, статистически достоверно чаще и быстрее зарегистрирована положительная динамика показателей качества жизни, изменений лабораторных показателей. Лазеротерапия одновременно влияет на несколько звеньев патогенеза мочевого пузыря туберкулеза, имеет ограниченное число противопоказаний, хорошо переносится больными и является эффективным методом комплексного лечения больных туберкулезом предстательной железы в условиях санаторной реабилитации.

R. G. Shakirov, V. N. Pavlov, R. K. Yagafarova. — LASER THERAPY IN THE COMPLEX TREATMENT OF PROSTATIC TUBERCULOSIS AT THE SANATORIUM STAGE OF REHABILITATION

Seventy nine patients with prostatic tuberculosis were examined and treated at the specialized "Glukhovskaya" sanatorium. All the patients were divided into 2 groups: a study group and a control one. In the study group patients, low-intensity laser radiotherapy was additionally performed in combination with etiological and pathogenetical treatments. The performed studies demonstrated that in the patients exposed to low-intensity laser radiation, there was a rapid relief of dysuric symptoms, cessation or diminishment of the signs of copulative dysfunction; positive changes in life quality indices and laboratory parameters were statistically significantly more frequently and more rapidly recorded. Laser therapy simultaneously was found to affect a few links of the pathogenesis of genitourinary tuberculosis, to have limited number of contraindications, to be well tolerated, and to be an effective method of the complex treatment of patients with prostatic tuberculosis during sanatorium rehabilitation.

Наиболее часто встречающиеся мутации, связанные с возникновением устойчивости МБТ к рифампицину в гене *rpoB*, а для изониазида — в генах *katG* и *inhA*, хорошо изучены и установлены [18].

Возможности практического применения этих методов активно обсуждаются в научной литературе [16, 18, 19, 21]. В клинической практике эти методы могут использоваться для быстрого (2 дня) определения лекарственной устойчивости к соот-

ветствующим препаратам и своевременной коррекции лечения, а также служить средством контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов, своевременного эпидемиологического расследования их трансмиссии.

Изучение эффективности применения молекулярно-биологических методов, позволяющих быстро обнаруживать лекарственную устойчивость МБТ, должно, безусловно, быть основано и на сопоставлении с методами золотого стандарта, т. е. общепризнанными методами культурального (фенотипического) исследования для определения лекарственной чувствительности или устойчивости МБТ.

Мы разработали на основе технологии ПЦР-РВ эффективный и технически доступный с использованием одностадийного анализа метод быстрого определения лекарственной устойчивости к основным противотуберкулезным препаратам (изониазид, рифампицин, этамбутол).

Этот метод мы применяли для широкого исследования распространенности штаммов МБТ, особенно среди больных с впервые установленным диагнозом туберкулеза, устойчивых к основным противотуберкулезным препаратам — рифампицину и изониазиду — в 24 регионах Российской Федерации. При этом было проведено сопоставление результатов определения лекарственной устойчивости изучаемых (более 2 тыс.) штаммов МБТ, полученных методом ПЦР-РВ с результатами анализа тех же штаммов методами традиционного исследования в региональных микробиологических лабораториях. Кроме того, 100 штаммов МБТ, случайно выбранных из общего числа исследованных, были повторно протестированы с помощью культурального исследования методом пропорций в независимой лаборатории (НИИ прикладной микробиологии, Оболенск Московской области), неоднократно и успешно участвовавшей в тестировании внешнего контроля качества лабораторных исследований.

Материалы и методы

Штаммы МБТ. 22 референтных клинических штамма с известной характеристикой в отношении их устойчивости к рифампицину (12 штаммов были устойчивы к рифампицину при исследовании в жидкой культуре с помощью Bactec MGIT 960) любезно предоставлены ведущим научным сотрудником лаборатории микробиологии Центрального НИИ туберкулеза РАМН О. А. Иртугановой. 20 штаммов МБТ были получены из супранациональной референс-лаборатории в Швеции от проф. С. Хоффнера в рамках реализации программы внешней оценки качества лабораторных исследований.

С целью изучения распространенности лекарственной устойчивости МБТ в регионах Российской Федерации были изучены 2002 клинических штамма, полученных из 24 областных и краевых противотуберкулезных диспансеров, расположенных в основных географических регионах РФ. Культуры МБТ были собраны по мере их получения в региональной лаборатории по случайной выборке в объеме 60—100 штаммов в зависимости от размеров обслуживаемого региона, исходя из принципа 1 пациент — 1 культура. При этом 70% или основная часть культур МБТ принадлежали пациентам, впервые выявленным, леченным не более 1 мес.

В исследовании были отражены все основные федеральные округа РФ: Северо-Восток (Мурманск, Псков, Калининград) — 281 культура; Центральный федеральный округ (Москва, Брянск, Калуга, Владимир, Рязань, Смоленск, Воронеж, Ярославль) — 534 культуры; Поволжье (Нижний Новгород, Саратов, Самара, Волгоград) — 354 культуры; Южный федеральный округ (Ростов, Ставропольский и Краснодарский края) — 339 штаммов; Урал, Сибирь и Дальний Восток (Екатеринбург, Кемерово, Новосибирск, Иркутск, Красноярск, Якутск) — 494 культуры.

Основная часть культур клинических штаммов МБТ была получена при культивировании на среде Левенштейна—Йенсена, и лекарственная чувствительность к рифампицину и изониазиду изучена стандартным методом абсолютных концентраций с определением роста микобактерий при критической концентрации 40 и 1 мкг/мл соответственно.

Определение лекарственной чувствительности 100 случайно выбранных культур МБТ методом пропорций проводили на агаре Миддлбура 7Н10 ("Difco") с критическими концентрациями рифампицина (1 мкг/мл) и изониазида (0,2 и 1 мкг/мл). Культуру считали устойчивой к препарату, если число МБТ, выросших на среде с препаратом, было выше 1%.

Пробоподготовка образцов и экстракция ДНК. Образцы ДНК выделяли из культур МБТ и образцов мокроты с помощью модифицированного метода R. Boom и соавт. [8] с использованием кремниевых частиц с магнитным ядром.

К полученному объему осадков (образцы мокроты) или суспензии клеток МБТ добавляли 2 объема 6 М раствора гуанидина тиоцианата и инкубировали при встряхивании 10 мин. Затем центрифугировали на микроцентрифуге при 12 000 об/мин в течение 3 мин. В супернатант вносили 50 мкл магнитных кремниевых микрочастиц в концентрации 10 мг/мл. Инкубировали с микрочастицами при легком встряхивании в течение 15—20 мин. Частицы осаждали и отмывали дважды в 2,5 М растворе гуанидина тиоцианата с использованием специального магнитного штатива. Затем микрочастицы дважды отмывали в 70% растворе этанола и подсушивали при 60°C.

Элюировали ДНК с поверхности частиц 80 мкл дистиллированной воды при 60°C в течение 10 мин. Собирали водные растворы образцов ДНК и хранили при -20°C до использования.

Определение мутаций в генах groV, katG и inhA проводили с помощью модифицированной аллель-специфичной ПЦР-РВ. Амплифицировали фрагменты ДНК указанных выше генов: 195 п. н. для groV; 217 и 248 п. н. для katG и inhA соответственно. Фрагменты включали участки с известными мутациями, ассоциированными с лекарственной устойчивостью. Система праймеров и флюорогенных зондов для проведения ПЦР-РВ с определением мутаций в этих генах описана в нашей статье, направленной в печать.

Принцип метода состоит в использовании наряду с линейным флюорогенным ДНК-зондом (TaqMan) [17], детектирующим наличие ДНК МБТ, системы из 3 специальным образом сконструированных аллель-специфичных праймеров, меченных различными флюоресцентными метками на 5'-конце, комплементарных олигонуклеоти-

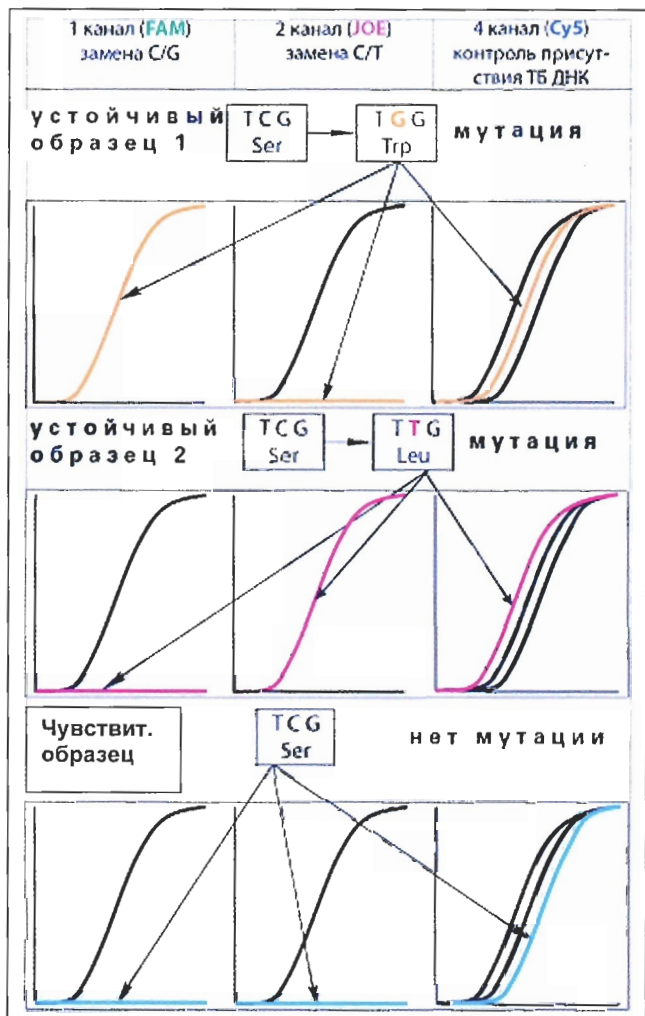


Рис. 1. Пример анализа детекции мутаций в кодоне 531 при измерении флюоресценции в 4 каналах прибора для ПЦР-РВ АНК-32: 1-й канал — детекция флюорофора аллель-специфичного праймера, содержащего мутацию Ser—Trp; 2-й канал — детекция флюорофора аллель-специфичного праймера, содержащего мутацию Ser—Leu; 4-й канал — детекция флюоресценции TaqMan-зонда.

На 2 верхних рисунках выделены кривые флюоресценции по 3 каналам для образцов, содержащих две разные мутации. Для первого образца флюоресценция наблюдается по 2-му каналу (от встроенного флюоресцентно-меченного аллель-специфичного праймера на мутацию Ser—Leu) и 4-му каналу (флюоресценция TaqMan-зонда — контроль присутствия ДНК МБТ). Для второго образца флюоресценция наблюдается по 1-му каналу (от встроенного флюоресцентно-меченного аллель-специфичного праймера на мутацию Ser—Trp) и 4-му каналу (флюоресценция TaqMan-зонда). На нижнем рисунке выделены кривые флюоресценции для чувствительного образца: подъем флюоресценции наблюдается только по 4-му каналу (флюоресценция TaqMan-зонда).

ду, содержащему гаситель флюоресценции на 3'-конце. При отсутствии мутации в реакции срабатывают немеченные праймеры и линейный флюорогенный TaqMan-зонд. При наличии одной из мутаций в анализируемом фрагменте соответствующего гена встраивается аллель-специфичный праймер с освобождением гасителя, в результате чего фиксируется рост флюоресценции соответствующей метки, что регистрируется в соответствующем окне измерения флюоресценции. Таким образом, в одной пробирке наблюдается до 3 точек мутации.

Принцип анализа детекции мутаций при измерении флюоресценции в 4 каналах прибора для ПЦР-РВ представлен на рис. 1.

Аmplификацию проводили по программе: 10 мин — 94°C; 50 циклов: 20 с — 94°C, 50 с — 58°C (groV) или 62°C (katG, inhA) с помощью прибора АНК-32 (Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург), обладающего возможностью измерения флюоресценции в 4 различных каналах. Схема определения мутаций в изучаемых генах представлена в табл. 1.

Пример анализа образцов *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивых к рифампицину, по кодону 531 гена groV методом ПЦР-РВ на приборе АНК-32 представлен на рис. 2.

Результаты и обсуждение

Интерпретация результатов анализа по флюоресценции в 4 каналах прибора для проведения ПЦР-РВ представлена на рис. 1.

При проведении исследований клинических штаммов в каждом опыте использовали внутренние контроли качества: отрицательный (чувствительный штамм) и положительные контроли на соответствующие мутации. Для определения чувствительности метода в модельном эксперименте были изучены суспензии МБТ, приготовленные путем смешивания устойчивого и чувствительного штаммов в различных процентных соотношениях. В модельном опыте было показано, что при наличии в смешанной популяции 1% устойчивых к рифампицину микобактериальных клеток реализуется амплификация мутантного фрагмента ДНК и флюоресценция соответствующего флюоресцентно-меченного праймера.

Изучение 22 референтных штаммов с известной характеристикой, полученной при исследовании культуральным методом устойчивости к рифампицину, было проведено с помощью ПЦР-РВ по кодонам 511, 516, 526, 531 и 533 гена groV и позволило определить устойчивые штаммы с 100% чувствительностью и специфичностью.

Исследование панели из 20 штаммов МБТ с неизвестными характеристиками по лекарственной чувствительности, полученными из супранациональной лаборатории проф. С. Хоффнера, проводили с помощью метода ПЦР-РВ по гену groV, а также по гену katG (устойчивость к изониазиду) и гену Emb306 (устойчивость к этамбутолу). При определении устойчивости к рифампицину были точно установлены 10 мутантных культур (8 мутаций в кодоне 526 и 2 мутации в кодоне 516), что означало выявление устойчивости с 100% чувствительностью и 100% специфичностью. При определении устойчивости к изониазиду только по гену katG выявлено 12 мутантных культур из 16, что означало 75% уровень чувствительности при 100% специфичности. В дальнейшем устойчивость к изониазиду изучали не только по гену katG, но и по гену inhA. Определение устойчивости к этамбутолу позволило выявить 10 мутантных культур из 12 устойчивых (чувствительность 83%) при 100% специфичности. При исследовании 21 образца мокроты больных туберкулезом легких с массивным бактериовыделением были получены предварительные данные, совпадавшие с результатами культурального исследования, показавшие возможность применения этой технологии для анализа непосредственно клинических образцов. Однако чувствительность этого метода и методические особенности

Таблица 1

Схема исследования мутаций в генах, определяющих чувствительность к рифампицину (groB) и изониазиду (katG и inhA)

Гены, кодоны	Нуклеотидные замены	Число пробирок
groB (рифампицин)		
Кодоны:		
531	2 замены Ser-Leu TCG—TTG Ser-Trp TCG-TGG	1
526	6 замен His-Tyr CAC-TAC His-Asp CAC-GAC His-Leu CAC-CTC His-Arg CAC-CGC His-Asn CAC-AAC His-Pro CAC-CCC	2
516	2 замены... Asp-Val GAC-CTC Asp-Tyr GAC-TAC	1
533	1 замен Asp-Val GAC-GTC Asp-Tyr GAC-TAC	1
katG и inhA (изониазид)		
katG:		
Кодон 315	3 замены Ser-Thr AGC-ACC Ser-Asn AGC-AAC Ser-Thr AGC-ACA	1
inhA:		
Кодон 209	1 замена C209T	1

применения ПЦР-РВ для анализа образцов мокроты являются предметом дальнейших исследований.

Результаты широкого исследования распространенности лекарственной устойчивости МБТ в Российской Федерации, проведенные с помощью метода ПЦР-РВ, демонстрировали очень вариабельный уровень лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду в различных регионах.

Лишь в 2 исследованных группах штаммов МБТ, полученных из Москвы (ПТД № 4) и Волгограда, имелся относительно удовлетворительный уровень множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) МБТ у впервые выявленных пациентов: 6,6 и 7,7% соответственно.

В Северо-Западном федеральном округе выделяется Мурманск с наиболее высоким уровнем МЛУ — 27,1%. В среднем по Северо-Западу уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов составил 19,7%. В Центральном федеральном округе (8 областей) средний уровень МЛУ среди больных этой группы составил 20,4%, в Поволжском федеральном округе (4 региона) — 16,3%. В Южном федеральном округе ситуация наиболее неблагоприятная, поскольку средний уровень МЛУ для впервые заболевших составил 31,06%. При этом наибольший уровень МЛУ был в Краснодарском крае — 36%. Следует отметить, что этот регион мы изучали с наибольшим объемом выборки (150 штаммов), а собственные результаты хорошо оснащенной и квалифицированной региональной лаборатории совпадают с нашими данными в 91,6% случаев. Уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов по данным региональной лаборатории составляет 34% при исследовании той же группы штаммов. При исследовании 6 регионов Урала,

Сибири и Дальнего Востока уровень МЛУ среди впервые диагностированных больных туберкулезом составил 24,4%. Среди этих субъектов РФ наиболее высокий уровень МЛУ отмечен по Свердловской области — 33,3%.

Сопоставление результатов определения лекарственной чувствительности 1092 штаммов МБТ методом ПЦР-РВ с результатами исследования этих же штаммов в 11 областных и краевых микробиологических лабораториях ПТД представлено в табл. 2.

В среднем совпадение результатов определения лекарственной чувствительности составило 94%. В лабораториях Нижнего Новгорода и Брянска совпадение результатов по двум методам составило 97,2 и 99,5% соответственно.

Было также проведено сравнительное исследование 100 случайно избранных штаммов МБТ из 3 лабораторий (Брянск, Москва и Ростов-на-Дону) с помощью ПЦР-РВ и культурального анализа методом пропорций. В этой группе 59 культур принадлежали впервые выявленным больным.

Общее число совпадений результатов по двум методам составило 99,5%. 35 культур с выявленной МЛУ совпадали по результатам обоих методов. Лишь в одной культуре, в которой устойчивость к изониазиду была обнаружена методом пропорций, не было обнаружено мутаций при анализе методом ПЦР-РВ.

Всего в 667 штаммах МБТ были выявлены мутации гена groB, обуславливающие устойчивость к рифампицину. При анализе распределения мутаций этого гена мутации в кодоне 531 составили 85,3%, в кодоне 526 — 9,1%, в кодоне 516 — 5,4%, в кодоне 533 — 0,15%. В 999 штаммах МБТ были выявлены мутации в генах katG и inhA, связанные с возникновением устойчивости к изониазиду. В изученных генах распределение мутаций было следующим: 315 katG — 94,2%; 209 inhA — 5,8%.

Таким образом, мы проанализировали 202 штамма МБТ, среди которых 1406 (70,2%) штаммов, полученных от впервые выявленных больных туберкулезом, и 596 штаммов, полученных от ранее леченных пациентов. Среди штаммов МБТ от впервые выявленных пациентов было обнаружено 308 штаммов с устойчивостью одновременно к рифампицину и изониазиду, т. е. МЛУ-штаммов, что составило 21,9%. Кроме того, еще 13% штаммов МБТ от впервые выявленных пациентов были устойчивыми к изониазиду. Среди штаммов МБТ от ранее леченных пациентов (596) уровень МЛУ составил 58,5%, устойчивость к изониазиду была равна 19,8%. Из общего числа штаммов с устойчивостью к рифампицину всего у 3,5% штаммов эта устойчивость не сопровождалась устойчивостью и к изониазиду. Эти результаты в основном подтверждают сведения об устойчивости к рифампицину как суррогатному маркеру МЛУ.

Особая актуальность развития быстрых методов определения лекарственно-устойчивых штаммов МБТ обусловила значительное число исследований, основанных на применении молекулярно-биологических методов анализа.

При изучении эффективности этих методов основное внимание было уделено соответствию получаемых результатов культуральным фенотипическим методам определения лекарственной чувствительности МБТ, а также относительной трудоемкости и стоимости исследований.

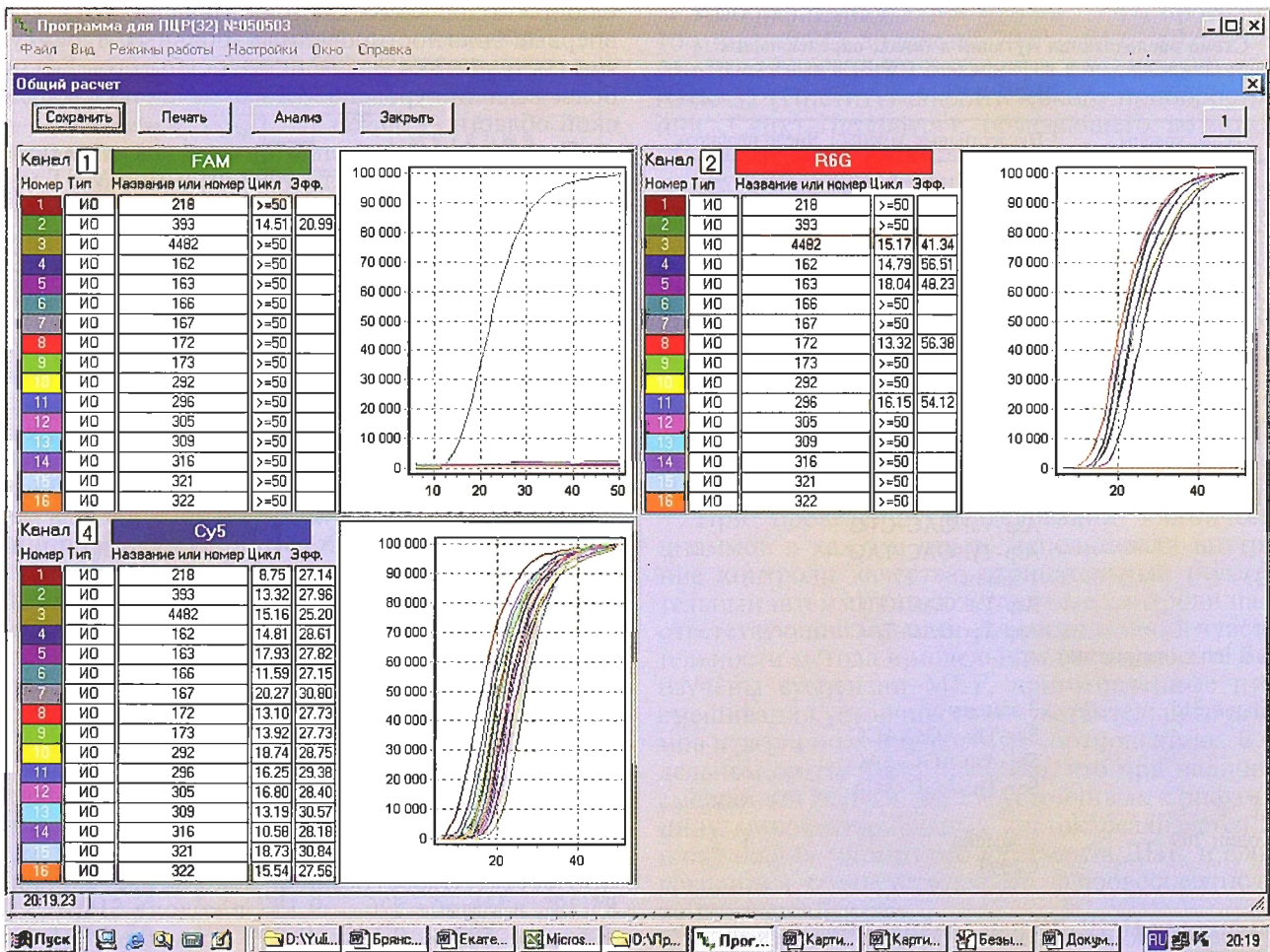


Рис. 2. Пример анализа образцов *Mycobacterium tuberculosis* (Кемерово), устойчивых к рифампицину, по кодону 531 гена *groV* методом ПЦР-РВ на приборе АНК-32 (Россия, Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург).

Образцы: 218 — контрольный образец (чувствительный к рифампицину), 393 — положительный контроль на мутацию Ser—Leu TCG—TTG, 4482 — положительный контроль на мутацию Ser—Leu TCG—TTG, 162—322 — экспериментальные образцы. Результат расчета кинетических кривых амплификации по 4 каналам: 1-й канал: 393 — положительный контроль на мутацию Ser—Leu TCG—TTG; 2-й канал: 4482 — положительный контроль на мутацию Ser—Leu TCG—TTG; 162, 163, 172, 295 — экспериментальные образцы. 4-й канал: кинетические кривые амплификации всех образцов, участвующих в эксперименте. Положительный контроль — реакции амплификации. Выводы: по результатам анализа выявлены следующие мутации, определяющие устойчивость к рифампицину: в образцах 162, 163, 172, 295 — Ser—Leu TCG—TTG.

Надежный и достаточно эффективный метод секвенирования ампликонов [18], в том числе метод пиросеквенирования [15], является, однако, существенно, в несколько раз, более дорогим по сравнению с технологией ПЦР-РВ [17]. Технологии, основанные на гибридизации меченных биотином ампликонов с ДНК-зондами на стрипах [6, 8], как и метод гибридизации в формате биочипа, представляют собой серьезный источник внутрилабораторной контаминации. Эффективность методов в формате биочипа, по данным различных публикаций, противоречива. Основные источники указывают на высокую эффективность определения лекарственной устойчивости в образцах мокроты с положительными результатами исследования методом микроскопии мазка. А. Е. Поляков и соавт. [3], а также О. И. Скотникова и соавт. [4] указывают на 95% совпадение получаемых результатов обнаружения мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью и определением устойчивости традиционными методами, тогда как в работе В. А. Фирсовой и соавт. [5] отмечается лишь 50% совпадение результатов биочип-диагностики с традиционным определением лекарственной устойчивости.

Ж. Саоли и соавт. [9], используя модифицированный метод биочип-анализа, описывают при 100% специфичности 80% уровень чувствительности обнаружения лекарственной устойчивости. Объем исследований, проведенный методом микробиочипов, составил около 50—100 анализов. Более 1000 наших исследований с помощью ПЦР-РВ с использованием аллель-специфических флюорогенных зондов при сопоставлении с традиционным в России методом абсолютных концентраций продемонстрировали в среднем 94% совпадений определения устойчивости к изониазиду и рифампицину. Результаты анализа 100 штаммов, изученных методом пропорций и ПЦР-РВ, совпадали в 100% случаев с данными анализа устойчивости к рифампицину и в 99% — анализа устойчивости к изониазиду. Специфичность ПЦР-РВ составила 100%. Метод ПЦР-РВ отличается использованием закрытой системы анализа, предотвращающей внутрилабораторную контаминацию ампликонами ДНК [15]. Различные технологии ПЦР-РВ с флюорогенными ДНК-зондами (молекулярные биконы, зонды типа TaqMan и флюоресцентные зонды на основе резонансного переноса энергии) были использованы

Таблица 2

Число совпадающих результатов определения лекарственной устойчивости в региональных лабораториях и исследования аналогичных штаммов методом ПЦР-РВ

Регион	Число штаммов	Процент совпадения результатов по изониазиду	Процент совпадения результатов по рифампицину	Общий процент совпадений
Воронеж	96	95,7	93,5	94,6
Краснодар	148	90,9	91,6	91,2
Москва	87	95,4	93,1	94,2
Нижний Новгород	107	99,1	95,3	97,2
Ростов-на-Дону	100	93,0	92	93,7
Брянск	88	98,6	100	99,5
Псков	88	96,7	94,3	95,4
Калининград	102	88,4	99	93
Кемерово	100	95	91	93
Мурманск	91	98	94,5	96,1
Саратов	85	93	89,4	91,5
Всего...	1092	94,3	94	94,1

для определения единичных мутаций нуклеотидных последовательностей генов *groV* и *katG*, ответственных за чувствительность к рифампицину и изониазиду [12]. Результаты анализа определяли по смещению пиков температуры плавления 2-цепочечных ампликонов. При этом была изучена чувствительность обнаружения мутаций при исследовании смешанных аллелей ДНК (мутантной и чувствительной), которая была достаточной для определения мутаций при соотношении аллелей 1:14. В нашей работе при исследовании различных соотношений устойчивых и чувствительных клеток МБТ была показана возможность детекции 1% устойчивых МБТ в смешанной популяции.

Espasa и соавт. [11] при использовании в ПЦР-РВ 6 пар флюорогенных ДНК-зондов для анализа мутаций в 4 кодонах гена *groV* (513, 516, 526 и 531), 2 мишеней в кодоне 315 гена *katG* и замены С209Т регуляторного гена *inhA* была установлена чувствительность определения лекарственной устойчивости при концентрации суспензии МБТ $1,5 \cdot 10^3$ клеток в 1 мл, а при исследовании образцов мокроты — 30—35% образцов при отрицательном результате мазка и 95—99% при положительном результате мазка. Общая чувствительность определения имеющихся мутаций в анализируемых образцах составила 74,3%. Секвенирование 138 изолятов по генам *katG* и *inhA* в работе Van Doorn и соавт. [20] обеспечивало обнаружение 89,5% устойчивых к изониазиду штаммов.

При анализе обнаруживаемых мутаций в нашей работе выявлено очень большое преобладание (85,3%) мутаций в кодоне 531 гена *groV*, ответственного за устойчивость к рифампицину, а мутации гена *katG315* обнаруживались в 94,2% штаммов, устойчивых к изониазиду. Анализ устойчивости к изониазиду, проводившийся по генам *katG* и *inhA*, был, по нашим данным, достаточно эффективным.

По данным А. Е. Полякова и соавт. [3], при определении мутаций методом микробиочипов в 74,3% штаммов МБТ с МЛУ обнаруживались мутации в Ser531—Leu, а в 97,4% штаммов — *katG315*. Однако при изучении устойчивых к изониазиду штаммов МБТ в Нидерландах [12] лишь у 55% та-

ких изолятов была обнаружена мутация *katG315*. По данным Van Solingen и соавт. [21], мутации *katG315* обнаруживались в штаммах с высоким уровнем устойчивости к изониазиду. В наших исследованиях мутации *katG315* обнаруживались при устойчивости к 1 мкг/мл изониазида на среде Левенштейна—Йенсена, тогда как при концентрации 10 мкг/мл штаммы (20 изученных культур) с мутацией *katG315* были чувствительными. По материалам М. Ruiz и соавт. [19], штаммы, устойчивые только к 0,1 мкг/мл изониазида, были чувствительными при исследовании методом ПЦР-РВ. Мы полагаем, что в клинической практике критерий устойчивости к критической концентрации 1 мкг/мл является достаточным для принятия решения о замене препарата, назначаемого пациенту.

Выводы

1. Разработан новый молекулярно-генетический метод быстрого определения лекарственной устойчивости МБТ в клинических штаммах и образцах мокроты на основе мультиплексной аллель-специфической ПЦР-РВ; метод отличается относительной технологической простотой и по предварительным расчетам не превышает стоимость традиционного определения лекарственной чувствительности МБТ.

2. Совпадаемость результатов ПЦР-анализа и культурального микробиологического исследования 1092 клинических штаммов, анализированных в 11 региональных лабораториях, в среднем составила 94%; совпадаемость результатов повторного тестирования в независимой лаборатории случайно избранных 100 штаммов МБТ культуральным методом пропорций составила 99% для изониазида и 100% для рифампицина.

3. При анализе распространения лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду в 24 субъектах различных географических зон РФ установлен в среднем очень высокий уровень распространения штаммов МБТ с МЛУ среди впервые выявленных больных туберкулезом — 21,9%. Кроме того, у 13% больных этой группы установлены также лекарственная устойчивость к изониазиду. Моноустойчивость к рифампицину обнаружена лишь у 3,5% штаммов МБТ с лекарственной устойчивостью. В штаммах, полученных от больных, ранее леченных, либо от пациентов с хроническим течением туберкулеза, МЛУ установлена в 58,5% случаев, устойчивость только к изониазиду — в 19,8% случаев. Лишь в 2 территориях (Москва и Волгоград) уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов был относительно невысоким — 6,6 и 7,7% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балабанова Я. М., Рэдди М., Грэм К. и др. Анализ факторов риска возникновения лекарственной устойчивости у больных туберкулезом гражданского и пенитенциарного секторов в Самарской области // Пробл. туб. — 2005. — № 5. — С. 25—31.
2. Михайлович В. М., Лапа С. А., Грядунов Д. А. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТБ-микробиочипе для обнаружения рифампицин-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Бюл. экспер. биол. — 2001. — Т. 131, № 1. — С. 112—117.
3. Поляков А. Е., Сафонова С. Г., Скотникова О. И. Определение множественной лекарственной устойчивости *M. tuber-*

- culosis различными методами // Пробл. туб. — 2006. — № 6. — С. 40—42.
4. Скотникова О. И., Носова Е. Ю., Галкина К. Ю. Определение множественной лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* молекулярно-биологическими методами: Метод. рекомендации // Пробл. туб. — 2006. — № 7. — С. 57—60.
 5. Фирсова В. А., Полуэктова Ф. Г., Кузьмин А. В., Черноусова Л. Н. Роль метода биологических микрочипов в определении устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину у подростков с активным туберкулезом легких // Пробл. туб. — 2006. — № 8. — С. 28—30.
 6. Bang D., Bengard Andersen A., Thomsen V. O. Rapid genotypic detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44, N 7. — P. 2605—2608.
 7. Boom R., Sol C. A., Salimans M. M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. Clin. Microbiol.* — 1990. — Vol. 28. — P. 495—503.
 8. Brossier F., Veziris N., Truffot-Pernot C. et al. Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44, N 10. — P. 3659—3664.
 9. Caoili J. C., Mayorova A., Sikes D. et al. Evaluation of the TB-Biochip oligonucleotide microarray system for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44, N 7. — P. 2378—2381.
 10. Espasa, González-Martín Julián, Alcaide Fernando et al. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2005. — Vol. 55, N 6. — P. 860—865.
 11. Garcia de Viedma D., del Sol Diaz Infantes M., Lasala F. et al. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 988—995.
 12. Herrera-León Laura, Molina Tamara, Saiz Pilar et al. New Multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2005. — Vol. 49, N 1. — P. 144—147.
 13. Jureen P., Engstrand L., Eriksson S. et al. Rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by Pyrosequencing technology // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44, N 6. — P. 1925—1929.
 14. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A. et al. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 22. — P. 342—348.
 15. Parashar D., Chauhan D. S., Sharma V. D., Katoch V. M. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research // *Indian J. Med. Res.* — 2006. — Vol. 124. — P. 385—398.
 16. Ramaswamy S., Musser J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update // *Tuberc. Lung Dis.* — 1998. — Vol. 79, N 1. — P. 23—29.
 17. Ruiz M., Torres M. J., Llanos A. C. et al. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — Vol. 42. — N 4. — P. 1585—1589.
 18. Augustynowicz-Kope Ewa, Sekiguchi Jun-ichiro, Miyoshi-Akiyama Tohru et al. Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45, N 1. — P. 179—192.
 19. Torres M. J., Criado A., Palomares J. C., Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38. — P. 3194—3199.
 20. van Doorn H. R., de Haas P. E., Kremer K. et al. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of katG: a decade of experience in The Netherlands // *Clin. Microbiol. Infect.* — 2006. — Vol. 12, N 8. — P. 769—775.
 21. *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2007. — Vol. 45, N 1. — P. 179—192.
 22. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report N 3. (WHO/CTS/TB/2004). — Geneva, 2004.
 23. Yesilkaya Hasan, Meacci Francesca, Niemann Stefan et al. Evaluation of molecular-beacon, TaqMan, and fluorescence resonance energy transfer probes for detection of antibiotic resistance-conferring single nucleotide polymorphisms in mixed *Mycobacterium tuberculosis* DNA extracts // *J. Clin. Microbiol.* — 2006. — Vol. 44, N 10. — P. 3826—3829.

Поступила 28.09.07

РЕЗЮМЕ

М. А. Владимирский, Ю. С. Аляпкина, Д. А. Варламов, Я. И. Алексеев, Л. К. Шипина, М. В. Шульгина, Л. В. Домотенко, К. Р. Быкадорова, Н. Н. Гащенко, Л. Б. Ендурова, О. В. Иванова, Е. А. Ильина, О. А. Левкова, Т. В. Маркова, В. П. Наземцева, Е. П. Павлова, А. И. Полозов, Н. В. Шишкина. — ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И КОНТРОЛЯ ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

С помощью технологии ПЦР-РВ разработан одностадийный метод молекулярно-генетического анализа ДНК МБТ для определения мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам: изониазиду и рифампицину. С целью анализа распространенности лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в России проведено исследование 2000 штаммов МБТ в 24 регионах из всех федеральных округов. При исследовании 1406 штаммов МБТ, выделяемых впервые диагностированными, нелечеными пациентами, МЛУ выявлена в 21,9% случаев. У ранее лечившихся больных туберкулезом МЛУ констатирована в 58,5% случаев. Совпадаемость молекулярно-генетического анализа лекарственной устойчивости с результатами культуральных исследований при анализе 1096 штаммов составила 94%.

М. А. Vladimirsky, Yu. S. Alyapkina, D. A. Varlamov, Ya. I. Alekseyev, L. K. Shipina, M. V. Shulgina, L. V. Domotenko, K. R. Bykadorova, N. N. Gashchenko, L. B. Yendourova, O. V. Ivanova, Ye. A. Ilyina, O. A. Levkova, T. V. Markova, V. P. Nazemtseva, Ye. P. Pavlova, A. I. Polozov, N. V. Shishkina. — USE OF REAL-TIME

POLYMERASE CHAIN REACTION TO DETERMINE AND CONTROL DRUG-RESISTANT MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS

Real-time polymerase chain reaction was used to develop a one-stage procedure for molecular genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) DNA in order to determine mutations associated with drug resistance to the antituberculous agents: isoniazid and rifampicin.

To analyze the spread of drug-resistance of the causative agent of tuberculosis in Russia, two thousand MBT strains were studied in 24 regions of all the federal districts. Testing 1406 MBT strains isolated by first detected and untreated patients revealed multidrug resistance (MDR) in 21.9% of cases. MRD was detected in 58.5% of the previously treated patients with MDR. The agreement of molecular genetic analysis of drug resistance with the results of cultural tests of 1096 strains was 94%.