

ГИДРОГЕЛЕВЫЙ БИОЧИП ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТУБЕРКУЛЕЗА С МНОЖЕСТВЕННОЙ И ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ*

КУЛАГИНА Е. В.¹, ЗИМЕНКОВ Д. В.¹, ЖУРАВЛЕВ В. Ю.², ГРЯДУНОВ Д. А.¹

HYDROGEL BIOCHIPS FOR MOLECULAR GENETIC PROFILING OF TUBERCULOUS MYCOBACTERIA WITH MULTIPLE AND EXTENSIVE DRUG RESISTANCE

KULAGINA E. V.¹, ZIMENKOV D. V.¹, ZHURAVLEV V. YU.², GRYADUNOV D. A.¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта», г. Москва

²ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ, г. Санкт-Петербург

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, RF

²St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, RF

В последние годы наблюдается неуклонное распространение штаммов возбудителя туберкулеза, характеризующихся множественной и широкой лекарственной устойчивостью (МЛУ/ШЛУ). Существующие отечественные и зарубежные диагностические тесты определяют устойчивость возбудителя только к отдельным препаратам первого и второго рядов, не позволяя выявлять высоковирулентные ШЛУ-штаммы, что затрудняет назначение рациональной терапии. Быстрое и достоверное установление молекулярных детерминант, отвечающих за возникновение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) к широкому спектру противотуберкулезных препаратов, а также исследование структуры популяции циркулирующих штаммов возбудителя являются чрезвычайно актуальными для практического здравоохранения и эпидемиологического мониторинга.

Цель: разработка и апробация метода идентификации возбудителя туберкулеза с одновременным установлением его генотипа и определением генетических детерминант МЛУ и ШЛУ.

Материалы и методы. Ключевым компонентом разрабатываемого метода является гидрогелевый олигонуклеотидный биочип, содержащий иммобилизованные зонды, последовательности которых специфичны к фрагменту инсерционного элемента IS6110, характерного для микобактерий туберкулезного комплекса, однонуклеотидным полиморфизмам, устанавливающим принадлежность возбудителя туберкулеза к эндемичным для территории РФ семействам *Beijing*, *Haarlem*, *LAM*, *Ural*, характеризующихся различной патогенностью, а также мутантным вариантам генов *rpoB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *eis*, *embB*, являющихся маркерами лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза. Процедура анализа включает одностадийную мультиплексную

амплификацию и флюоресцентное мечение исследуемых фрагментов микобактериального генома с последующей гибридизацией ПЦР-продуктов на биочипе. Регистрация и интерпретация результатов гибридизации на биочипе проводятся в автоматическом режиме с использованием специализированного анализатора биочипов и программного обеспечения.

Разработанный метод апробирован в Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии. Референсные данные фенотипической устойчивости штаммов возбудителя туберкулеза к широкому спектру противотуберкулезных препаратов были получены с использованием автоматической системы Bactec MGIT 960.

Результаты. Разработаны метод и диагностический набор реагентов «ТБ-тест» на его основе, позволяющие в течение 24 ч обнаруживать ДНК возбудителя туберкулеза в клиническом образце, проводить его генотипирование и выявлять 128 детерминант устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, амикацину, канамицину, капреомицину и этамбутолу. Диагностические характеристики метода в сравнении с референсным определением лекарственной устойчивости приведены в таблице. Следует отметить, что введение в систему анализа локусов *gyrB* и *eis*, отвечающих за возникновение устойчивости, соответственно, к фторхинолонам и аминогликозидам, значительно повысило чувствительность системы по определению ШЛУ-штаммов по сравнению с существующими тестами.

Проводимое наряду с определением лекарственной устойчивости генотипирование позволяет описать мутационный профиль семейств *Beijing*, *LAM* и *Ural*, наиболее распространенных на территории РФ. Исследование коллекции СПБ НИИФ показало доминирование генотипа *Beijing* (71%), в мень-

* Исследование выполнено за счет Российского научного фонда (проект № 14-50-00060).

шей степени представлены генотипы *LAM* (14%) и *Ural* (5,8%). Из всех штаммов, принадлежащих к генотипу *Beijing*, 35% составил кластер B0/W148. Доля образцов, относившихся к *Beijing*-генотипу и имевшая МЛУ/ШЛУ-фенотип, составила 73,5%. Также все образцы (100%) в исследуемой выборке, идентифицированные как B0/W148-генотип, имели МЛУ и ШЛУ, что подтверждает клиническую значимость выявления данного семейства. Для остальных генотипов подобные закономерности не выявлены.

Заключение. Разработанный метод и набор реагентов «ТБ-ТЕСТ» на его основе в короткие сроки позволяют проводить комплексный анализ генома возбудителя туберкулеза, выявляя детерминанты МЛУ и ШЛУ и устанавливая эндемичные для РФ и клинические значимые генотипы возбудителя туберкулеза. Примененный формат «один образец – одна пробирка – один биочип» является оптимальным для одновременного многопараметрического анализа десятков и сотен образцов клинического материала.

Таблица

Диагностические характеристики набора «ТБ-тест», полученные по результатам анализа коллекции СПб НИИФ (суммарное число штаммов в исследовании составило 222)

Противотуберкулезный препарат	Чувствительность, %	Специфичность, %
Рифампицин	97	97
Изониазид	97	92
Фторхинолоны	86 (<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>) 80 (<i>gyrA</i>)	94 (<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>) 94 (<i>gyrA</i>)
Канамицин, капреомицин, амикацин	93	95
	82	90
	82	90
Этамбутол	88	60

ДИАГНОСТИКА И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО И НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО СПОНДИЛИТА У БОЛЬНЫХ СТАРШИХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

ЛАВРОВ В. Н.

DIAGNOSTICS AND EFFICIENCY OF SURGERY TREATMENT OF TUBERCULOUS AND NON-SPECIFIC SPONDYLITIS IN THE ELDER PATIENTS

LAVROV V. N.

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», г. Москва

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, RF

Лечение туберкулезных и неспецифических спондилитов у больных старших возрастных групп до настоящего времени актуально, так как заболевание в 75-85% случаев сопровождается сопутствующими заболеваниями, часто ограничивающими возможности проведения оперативного лечения.

Цель: повышение эффективности диагностики и качества хирургического лечения туберкулезного и неспецифического спондилита у больных старших возрастных групп.

Материалы и методы. Проведен анализ данных 224 больных, оперированных по поводу спондилита

с 1994 по 2011 г. Возраст – от 55 до 72 лет, мужчины преобладали – 139 (57,0%), женщины – 105 (43,0%) человек. Из них туберкулезная этиология спондилита – у 159 (65,2%) пациентов, неспецифическая – у 85 (34,8%). Срок установления диагноза от начала заболевания составил от 3 до 8 мес. Неврологическая симптоматика выявлена у 83 (37,0%) пациентов, параличи и парезы – у 32 (14,3%).

После клинического и лучевых методов обследования (рентгенография, КТ, МРТ) деструкция тел позвонков установлена: ограниченная контактная деструкция – у 49 (20,1%), очаговая с разрушением