

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ И АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ НА ГИДРОГЕЛЕВЫХ БИОЧИПАХ*

ЗИМЕНКОВ Д. В.¹, КУЛАГИНА Е. В.¹, АНТОНОВА О. В.¹, КРАСНОВА М. А.², ЖУРАВЛЕВ В. Ю.⁴, КУЗЬМИНА А. В.³,
ПОПОВ С. А.³, ЗАСЕДАТЕЛЕВ А. С.¹, ГРЯДУНОВ Д. А.¹

IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF TUBERCULOUS AND ATYPICAL MYCOBACTERIA USING HYDROGEL BIOCHIPS*

ZIMENKOV D. V.¹, KULAGINA E. V.¹, ANTONOVA O. V.¹, KRASNOVA M. A.², ZHURAVLEV V. YU.⁴, KUZMINA A. V.³,
POPOV S. A.³, ZASEDATELEV A. S.¹, GRYADUNOV D. A.¹

¹ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва

²ГКУЗ «Московский городской НПЦ борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», г. Москва

³НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова», г. Москва

⁴ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ, г. Санкт-Петербург

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

²Moscow Municipal Scientific Practical Center of Tuberculosis Control, Health Department of Moscow, Moscow, RF

³Research Institute of Phthiopulmonology by I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, RF

⁴St. Petersburg Research Institute of Phthiopulmonology, St. Petersburg, RF

Род *Mycobacterium* состоит из нескольких групп кислотоустойчивых микобактерий, среди которых встречаются патогенные для человека и животных. Кроме безусловных патогенов человека, таких как *Mycobacterium tuberculosis complex* (МТБЦ) и *M. leprae*, существует целый ряд условно-патогенных микобактерий, которые могут вызывать микобактериозы. Основными факторами риска в отношении микобактериозов являются иммунодефицитный статус и хроническая обструктивная болезнь легких. Так как для туберкулеза и микобактериозов характерна сходная клиническая картина, то основной задачей для диагностической лаборатории является определение микробиологического вида возбудителя для назначения больному адекватной химиотерапии. Классически микробиологические и биохимические методы идентификации микобактерий являются трудоемкими и занимают продолжительное время, при этом результаты тестов могут отличаться для различных изолятов микобактерий одного вида и, напротив, быть схожими для разных видов, что затрудняет корректное определение.

Цель: разработка молекулярно-генетического метода видовой идентификации микобактерий и его масштабная апробация на коллекциях клинических образцов и изолятов.

Материалы и методы. При выборе мишени для видовой идентификации микобактерий руководствовались данными о высокой изменчивости последовательности гена *gyrB*. Для каждого вида было разработано по три уникальных видоспецифичных зонда, комплементарных последовательности гена *gyrB* и обеспечивающих высокую надежность видовой идентификации микроорганизмов. Процедура анализа включала стадию асимметрич-

ной амплификации фрагмента гена *gyrB* с его одновременным флюоресцентным маркированием и последующую гибридизацию ПЦР-продуктов на биочипе с иммобилизованными в ячейках видоспецифичными зондами. Используя универсальный аппаратно-программный комплекс для анализа биочипов, регистрировали распределение флюоресцентных сигналов ячеек в виде гибридизационного профиля. Интерпретацию результатов проводили в автоматическом режиме посредством математического сравнения зарегистрированного профиля с эталонными профилями, полученными в результате гибридизационного анализа фрагментов с известной последовательностью гена *gyrB* и интегрированными в виде специализированной базы данных в программное обеспечение. В качестве критерия сравнения использовали коэффициент линейной корреляции Пирсона, позволяющий сопоставить анализируемый гибридизационный профиль с определенным видом микобактерий.

Метод был протестирован на коллекции ДНК туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий от пациентов МНПЦБТ, а затем апробирован в Институтах фтизиопульмонологии Москвы и Санкт-Петербурга. Общее число образцов составило 543 изолята.

Результаты. Разработан метод идентификации микобактерий с использованием гибридизации на специализированном гидрогелевом биочипе, содержащем зонды, специфичные к фрагментам гена *gyrB*.

Итоговый список видов микобактерий, определяемых с помощью описанной тест-системы, включает 35 видов, 27 из которых были обнаружены в клинических образцах: МТБС (not *M. bovis*), *M. bovis*, *M. intracellulare*, *M. avium ssp.*, *M. mantonii*, *M. intracellulare/M. colombiense*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. xenopii*,

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

M. kumamotonense, *M. senuense*, *M. lentiflavum*, *M. interjectum*, *M. intermedium*, *M. mageritense*, *M. neoaurum*, *M. fortuitum*, *M. septicum*/*M. peregrinum*, *M. houstonense*, *M. iranica*, *M. mucogenicum*, *M. duvalii*, *M. flavescent*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. chelonae*, *M. abscessus*. Способность детектировать еще 8 видов (*M. marinum*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. gastri*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgae*, *M. malmoense*, *M. asiaticum*, *M. simiae*) была проверена на синтетических фрагментах на основе последовательностей, депонированных в GenBank.

По результатам анализа трех коллекций Центрального и Северо-западного регионов РФ наиболее часто встречаемыми являлись микобактерии МАС комплекса (39%), *M. fortuitum* group (17%) и *M. xenopi* (13%). Значения чувствительности и специфичности разработанного метода составили 99,8 и 100% соответственно при использовании секвенирования генов *gyrB* и рибосомальной РНК в качестве референса. При анализе клинического материала чувствительность метода составила 89-95% для образцов с положительной и 36% для образцов с отрицательной бактериоскопией.

К преимуществам разработанного подхода, помимо большого числа детектируемых видов и высокой чувствительности, следует отнести возможность идентификации видов, не заложенных в дизайн биочипа на стадии проектирования, за счет использования алгоритма распознавания гибридных профилей и обновляемой базы данных программного обеспечения УАПК.

Заключение. Биочипы на основе гидрогеля успешно применяются во многих лабораториях учреждений противотуберкулезной службы РФ для анализа устойчивости туберкулеза к рифампицину/изониазиду и фторхинолонам и генотипирования микобактерий туберкулезного комплекса. Поскольку процедура видовой идентификации микобактерий аналогична и выполняется с использованием того же самого оборудования, описанный метод является хорошим дополнением к разработанному ранее. Совокупность молекулярно-генетических тест-систем позволит проводить комплексный анализ материала, поступающего от больных, в рамках единой диагностической платформы биочипов в условиях клинической лаборатории.

ЛИЧНОСТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ ПОДРОСТКОВ С НАЛИЧИЕМ БАКТЕРИОВЫДЕЛЕНИЯ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ

ЗОЛотова Н. В., АХТЯМОВА А. А., СТРЕЛЦОВ В. В., БАРАНОВА Г. В.

PERSONAL CHARACTERISTICS OF ADOLESCENTS SUFFERING FROM RESPIRATORY TUBERCULOSIS WITH BACILLARY EXCRETION AND DRUG RESISTANCE

ZOLOTOVA N. V., AKHTYAMOVA A. A., STRELTSOV V. V., BARANOVA G. V.

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», г. Москва

Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, RF

Разработка комплексного, учитывающего психологические аспекты, подхода к терапии туберкулеза органов дыхания (ТОД) включает в себя изучение индивидуально-психологических коррелятов данного заболевания.

Цель: сравнительная оценка личностных характеристик больных ТОД подростков с наличием бактериовыделения и лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ).

Материалы и методы. Сравнительная оценка личностных характеристик проводилась у 100 пациентов с различными формами ТОД, поступивших на стационарное лечение в подростковое отделение Центрального НИИ туберкулеза. Из 100 больных у 42 МБТ определялись методом бактериоскопии и/или посева мокроты. У 6 пациентов МБТ выявлены при исследовании операционного материала.

Данные о лекарственной чувствительности МБТ получены у 44 из 48 (91,7%) больных. По данным тестов на лекарственную чувствительность МБТ, чувствительность МБТ к противотуберкулезным препаратам была сохранена у 12 (27%) подростков. Устойчивость МБТ определялась у 32 (73%) подростков, в том числе: к одному препарату – у 3 (7%), полирезистентность – у 5 (11%), множественная и широкая лекарственная устойчивость (МЛУ и ШЛУ) – у 22 (50%) и 2 (5%) пациентов соответственно.

В исследовании использовали следующие психологические методики: личностный опросник Р. Кеттелла (форма НСРQ), методику интерперсональных отношений Т. Лири, шкалу стресса Холмса – Рэя, Торонтскую алекситимическую шкалу. Психологическую диагностику проводили до на-