МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
МОФ
МОСКОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ФТИЗИАТРОВ

Туберкулёз
и социально значимые заболевания

ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№2_2013

Научно-практический журнал

№2_2013

Туберкулёз и социально значимые заболевания

Номер свидетельства
ПИ № ФС 77 – 54449 от 17.06.2013

Адрес редакции:
МОО «Московское общество фтизиатров»
107014, г. Москва,
ул. Стромынка, д. 10

Главный редактор
Богородская Е.М.

Ответственный секретарь
Слогоцкая Л.В.

Зав. редакцией
Дудина А.Г.
Тел. +7 (916) 972 3776
E-mail: mostubjournal@mail.ru

Ответственный за выпуск
Литвинов В.И.

Оригинал-макет и компьютерная верстка –
ООО «Ин Тренд»

Служба рекламы и подписки
Тел. +7 (925) 183-46-48
E-mail: tubmagazine@gmail.com

Журнал предназначен для специалистов в области медицинской и фармацевтической деятельности.

Языки: русский, английский

Издатель – ООО «Ин Тренд»
Адрес: 105082, г. Москва,
ул. Большая Почтовая, д. 26В, стр. 1

Отпечатано в типографии
ООО «Лига-Принт»
Тираж 3000 экз.

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Все права защищены.
Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера, либо воспроизведена любым способом, без предварительного письменного разрешения издателя.

Редакционная коллегия:

Главный редактор – **Богородская Е.М.**, *д.м.н., директор ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом ДЗ г. Москвы», главный внештатный специалист фтизиатр ДЗ г. Москвы*

Аксенова В.А. – *д.м.н., профессор, заведующая отделом туберкулёза у детей и подростков НИИ фтизиопульмнологии ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова», главный внештатный специалист фтизиопедиатр Минздрава России*

Борисов С.Е. *(зам. главного редактора) – д.м.н., профессор, заместитель директора по научно-клинической работе ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом ДЗ г. Москвы»*

Белевский А.С. – *д.м.н., профессор, профессор кафедры пульмонологии факультета усовершенствования врачей ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России», главный внештатный пульмонолог ДЗ г. Москвы*

Брюн Е.А. – *д.м.н., профессор, директор ГКУЗ «Московский научно-практический центр наркологии ДЗ г. Москвы», главный внештатный специалист нарколог ДЗ г. Москвы, главный нарколог Минздрава России*

Зубань О.Н. – *д.м.н., профессор, зам. главного врача по медицинской части ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом ДЗ г. Москвы»*

Литвинов В.И. – *академик РАМН, д.м.н., профессор, научный руководитель ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом ДЗ г. Москвы»*

Мазус А.И. – *д.м.н., руководитель «Московского городского центра профилактики и борьбы со СПИДом», главный внештатный специалист по проблемам диагностики и лечения ВИЧ-инфекции Минздрава России, главный внештатный специалист по проблемам диагностики и лечения ВИЧ-инфекции ДЗ г. Москвы*

Малышев Н.А. – *д.м.н., профессор, главный врач ГКУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 ДЗ г. Москвы», главный внештатный специалист по инфекционным болезням ДЗ г. Москвы*

Плавунов Н. Ф. – *д.м.н., профессор,* первый заместитель руководителя *ДЗ г. Москвы*

Потекаев Н.Н. – *д.м.н., профессор, директор ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии ДЗ г. Москвы», главный внештатный специалист дерматовенеролог и косметолог ДЗ г. Москвы, заведующий кафедрой кожных болезней и косметологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова*

Пучков К.Г. – *д.м.н., профессор, главный врач ГКУЗ «Детский туберкулёзный санаторий №64 ДЗ г. Москвы»*

Севостьянова Т.А. – *кандидат мед.наук, зав. детским консультационно-диагностическим отделением ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом ДЗ г. Москвы», заместитель главного внештатного специалиста фтизиатра по педиатрии ДЗ г. Москвы*

Сельцовский П.П. – *д.м.н., профессор, зам. директора по научной и организационно-методической работе ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом ДЗ г. Москвы», зав. кафедрой фтизиатрии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования»*

Слогоцкая Л.В. *(ответственный секретарь) – д.м.н., заведующая научно-клиническим отделом, ученый секретарь ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом ДЗ г. Москвы»*

Научные редакторы:
Борисов С.Е., Пучков К.Г.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕДАКЦИОННАЯ СТАТЬЯ

3 *Е.М. Богородская,*
4 *В.И. Литвинов*

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЁЗА: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

5 Филогенетический анализ клинических изолятов Mycobacterium tuberculosis с использованием 35 вариабельных тандемных повторов и шести однонуклеотидных полиморфизмов
А.Г. Богун, С.А. Благодатских, Т.Н. Мухина, Н.В. Майская, И.Г. Шемякин

12 Генотипирование уральских изолятов Mycobacterium tuberculosis
Т.В. Умпелева, А.А. Вязовая, М.А. Кравченко, Н.И. Еремеева, О.В. Нарвская

ПАТОГЕНЕЗ ТУБЕРКУЛЁЗА

16 Продукция прокальцитонина и некоторых провоспалительных цитокинов при тяжелой туберкулёзной инфекции у детей и подростков
М.М. Авербах, Л.В. Панова, М.Ф. Губкина, Е.С. Овсянкина

20 Признаки диффузного альвеолярного повреждения при высоких показателях синдрома системного воспалительного ответа у больных лекарственно-устойчивым туберкулёзом легких
Л.Н. Лепеха, О.Г. Комиссарова, Р.Ю. Абдуллаев, В.В. Ерохин

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВО ФТИЗИОПУЛЬМОНОЛОГИИ

25 Сравнение картриджной технологии XPERT MTB/RIF с микробиологическими методами выявления микобактерий туберкулёза и определения лекарственной чувствительности
С.Н. Андреевская, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, М.В. Буракова, И.А. Васильева, Л.Н. Черноусова

30 Определение лекарственной чувствительности микобактерий с помощью тест-системы «Sensititre»
М.В. Макарова, Ю.Д. Исаева, Е.Н. Хачатурьянц, В.И. Литвинов

35 Чувствительность к противогрибковым препаратам клинических штаммов грибов рода Candida, выделенных от больных туберкулёзом легких
А.Б. Кулько

39 Мониторинг оппортунистической микрофлоры при вторичных инфекциях органов дыхания у больных туберкулёзом лёгких и динамика устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов Streptococcus gr. viridans
Л В. Ивушкина

45 Сравнительное исследование результатов кожного теста с аллергеном туберкулёзным рекомбинантным и лабораторного теста QUANTIFERON–GIT у детей и подростков с туберкулёзной инфекцией
Л.В. Слогоцкая, Д.А. Иванова, О.Ю. Сенчихина, М.В. Макарова, О.И. Алещенкова, Н.В. Куликовская, Т.В. Ванеева

52 Стабильность специфической активности и специфичности диагностического препарата Диаскинтест® при хранении в стресс-условиях
И.В. Бочарова, К.Б. Майоров, О.В. Демихова, Д.А. Кудлай

В ПОМОЩЬ ФТИЗИАТРУ

56 Молекулярные механизмы развития широкой лекарственной устойчивости и методы ее определения у M.tuberculosis.
Е.Ю. Носова, М.Б. Гикало, А.А. Хахалина, К.Ю.Галкина, С.Г. Сафонова

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

61 Генетический контроль латентной туберкулёзной инфекции
Т.К. Кондратьева, Т.Л. Ажикина, М.О. Шлеева, А.С. Капрельянц, А.С. Апт

68 Роль генетического полиморфизма белков сурфактанта в патобиологии туберкулёзной инфекции
В.В. Еремеев, Л.Е. Поспелов, А.Л. Поспелов, С.Ю. Кордичева

КОНФЕРЕНЦИИ

72 Материалы городской научно-практической конференции с международным участием «Итоги реорганизации противотуберкулёзных учреждений в городе Москве»

87 Информация о Московском обществе фтизиатров (МОФ)

88 Заявление о вступлении в МОФ

Редакционный совет:

Елькин А.В. – *д.м.н., профессор, зав. кафедрой фтизиопульмонологии и торакальной хирургии ФГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова»*

Кравченко А.Ф. – *д.м.н., профессор, директор ГБУ Научно-практический центр «Фтизиатрия» Минздрава Республики Саха (Якутия)*

Малиев Б.М. – *д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «Республиканский противотуберкулёзный диспансер» Минздрава Республики Северная Осетия-Алания, главный фтизиатр Минздрава Республики Северная Осетия-Алания*

Малыхина Т.И. – *кандидат мед.наук, главный врач ОГКУЗ «Противотуберкулёзный диспансер» г. Белгород*

Морозова Т.И. – *д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «Саратовский областной противотуберкулёзный диспансер», зав. кафедрой фтизиатрии ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», главный внештатный фтизиатр Приволжского федерального округа*

Скорняков С.Н. – *д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России»*

Шилова М.В. – *д.м.н., профессор, главный научный сотрудник НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»*

С Новым Годом!

Пришел декабрь 2013 года, который наконец принес в родной московский мегаполис снег и метель.

Наступило время подводить итоги и озвучивать планы на следующий год.

Завершающийся год войдет в историю московской фтизиатрии как период качественных изменений и масштабных преобразований в организации противотуберкулёзной помощи на территории города Москвы.

Нам удалось практически безболезненно завершить реорганизацию 17 противотуберкулёзных диспансеров и больниц, наладить бесперебойную работу самого большого противотуберкулёзного учреждения страны, обследующего 8% населения Российской Федерации. Фтизиопедиатры завершили реорганизацию детских туберкулёзных санаториев.

В 2013 году была зарегистрирована Межрегиональная общественная организация «Московское общество фтизиатров», которая в настоящее время объединяет более 300 специалистов из 10 регионов страны. Вышел в свет первый номер нового научно-практического журнала «Туберкулёз и социально значимые заболевания». Созданы сайты Московского общества фтизиатров и Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулёзом. Проведена городская конференция с международным участием, на которую собрались более 800 специалистов из 49 субъектов Российской Федерации. Стали привычными и ожидаемыми еженедельные медицинские советы для всех фтизиатров города.

Все это удалось сделать благодаря политической поддержке Департамента здравоохранения города Москвы и ежедневной кропотливой работе единой команды профессионалов: организаторов здравоохранения, фтизиатров, хирургов, терапевтов, экономистов, юристов, бухгалтеров, инженеров, программистов, психологов и других специалистов.

В 2014 году продолжатся плановые изменения. В условиях высокой миграционной нагрузки нам предстоит усилить работу в очагах туберкулёзной инфекции, проводить плановые профилактические мероприятия с фактическим выходом фтизиатра в места скопления лиц из групп риска. Эта работа началась в 2013 году, когда были организованы передвижные кабинеты фтизиатра, позволяющие обследовать на туберкулёз лиц БОМЖ на двух дезстанциях и в Центре социальной адаптации Департамента социальной защиты населения города Москвы. С 1 января 2014 года будет открыт кабинет раннего выявления туберкулёза на базе Центра СПИД. Эту работу надо продолжить, не дожидаясь того, когда пациент приедет в противотуберкулёзный диспансер. Сегодня фтизиатру необходимо самому выходить в поликлиники и больницы и заниматься профилактикой, санитарно–просветительской работой, диагностикой и дифференциальной диагностикой, сокращая контакты больного туберкулёзом с населением.

Особое внимание всем необходимо обратить на такую, на первый взгляд, благополучную группу риска как студенты 1-го курса высших и средних профессиональных учебных заведений. С учетом того, что среди студентов много приезжих из других субъектов Российской Федерации и стран ближнего зарубежья, где эпидемическая ситуация по туберкулёзу менее благоприятная, чем в городе Москве, а также с учетом определенного стрессового фактора, связанного со сменой места и условий жизни, среди этой группы лиц необходимо проводить плановые флюорографические осмотры, обследования с помощью пробы Манту и пробы с Диаскинтестом.

От имени редакции журнала и как президент Московского общества фтизиатров я желаю здоровья и благополучия в Новом 2014 году всем сотрудникам противотуберкулёзных учреждений города Москвы, нашим коллегам из федеральных и региональных учреждений, всем медицинским работникам, ежедневно выходящим на передовой рубеж борьбы с туберкулёзом, ВИЧ-инфекцией, гепатитом, ИППП и другими социально значимыми заболеваниями.

Главный редактор
Богородская Е.М.

Уважаемые читатели!

Безусловно, главные проблемы туберкулеза – эпидемиологические, это контакты с больными, определяющие распространенность и интенсивность инфицирования населения, условия жизни и т.д. На втором месте – лечение, которое получило огромный импульс после появления стрептомицина, внедрения изониазида, а затем рифампицина. В настоящее время основное внимание уделяют проблемам переносимости терапии и привлечения больных к лечению, формированию новых режимов химиотерапии. Но все-таки, благодаря Роберту Коху, мы знаем, что у туберкулеза есть возбудитель, а ведь многим другим болезням (опухолям, аутоиммунной патологии) повезло меньше. А раз есть возбудитель – его надо обнаружить и охарактеризовать. Для этого существуют лабораторные методы, которые постоянно развиваются и совершенствуются, несмотря на то, что клиницисты-фтизиатры до сих пор во многих случаях «узнают» туберкулез только по клинико-рентгенологическим признакам.

Вместе с тем, микобактериологическая диагностика не всегда проста. «Классические» методы – во многих случаях не дают информации (бактериоскопия) или позволяют получить ее тогда, когда лечение (часто неэффективное) уже начато. Ситуацию осложняет все большее распространение нетуберкулезных микобактерий, которые вызывают патологию, сходную с туберкулезом – микобактериозы. Хотя сами больные микобактериозами, скорее всего, не заразны, они могут заразиться туберкулезом, попав в общую палату, да и лечение таких больных отличается от лечения туберкулеза.

Сегодня методы обнаружения микобактерий и определения их вида в значительной мере усовершенствованы. Так, плотные среды заменены на жидкие, сам процесс культивирования стандартизован и автоматизирован, сроки культивирования сократились в два-три раза. Разработаны молекулярно-генетические методы, которые позволяют (правда не всегда – имеется предел чувствительности) определять ДНК M. tuberculosis в течение 1-2 суток, даже в биологическом материале (чаще всего в мокроте) без выращивания культур. Такие методы разработаны и для определения вида микобактерий.

Существенный прогресс произошел и в изучении лекарственной чувствительности микобактерий. Для этих целей также разработаны ускоренные бактериологические и молекулярно-генетические методы.

В последние годы имеются некоторые успехи и в иммунологических исследованиях, которые чаще всего не «напрямую» определяют микобактерии или их компоненты, а оценивают реакцию на них иммунной системы. В первую очередь, это связано с полной расшифровкой генома M. tuberculosis и получением рекомбинантных белков, имеющихся у этого вида и отсутствующих у M. bovis BCG и у большинства нетуберкулезных микобактерий. На основе этих белков, в частности, были созданы коммерческие тесты, оценивающие продукцию интерферона-γ. Эти тесты используют для ранней диагностики туберкулеза и выявления так называемой «латентной» инфекции. Определенный прогресс имеется и в изучении механизмов противотуберкулезного иммунитета.

Российские ученые успешно занимаются всеми вышеуказанными проблемами – именно им посвящены статьи, опубликованные в этом номере журнала.

В.И.Литвинов,
Научный руководитель ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»,
доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН

УДК 579.25-871.9:

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 35 ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ И ШЕСТИ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

А.Г. Богун, С.А. Благодатских, Т.Н. Мухина, Н.В. Майская, И.Г. Шемякин
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, г. Оболенск

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CLINICAL ISOLATES USING 35 VARIABILITY TANDEM REPEATS AND SIX SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS

A.G. Bogun, S.A. Blagodatskikh, T.N. Mukhina, N.V. Maiskaya, I.G. Shemyakin

Клинические изоляты M. tuberculosis (n 330) исследованы методами MIRU-VNTR, основанном на анализе 35 локусов, и анализе точечных мутаций. Показано, что каждая ветвь дендрограммы молекулярно-генетического родства клинических изолятов M. tuberculosis содержит изоляты, относящиеся только к одной кластерной группе, определённой на основании анализа точечных мутаций. Все изоляты M. tuberculosis, относящиеся к сполигосемейству Beijing, входят в состав одной ветви дендрограммы. Изоляты из других сполигосемейств в данной группе отсутствуют. Изоляты, принадлежащие к сполигосемейству LAM, входят в состав одной ветви дендрограммы, в которую входят также изоляты, принадлежащие к сполигосемействам T и S. Изоляты, принадлежащие к сполигосемействам T и Haarlem, входят в состав нескольких ветвей дендрограммы, причем изоляты из сполигосемейства T принадлежат к трём SNP группам, в то время как изоляты Haarlem принадлежат только к одной группе, идентифицированным на основании анализа точечных мутаций.

Ключевые слова: *туберкулез, филогенетический анализ, SNP-типирование, метод MIRU-VNTR*

Clinical isolates of M. tuberculosis (n 330) were studied using MIRU-VNTR methods, based on the analysis of 35 loci and analysis of point mutations. It is shown that each branch of the dendrogram of the molecular genetic relatedness of M. tuberculosis clinical isolates contains isolates relating to the only one cluster group, defined by the point mutations analysis. All isolates of M. tuberculosis, relating to Beijing spoligofamily are in the same branch of the dendrogram. Isolates from the other spoligofamilies are missing in the group. Isolates, belonging to LAM spoligofamily, are in the same branch of the dendrogram, which also includes isolates, belonging to T and S spoligofamilies. Isolates from T and Haarlem spoligo families comprise into several branches of the dendrogram, and T spoligofamily isolates belong to three SNP groups, while Haarlem isolates belong to the only one group, identified on the basis of point mutations analysis.

Keywords: *tuberculosis, phylogenetic analysis, SNP-typing, MIRU-VNTR method*

Введение

Согласно оценкам ВОЗ, в 2011 году во всём мире туберкулёзом заболело порядка 8,7 миллиона человек, а 1,4 миллиона умерли от этого заболевания [10]. В Российской Федерации во многих случаях туберкулез с лекарственной устойчивостью возбудителя регистрируют у лиц с впервые диагностированным заболеванием. В связи с тем, что лечение этих пациентов сопряжено с большими трудностями, выявление источников распространения таких штаммов является важной задачей. Поскольку туберкулёз является заболеванием, которое развивается сравнительно медленно, а возбудитель туберкулёза – *M. tuberculosis* – является клональным микроорганизмом, для которого возможна однозначная идентификация предковых штаммов, использование молекулярно-генетических методов штаммовой идентификации позволяет значительно увеличить эффективность эпидемических расследований [2].

Предложенный в 2006 году вариант метода MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive units – variable number of tandem repeats*), основанный на анализе 24 локусов в геноме туберкулёзного микроба, часто позиционируется как новый «золотой стандарт» генотипирования микобактерий туберкулёзного комплекса [16]. Однако для исследований продолжают применяться варианты метода, в которых используется анализ 6, 12, 15 и 24 локусов. В ряде исследований показано, что разрешающая способность метода MIRU-VNTR, основанного на анализе 24 локусов оказывается недостаточной, и может быть увеличена при использовании гипервариабельных

Таблица 1. Олигонуклеотиды и наборы локусов, применяющиеся для MIRU-VNTR типирования в разных вариантах

Локус	Синоним	Праймеры	Количество локусов			
			35	24	15	12
VNTR 0154	MIRU 02	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT	+	+		+
VNTR 0424		CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC	+	+	+	
VNTR 0569		TCAGCGTGTTTGTTACCC CTCTCGCCCATACCGGA	+			
VNTR 0577	ETR-C	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	+	+	+	
VNTR 0580	ETR-D, MIRU 04	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	+	+	+	+
VNTR 0595	msx.4	GGCGATGTTGATCGGGAT TCTAGACGCCAATCACGC	+			
VNTR 0802	MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	+	+	+	+
VNTR 0960	MIRU10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	+	+	+	+
VNTR 1443	Mtub16	GGTAATCCTGGTCGCTTGTC ACCCAAATTGCCCTGGTC	+			
VNTR 1644	MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	+	+	+	+
VNTR 1895	QUB-1895	GTGAGCAGGCCCAGCAGACT CCACGAAATGTTCAAACACCTCAAT	+			
VNTR 1955	Mtub21	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC CAACATCGCCTGGTTCTGTA	+	+	+	
VNTR 1982	QUB-18	CCGGAATCTGCAATGGCGGCAAATTAAAAG TGATCTGACTCTGCCGCCGCTGCAAATA	+			
VNTR 2059	MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG GGAGACCGCGACCAGGTACTTGTA	+	+		+
VNTR 2163a	QUB 11a,pUCDIa	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA TTCAGGGGGGATCCGGGA	+			
VNTR 2163b	QUB 11b,pUCDIb	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT	+	+	+	
VNTR 2165	ETR-A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	+	+	+	
VNTR 2347	Mtub29	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC	+	+		
VNTR 2401	Mtub30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA	+	+	+	
VNTR 2461	ETR-B	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT] CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	+	+		
VNTR 2531	MIRU23	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC	+	+		+
VNTR 2687	MIRU24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA	+	+		+
VNTR 2996	MIRU26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG	+	+	+	+
VNTR 3007	MIRU27QUB-5	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA	+	+		+
VNTR 3171	Mtub34	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC	+	+		
VNTR 3192	ETR-E,MIRU31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	+	+	+	+
VNTR 3232	QUB-3232	TGCCGCCATGTTTCATCAGGATTAA GCAGACGTCGTGCTCATCGATACA	+			
VNTR 3239	ETR-F	CTCGGTGATGGTCCGGCCGGTCAC GGAAGTGCTCGACAACGCCATGCC	+			
VNTR 3336	QUB-3336	ATCCCCGCGGTACCCATC TTCTACGACTTCGCAACCAAGTATC	+			
VNTR 3690	Mtub39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	+	+	+	
VNTR 3820		TGCGCGGTGAATGAGACG ACCTTCATCCTTGGCGAC	+			
VNTR 4052	QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGAT GGCCAGGTCCTTCCCGAT	+	+	+	
VNTR 4120		GTTCACCGGAGCCAACC GAGGTGGTTTCGTGGTCG	+			
VNTR 4156	OUB-4156	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCGTCCATGTT	+	+	+	
VNTR 4348	MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT	+	+		+

локусов [14, 11, 17]. Установлено также, что филогенетическая информативность метода MIRU-VNTR, основанного на анализе 24 локусов, оказывается недостаточной [4].

Целью исследования явилось изучение возможности использования дополнительных локусов MIRU-VNTR для увеличения разрешающей способности и повышения филогенетической информативности метода. В работе использовали 24 локуса, предложенные в 2006 году, а также 11 локусов, для которых по данным литературы был обнаружен высокий уровень полиморфизма.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Исследовано 330 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от больных с диагнозом «туберкулёз лёгких», обратившихся в медицинские учреждения г. Тулы в период с июня 2001 г. по июнь 2002 г.

Анализ MIRU-VNTR. Последовательности олигонуклеотидов, использо-вавшихся для анализа MIRU-VNTR представлена в таблице 1. ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad фирмы «Bio-Rad» (США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМKCl, 10 мМTris-HCl, pH 8,8, 0,08 % Nonidet P40, 1,5-3,0 мМ MgCl2, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотида, 0,4 мкМ каждого олигонуклеотида, 1 ед. активности рекомбинантной Taq-полимеразы (Хеликон, Россия). Режим амплификации: 95 °С – 10 мин; 30 циклов: 95 °С – 1 минута, 59 °С – 1 мин, 72 °С – 2 мин; 72 °С – 10 мин.

Размер ампликона определяли с помощью электрофореза в 2 %-ном агарозном геле при окрашивании бромистым этидием с использованием маркеров размеров ДНК «O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder» (Fermentas, Литва) и 50 Base-PairLadder (Amersham Pharmacia BiotechInc, США).

Оценку аллельного разнообразия и разнообразия генотипов проводили по коэффициенту Hunter-Gaston [12]. Филогенетический анализ изолятов осуществляли с помощью программы Populations 1.2.30. Для работы с дендрограммами использовали программу NJplot.

Сполиготипирование. Сполиготипирование проводили в соответствии с общепринятой методикой [13] с использованием набора для сполиготипирования «Spoligotyping Kits» (Isogen Biosolutions). Принадлежность изолята к сполигосемейству определяли на основании данных, представленных в международной базе данных Spol4 [3]. Если сполиготип отсутствовал в базе данных, то принадлежность к сполигосемейству определяли на основании алгоритма предложенного в 2002 году [15].

Анализ точечных мутаций в геноме M. tuberculosis. Принадлежность клинических изолятов к геногруппам, идентифицированным на основании SNP-типирования, осуществляли в соответствии с классификацией, предложенной в 2006 году [7]. Анализировали нуклеотиды, имеющие в геноме $H_{37}Rv$ координаты 0192197, 0473678, 1920118, 2460626, 3111473 и 3352929. Анализ данных нуклеотидов позволяет установить принадлежность к одной из семи кластерных групп, выявленной на основании анализа точечных мутаций, но не позволяет определить принадлежность к подгруппам. Изучение SNP проводили с использованием мультиплексной аллельспецифичной ПЦР [6].

Результаты и обсуждение

На основании анализа 35 локусов MIRU-VNTR установлено, что большая часть изученных клинических изолятов *M. tuberculosis* (291 – 89 %) является чистыми культурами; 28 клинических изолятов (8 %) являются смесью нескольких штаммов, поскольку содержат большое количество двойных аллелей; а 11 изолятов (3 %) имеют два аллеля только для одного из изученных локусов. В дальнейшем анализировали только изоляты, не имеющие двойных аллелей у изученных локусов (291). При их анализе по 35 локусам MIRU-VNTR обнаружено 186 паттернов (профилей) MIRU-VNTR. Количество повторов варьирует от 0 (для локусов ETR-F и VNTR 0569) до 28 (для локуса VNTR 1895). Значения индекса полиморфизма локусов варьируют для данной выборки штаммов от 0 до 0,8 (табл. 2), индекс разнообразия профилей MIRU-VNTR равен 0,96. Всего обнаружено 185 профилей MIRU-VNTR: 158 изолятов имеют уникальные MIRU-VNTR профили, а 133 изолята входят в состав 27 кластеров.

На основании данных о числе тандемных повторов в 35 локусах составлена дендрограмма генетического родства (рис. 1). На ней штаммы сформировали четыре группы, обозначенные как MIRU-VNTR-1, MIRU-VNTR-2, MIRU-VNTR-3, MIRU-VNTR-4.

Таблица 2. Индексы полиморфизма локусов MIRU-VNTR

Локус	h	Локус	h	Локус	h	Локус	h	Локус	h
MIRU 02	0,49	MIRU 26	0,53	QUB 26	0,73	VNTR 0595	0,01	VNTR 3171	0,06
MIRU 04	0,11	MIRU 27	0,03	ETR A	0,63	VNTR 1443	0,52	VNTR 3232	0,80
MIRU 10	0,64	MIRU 31	0,66	ETR B	0,05	VNTR 1895	0,31	VNTR 3336	0,71
MIRU 16	0,29	MIRU 39	0,48	ETR C	0,69	VNTR 1955	0,60	VNTR 3690	0,58
MIRU 20	0,06	MIRU 40	0,69	ETR-F	0,56	VNTR 1982	0,72	VNTR 3820	0,70
MIRU 23	0,19	QUB-11a	0,71	VNTR 0424	0,59	VNTR 2347	0,07	VNTR 4120	0,68
MIRU 24	0	QUB-11b	0,66	VNTR 0569	0,12	VNTR 2401	0,60	VNTR 4156	0,28

Примечание: h – индекс полиморфизма

На основании анализа точечных мутаций методом аллель-специфичной ПЦР определена принадлежность 291 клинического изолята *M. tuberculosis* к кластерным группам [7]. Показано, что в данной выборке присутствуют изоляты, принадлежащие ко второй (98 – 33,7 %), третьей (41 – 14,1 %), пятой (127 – 43,6 %), и шестой (25 – 8,6 %) кластерным группам SCG. При анализе дендрограммы показано, что группа MIRU-VNTR-1 состоит из 98 штаммов, принадлежащих к сполигосемейству Beijing и относящихся к SCG-2.

Группа MIRU-VNTR-2 состоит из 19 изолятов, принадлежащих к сполигосемействам T (11) и Haarlem (8). Все клинические изоляты принадлежали к SCG-3.

Группа MIRU-VNTR-3 состоит из двух раздельных подгрупп. В группу MIRU-VNTR-3a входят 127 изолятов, принадлежащих к SCG-5. Изоляты, входящие в SCG-5, принадлежат к пяти сполигосемействам. К сполигосемейству LAM принадлежат 83,4 % изолятов (107), а к сполигосемействам LAM3-S-conv, S, T, и U относятся 0,8 % (один), 1,6 % (два), 11,8 % (15) и 1,6 % (два) изоля-тов соответственно. В группу MIRU-VNTR-3b входят 25 изолятов. Все они принадлежат к SCG-6. К сполигосемейству T принадлежит 92,0 % (n 23), а к сполигосемействам U и X принадлежит по одному изоляту.

Группа MIRU-VNTR-4 состоит из 22 изолятов, принадлежащих к SCG-3. Из них к сполигосемейству Haarlem принадлежит 86,5 % изолятов (19), к сполигосемейству T принадлежит 9 % изолятов (два), 4,5 % изолятов принадлежит к сполигосемейству Beijing-like (один).

Таким образом, только группа MIRU-VNTR-1 оказалась сформирована из клинических изолятов, относящихся к одной филогенетической группе, определённой как на основании анализа точечных мутаций, так и на основании сполиготипирования. Все остальные группы MIRU-VNTR, хотя и

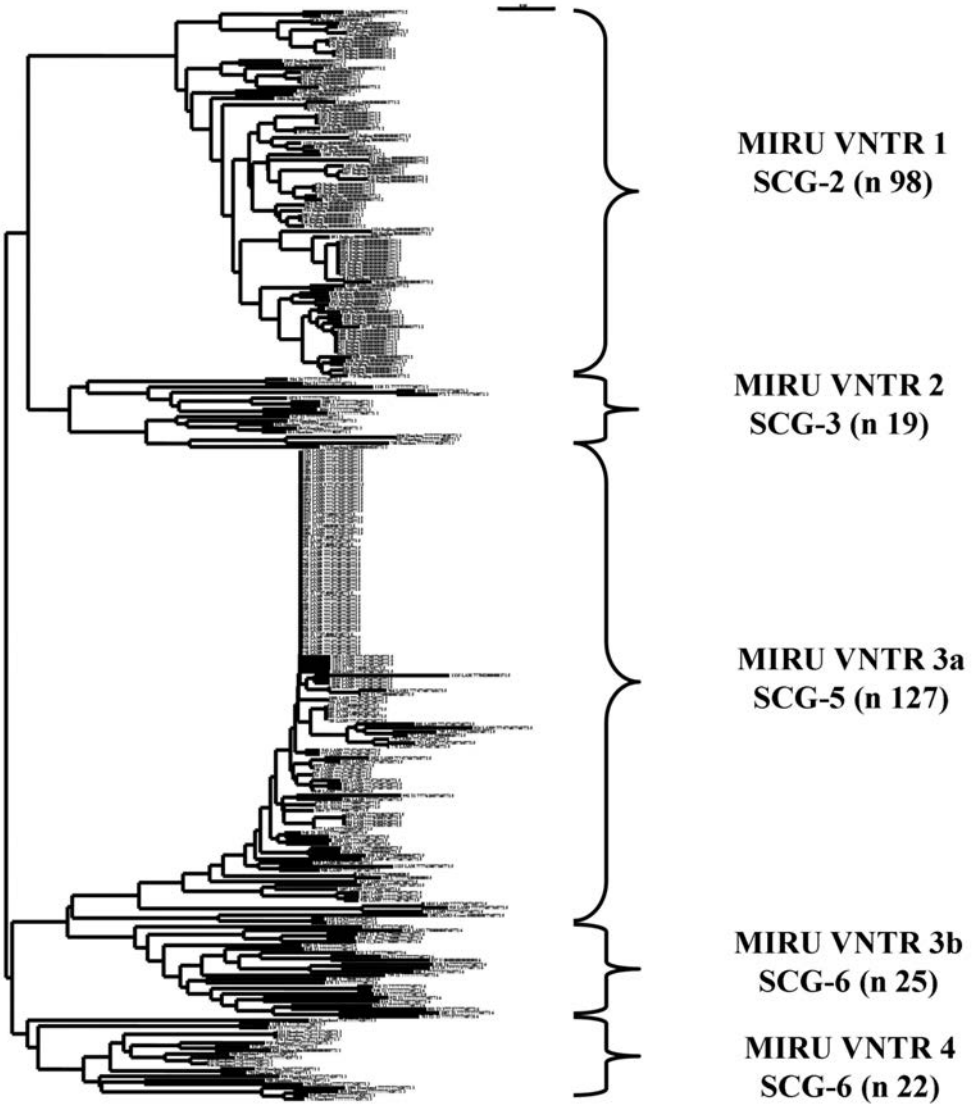


Рис. 1. Дендрограмма генетического родства 291 клинического изолята M. tuberculosis, построенная на основании анализа 35 локусов MIRU-VNTR.

Таблица 3. Сравнение вариантов методов MIRU-VNTR, основанных на анализе 24 и 35 локусов

Показатель	24 локуса	35 локусов
Hunter-Gaston	0,94	0,96
Изолятов в кластере	61	55
Уникальных генотипов	106	158

состояли из изолятов, принадлежащих к одной SCG, но содержали также изоляты, принадлежащие к разным сполигосемействам. Это позволяет сделать вывод, что определение принадлежности штамма к филогенетической линии, на основании его сполиготипа может оказаться ошибочным [1, 8].

В группе MIRU-VNTR-3a (изоляты, принадлежащие к SCG-5) обнаружены 55 изолятов, имеющих одинаковый профиль MIRU-VNTR при анализе 35 локусов. Однако изоляты этой группы имеют различные сполиготипы: 45 изолятов имеют сполиготип 777477607760771, четыре изолята – сполиготип 777777607760771, пять изолятов – 775740003760771, а один изолят – 774000000760771, причем все эти сполиготипы также обнаружены у изолятов, не входивших в данный кластер.

Для того чтобы выяснить, не привело ли использование гипервариабельных локусов к построению неверной филогенетической схемы, была построена дендрограмма на основании анализа 24 локусов [16]. Эта дендрограмма оказалась очень близка к дендрограмме, построенной на основании анализа 35 локу-сов. Отличия заключались в том, что при использовании 24-х локусов размер кластера увеличился с 55 до 61 изолята. Количество уникальных типов MIRU-VNTR снизилось с 158 до 106, индекс разнообразия профилей снизился с 0,96 до 0,94 (табл. 3). Кроме того, обнаружено, что три клинических изолята, принадлежавшие к SCG-5, оказались сгруппированными вместе с изолятами, при-надлежавшими к SCG-6. При этом клинические изоляты, принадлежащие к SCG-3, также сформировали две ветви – группу MIRU-VNTR-2 и группу MIRU-VNTR-4. На основании этих данных был сделан вывод, что анализ гипервариабельных локусов не приводит к искажению филогенетической информации.

При сполиготипировании установлено, что сполигопаттерны 377737777760771, 777777377760771 и 777777777760771 обнаружены у изолятов *M. tuberculosis*, входящих в группу MIRU-VNTR-2 (SCG-3) и группу MIRU-VNTR-3b (SCG-6). Одинаковых сполигопаттернов у клинических изолятов из групп MIRU-VNTR-2 (SCG-3) и MIRU-VNTR-4 (SCG-3) обнаружено не было, несмотря на то, что изоляты в обоих группах относились к сполигосемействам Haarlem и T. Это можно объяснить тем, что при выборе маркерных мутаций использовали два штамма, относящиеся к SCG-4 и SCG-6. Штаммы, принадлежащие к группе SCG-5, находятся на одной филогенетической линии со штаммами, принадлежащими к SCG-6. Штаммы, принадлежащие к SCG-3c, находятся на одной ветви со штаммами, принадлежащими к SCG-4. В то же время группа SCG-3 дистанцирована от филогенетических линий SCG-4 и SCG-6. Поэтому штаммы группы SCG-3 не могут быть дифференцированы на основании анализе точечных мутаций.

Также не обнаружено ни одного изолята, относящегося к кластеру SCG-4, который включает изоляты, принадлежащие к сполигосемейству X. Единственный изолят, отнесенный к сполигосемейству X, имел сполиготип, отсутствующий в международной базе данных, а его принадлежность к данному сполигосемейству была определена на основании эвристических алгоритмов [15]. Вероятно, что в изученной коллекции изолятов действительно отсутствовали изоляты, принадлежащие к SCG-4.

В 2007 году возникло предположение, что штаммы *M. tuberculosis*, относящиеся к Европейско-Американскому семейству, искусственно разбиты на две филогенетические линии при анализе точечных мутаций [9]. Однако, среди изученных в данной работе изолятов *M. tuberculosis*, отсутствие изолятов, принадлежащих к SCG-4, позволяет предположить, что эти филогенетические линии являются независимыми.

В 2009 году, на основании анализа последовательностей 89 генов в геноме возбудителя туберкулёза, была составлена филогенетическая схема, хорошо согласующая с данными, полученными при сполиготипировании и анализе геномных делеций [4]. На основании анализа сполиготипов и точечных мутаций авторы данной работы дополнили эту схему, указав на ней принадлежность филогенетической линии к SCG (рис. 2).

В настоящее время для штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к сполигосемействам Uganda и Cameroon, а также штаммов *M. africanum* не существует классификации, основанной на анализе точечных мутаций. Однако другие филогенетические линии могут быть идентифицированы данным методом.

Вероятно, изначально в группу SCG-3 оказались объединены несколько филогенетических линий *M. tuberculosis*, в результате того, что геномы штаммов, принадлежащие к данной группе, не анализировали при поиске маркерных мутаций. В данную группу входят штаммы, принадлежащие к сполигосемействам Haarlem и T, однако эти сполигосемейства не состоят из эволюционно независимых штаммов. В 2008 году было показано, что в сполигосемейство T оказались объединены штаммы *M. tuberculosis*, принадлежащие к SCG-5 и SCG-6 [5]. Однако согласно данным, полученным в настоящей работе, в сполигосемейство T включены также штаммы, принадлежащие к SCG-3.

Заключение

При изучении структуры популяции *M. tuberculosis* с использованием трех молекулярно-биологических методов

(MIRU-VNTR, сполиготипирование, анализ точечных мутаций), установлено, что каждую группу MIRU-VNTR сформировали изоляты, относящиеся к одной SNP-группе, однако четыре из пяти SNP-групп содержали изоляты, относящиеся к разным сполигосемействам. Это позволяет сделать вывод, что определение филогенетического родства изолятов *M. tuberculosis*, основыванное только на результатах сполиготипирования, может быть ошибочным. Возможно, в ближайшем будущем полногеномный анализ позволит построить филогенетическую схему, отражающую реальную эволюцию штаммов *M. tuberculosis*.

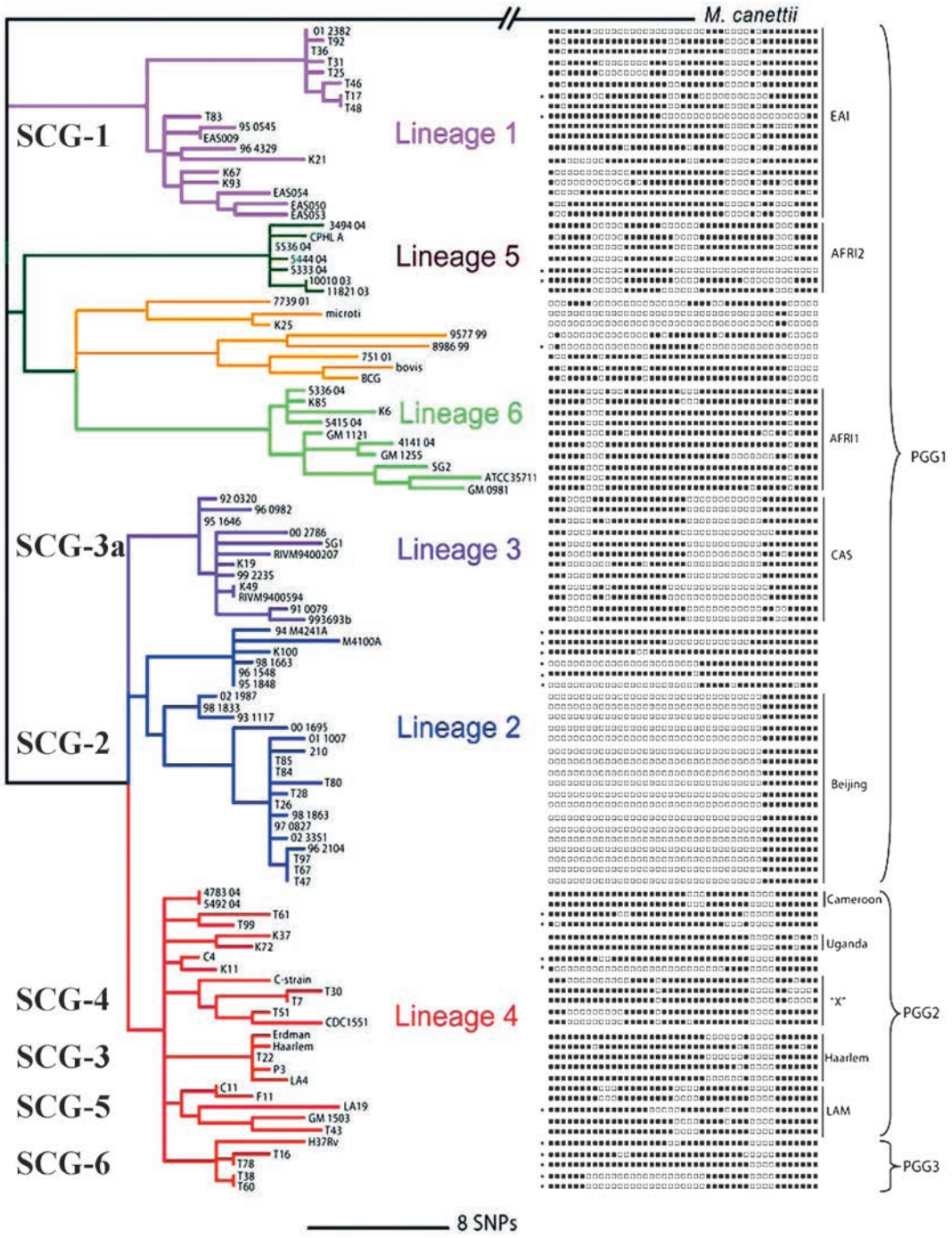


Рис. 2. Дендрограмма молекулярно-генетического родства клинических изолятов M. tuberculosis, построенная на основании анализа 89 генов [4].

Литература

1. Ибраева А.Р., Ахметова А.Ж., Кожамкулов У.А. и др. Генотипирование и определение лекарственной устойчивости клинических изолятов M. tuberculosis из различных областей Казахстана на основе ДНК-секвенирования и MIRU-VNTR анализа // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С.71-77.

2. Alonso-Rodriguez N., Martinez-Lirola M., Sanchez M.L. et al. Prospective universal application of mycobacterial interspersed repetitive-unitvariable-number tandem-repeat genotyping to characterize Mycobacterium tuberculosis isolates for fast identification of clustered and orphan cases // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – No. 7. – P. 2026-2032.

3. Brudey K., Driscoll J.R., Rigouts L. et al. Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology // BMCMicrobiol. – 2006. – 6. – 23.

4. Comas I., Homolka S., Niemann S., Gagneux S. Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in Mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – e7815.

5. Dos Vultos T., Mestre O., Rauzier J. et al. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of Mycobacterium tuberculosis //PLoS One. – 2008. – Vol. 3. – e1538.

6. Dubiley S., Kirillov E., Ignatova A., Sepanshina V., Shemyakin I. Molecular characteristics of M. tuberculosis LAM-RUS family prevalent in Central Russia // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45. – No. 12. – P. 4036-4038.

7. Filliol I., Motiwala A.S., Cavatore M. et al. Global phylogeny of Mycobacterium tuberculosis based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set // J.Bacteriol. – 2006. – Vol. 188. – P. 759-772.

8. Fitzgibbon M.M., Gibbons N., Roycroft E. et al. A snapshot of genetic lineages of Mycobacterium tuberculosis in Ireland over a two-year period, 2010 and 2011 // Eurosurveillance. – 2013. – Vol. 18. – No. 3. – P. 1-7.

9.Gagneux S., Small P.M. Global phylogeography of Mycobacterium tuberculosis and implications for tuberculosis product development // Lancet Infect. Dis. – 2007. –Vol. 7. – P. 328-337.

10. Global tuberculosis report 2012. – WHO/HTM/TB/2012.6. – Geneva. – 2012.

11. Hanekom M., van der Spuy G.D., Gey van Pittius N.C. et al. Discordance between mycobacterial interspersed repetitive-unitvariable-number tandem-repeat typing and IS6110 restriction fragment length polymorphism genotyping for analysis of Mycobacterium tuberculosis Beijing strains in a setting of high incidence of tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – No. 10. – P. 3338-3345.

12. Hunter P.R., Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // J. Clin. Microbiol. – 1988. – Vol. 26. – No. 11 – P. 2465-2466.

13.Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35. – No. 4. – P. 907-914.

14. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in Russia: in search of informative variable-number tandem-repeat loci // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – No. 11. – 3576-3584.

15. Sebban M., Mokrousov I., Rastogi N., Sola C. A data-mining approach to spacer oligonucleotide typing of Mycobacterium tuberculosis // Bioinformatics. – 2002. – Vol. 18. – No. 2 – P. 235-243.

16. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized Mycobacterial Interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – No. 12. – P. 4498-4510.

17. Velji P., Nikolayevskyy V., Brown T., Drobniewski F. Discriminatory ability of hypervariable variable number tandem repeat loci in population-based analysis of Mycobacterium tuberculosis strains // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15. – No. 10. – P. 1609-1616.

Сведения об авторах

Богун Александр Геннадьевич *– заведующий отделом ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора*

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: bogun62@mail.ru

Благодатских Станислав Александрович *– младший научный сотрудник отдела ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора*

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: merry-st@mail.ru

Мухина Татьяна Николаевна *– научный сотрудник отдела ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора*

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: Cecile98@rambler.ru

Майская Надежда Васильевна *– научный сотрудник отдела ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора*

Адрес: 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, п. Оболенск

Телефон (496) 736-00-00

e-mail: myskaya_NN@mail.ru

УДК 579.25-871.9:614.2

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ УРАЛЬСКИХ ИЗОЛЯТОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Т.В. Умпелева[1], А.А. Вязовая[2], М.А. Кравченко[1], Н.И. Еремеева[1], О.В. Нарвская[2]

GENOTYPING OF ISOLATES MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM URAL

T.V. Umpeleva, A.A. Vyazovaya, M.A. Kravchenko, N.I. Eremeeva, O.V. Narvskaya

Предложена схема генотипирования возбудителя туберкулеза в Уральском Федеральном округе, согласно которой, на первом этапе, с использованием ПЦР в режиме реального времени, осуществляется дифференциация изолятов M. tuberculosis на группы Beijing/non-Beijing. Последующее MIRU-VNTR-типирование изолятов генотипа Beijing проводится с использованием 9 локусов (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40 VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232), изолятов других генотипов (non-Beijing) – 15 локусов (Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, QUB26, QUB4156) и/или сполиготипирования.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis, генотипирование, MIRU-VNTR, сполиготипирование, Beijing, non-Beijing.*

According to suggested scheme genotyping of M. tuberculosis in Ural region of Russia is based on 2-step assay: the real-time PCR for differentiation of Beijing/non-Beijing isolates and further discrimination by MIRU-VNTR-typing using a set of 9 loci (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40 VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232) for Beijing isolates, and 15 loci (Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, QUB26, QUB4156) and/or spoligotyping for non-Beijing isolates.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis, genotyping, MIRU-VNTR, spoligotyping, Beijing, non-Beijing.*

Введение

Микробиологический мониторинг возбудителя туберкулеза в современных условиях основан на анализе специфических нуклеотидных последовательностей хромосомной ДНК *M. tuberculosis* (МБТ), с использованием методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР) – MIRU-VNTR-типировании и сполиготипировании, также IS6110-RFLP и других методах исследования геномного полиморфизма микобактерий [3, 6, 7]. Соотношение отдельных генотипов в популяциях МБТ может существенно различаться в разных странах и географических регионах мира, что следует учитывать при разработке стратегий генотипирования микроорганизма [1, 2, 4, 5].

Цель работы – изучить региональные особенности генетической структуры популяции *M. tuberculosis* с помощью стандартизованных молекулярно-генетических методов и разработать схему генотипирования возбудителя туберкулеза в Уральском федеральном округе Российской Федерации.

Материалы и методы

178 культур *M. tuberculosis* и 90 образцов ДНК МБТ, выделенных из клинического материала, были получены от вновь выявленных, эпидемиологически не связанных между собой больных туберкулезом в 2009-2012 гг. в лабораториях ГБУЗ «Свердловский областной противотуберкулезный диспансер» и ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России.

Культивирование *M. tuberculosis* осуществляли общепринятым методом на среде Левенштейна-Йенсена. Колонии *M. tuberculosis* суспендировали в растворе, содержащем 9% NaCl и 20% глицерина. Часть суспензии сохраняли в пробирках для последующего IS6110-RFLP-типирования, другие инкубировали при 95 ^{0}C – 30 мин. для лизирования клеток, затем осаждали при 3000 g 1 мин. Супернатант использовали в качестве препарата ДНК для постановки ПЦР.

Для дифференциации изолятов на группы Beijing и non-Beijing использовали ПЦР-тест-систему «Амплитуб-Beijing», ООО «Синтол» (г. Москва). ПЦР выполняли в режиме реального времени на приборе iCycler iQ5 (BioRad, США).

Генотипирование изолятов *M. tuberculosis* проводили методом MIRU-VNTR, используя 15 локусов [6] и дополнительно три гипервариабельных локуса [2] для изолятов генотипа Beijing, сгруппированных в кластеры. Для постановки ПЦР использовали реактивы ООО «Интерлабсервис» (г. Москва) и праймеры [2, 6] ООО «Синтол» (г. Москва). ПЦР осуществляли в термоциклере «Терцик», ООО «ДНК технология». Продукты ПЦР

[1] *ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург*
[2] *ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург*

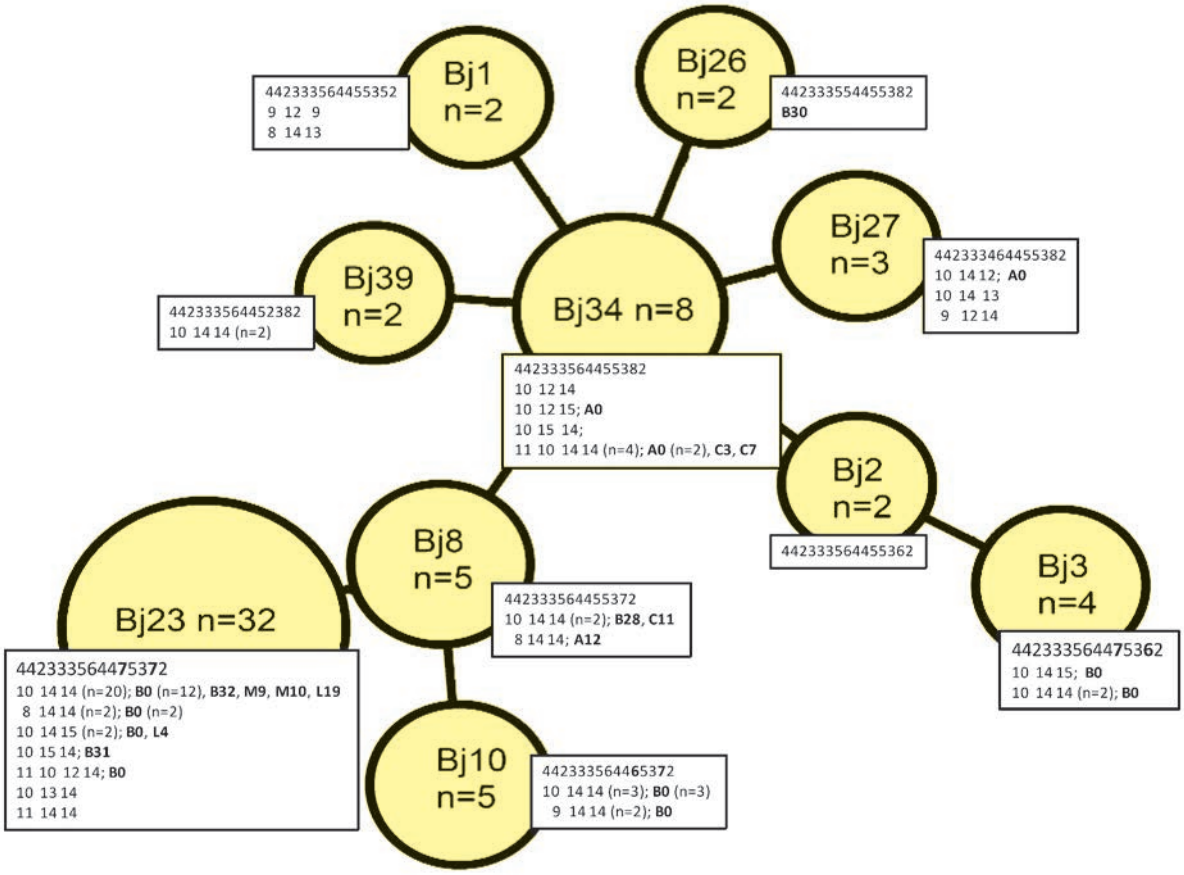


Рис. 1. Минимальное охватывающее древо (Minimum spanning tree) профилей MIRU-VNTR (15 локусов) клинических изолятов M. tuberculosis Beijing вновь выявленных больных туберкулезом.
Размеры узлов пропорциональны числу изолятов в составе MIRU-VNTR-кластера. Числовой профиль (число повторов в каждом из 15 локусов - Mtub04, ETRC, MIRU04, MIRU40, MIRU10, MIRU16, Mtub21, QUB11b, ETRA, Mtub30, MIRU26, MIRU31, Mtub39, QUB26, QUB4156) показан в 1-й строке у каждого узла; ниже построчно приведены числовые профили для трех гипервариабельных локусов (VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232) и профили IS6110-RFLP, обозначены жирным шрифтом. Цифры в скобках обозначают число изолятов, превышающее 1.

подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, результаты визуализировали с помощью системы документации гелей «GelDoc» (BioRad, США).

Сполиготипирование [3] и IS6110-RFLP-типирование [7] проводили на базе лаборатории молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (г. Санкт-Петербург). Принадлежность к генетической группе/линии (lineage, clade) определяли путем сравнения полученных профилей изолятов с имеющимися в компьютерных базах данными: «MIRU-VNTRplus» http://www.miru-vntrplus.org, в международной базе данных SITVITWEB http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/ и ее обновленной версии SITVIT2. Профили IS6110-RFLP сравнивали с представленными в базе данных НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Для количественной оценки вариабельности генетических локусов и дискриминирующей способности схем генотипирования рассчитывали индекс разнообразия Хантера-Гастона (HGDI) согласно http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl.

Результаты и обсуждение

С помощью ПЦР в режиме реального времени определена принадлежность 178 изолятов *M. tuberculosis* и 75 образцов клинического материала, содержащего ДНК *M. tuberculosis*, к генетическим группам Beijing и non-Beijing.

Анализ результатов MIRU-VNTR-типирования (15 локусов) 178 изолятов *M. tuberculosis* выявил 107 типов (MIT) MIRU-VNTR-профилей.

В пределах генетической группы non-Beijing (80 изолятов) выделено 64 MIRU-VNTR-профиля, которые представляли пять генетических групп: LAM (28,8%), URAL (26,3%), Haarlem (17,5%), Tur, S и неклассифицированную группу (Unknown). Двадцать восемь изолятов (35%) были сгруппированы в 12 кластеров, содержавших по два-четыре изолята в каждом. Анализ структуры DR-области хромосомы всех изолятов non-Beijing методом сполиготипирования позволил выделить 43 сполиготипа (SIT), принадлежавшие к 15 генетическим семействам: наиболее многочисленное – H3 (25%) – включало изоляты MIRU-VNTR группы URAL. Значения HGDI для MIRU-VNTR-типирования и

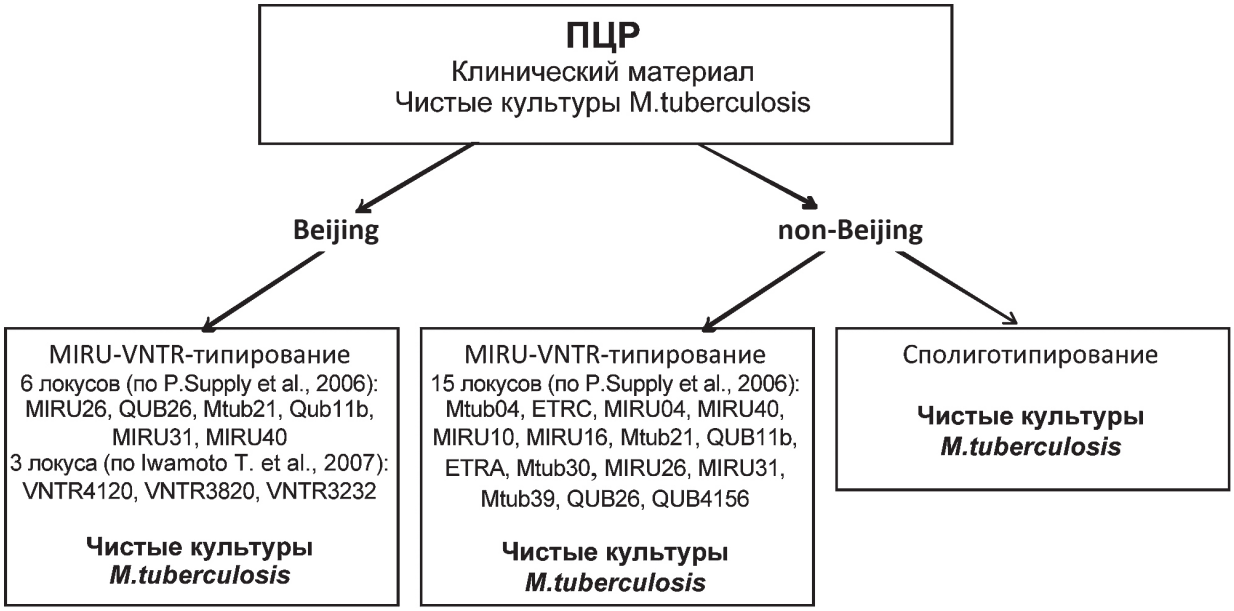


Рис. 2. Схема генотипирования изолятов M. tuberculosis

сполиготипирования были достаточно высокими и составили 0,994 и 0,970 соответственно.

MIRU-VNTR-типирование (15 локусов) выявило неоднородность изолятов группы Beijing (n=98), причем 65 (66,3%) из них входили в состав 10 кластеров. Самый многочисленный из кластеров включал 32 (32,7%) изолята (рис. 1). Данные генотипирования по трем дополнительным гипервариабельным локусам [2] были получены для 53 из 65 изолятов, что позволило разбить 7 из 10 MIRU-VNTR-кластеров Beijing.

Самые большие значения HGDI (0,651 и 0,603) имели локусы MIRU26 и QUB26 соответственно. Локусы MIRU31, Mtub21, QUB11b, MIRU40 имели невысокую степень полиморфизма (значения HGDI: 0,243, 0,190, 0,173 и 0,155 соответственно). Для остальных локусов HGDI не превышал 0,100. Таким образом, был определен минимальный набор из шести (MIRU26 QUB26 MIRU31, Mtub21, QUB11b, MIRU40) дискриминирующих локусов MIRU-VNTR для генотипирования изолятов Beijing (HGDI=0,875). Использование данного набора, включавшего шесть из 15 «классических» локусов [6], несколько снижало и без того относительно невысокий уровень дискриминации изолятов (HGDI=0,885). Напротив, включение трех дополнительных локусов [2] позволило существенно увеличить дискриминирующую способность 6-локусной схемы типирования (HGDI=0,939).

Данные IS6110-RFLP-типирования, полученные для 45 изолятов, еще больше повысили степень дифференциации в пределах MIRU-VNTR-кластеров (рис. 1). У изолятов *M. tuberculosis* Beijing выявлено 17 близкородственных (коэффициент сходства 83%) типов IS6110-RFLP-профилей, которые различались как по количеству (15-19), так и по молекулярной массе фрагментов рестрикции хромосомной ДНК, содержащих участок последовательности инсерционного элемента IS6110. Пятнадцать (88%) из 17 вариантов профилей рестрикции IS6110 были индивидуальны (т.е. обнаружены у одного изолята), остальные представляли два крупных кластера: A0 и B0, включавших пять и 25 изолятов с идентичными профилями рестрикции соответственно. IS6110-RFLP-типирование, повысившее эффективность дифференциации изолятов *M. tuberculosis,* не может быть рекомендовано для широкого применения, поскольку является наиболее дорогостоящим и трудоемким методом, доступным лишь специализированным лабораториям.

Таким образом, для практического применения, можно предложить схему генотипирования уральских изолятов *M. tuberculosis*, включающую на первом этапе их дифференциацию на группы Beijing и non-Beijing, с использованием ПЦР в режиме реального времени. Последующее генотипирование изолятов non-Beijing рекомендуется проводить с использованием 15 MIRU-VNTR-локусов [6] и/или сполиготипированием. Минимальный набор из шести локусов стандартной схемы (MIRU26, QUB26, Mtub21, Qub11b, MIRU31, MIRU40) и три дополнительных локуса (VNTR4120, VNTR3820, VNTR3232) следует использовать для генотипирования изолятов генотипа Beijing (рис. 2).

Литература

1. Cowan L.S., Diem L., Monson T. et al. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in the United States // J. Clin. Microbiol.– 2005. – Vol. 43. – P. 688–695.

2. Iwamoto T., Yoshida S., Suzuki K. et al. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on Mycobacterium tuberculosis strains predominated by the Beijing family // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 272. – P. 282–283.

3. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35. – P. 907–914.

4. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R. et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P. 2607–2618.

5. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype in Russia: in search of informative VNTR loci // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – P. 3576–3584.

6. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for standardization of optimized Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 4498-4510.

7. Van Embden J., Cave M., Crawford J. et al. Strain identification on Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 31. – P. 406-409.

Сведения об авторах

Умпелева Татьяна Валерьевна *– младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург*

Адрес: 620039, г. Екатеринбург ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Телефон (343) 333-44-66

e-mail: tumpeleva@ya.ru

Вязовая Анна Александровна *– старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург, кандидат биологических наук*

Адрес: г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14

Телефон (812) 325-27-10

Кравченко Марионелла Анатольевна *– заведующая лабораторией экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург, кандидат биологических наук*

Адрес: 620039, г. Екатеринбург ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Телефон (343) 333-44-63

Еремеева Наталья Ивановна *– старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, г. Екатеринбург, кандидат биологических наук*

Адрес: 620039, г. Екатеринбург ул. 22-го Партсъезда, д. 50

Телефон (343) 333-44-63

Нарвская Ольга Викторовна *– заведующий лабораторией молекулярной микробиологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург, доктор медицинских наук, профессор*

Адрес: г. Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14

Телефон (812) 325-27-10

УДК 616-002.5:577.171.5:576.54

ПРОДУКЦИЯ ПРОКАЛЬЦИТОНИНА И НЕКОТОРЫХ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ ПРИ ТЯЖЕЛОЙ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

М.М. Авербах, Л.В. Панова, М.Ф. Губкина, Е.С. Овсянкина
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

INDICATORS OF PROCALCITONIN AND SOME PROINFLAMMATORY CYTOKINES PRODUCTION IN SEVERE TUBERCULOUS INFECTION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS

M.M. Averbakh, L.V. Panova, M.F. Gubkina, E.S. Ovsyankina

Представлены предварительные результаты использования полуколичественного иммуно-хроматографического метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q) уровня прокальцитонина у 35 больных тяжелым туберкулёзом детей и подростков. Положительный результат теста на прокальцитонин (более 0,5 нг/мл) получен у 12, отрицательный (менее 0,5 нг/мл) – у 23 больных. Наличие положительного теста свидетельствуетт о высокой активности микобактериальной популяции, что подтверждается обнаружением у таких больных микобактерий тремя методами: люминесцентной микроскопии, посева на жидких средах и ПЦР диагностикой (соответственно 83,3%, 100%, и 83,3%), в отличие от группы больных с отрицательным показателем теста (соответственно 17,4%, 34,8% и 47,8%). У больных, имеющих положительный тест на прокаль-цитонин, выявлена достоверно большая продукция ряда провоспалительных цитокинов МИФ, ФНО-α и ИНФ-γ.

***Ключевые слова**: туберкулёз детей и подростков, прокальцитонин, цитокины.*

The preliminary results of the use of semi-quantitative immunoassay method (BRAHMSPCT-Q) for rapid diagnosis of procalcitonin level in 35 children and adolescents with severe tuberculosis are presented. Positive result of the procalcitonin test (more than 0,5 ng/ml) has been obtained in 12 patients, and negative one (less than 0,5 ng / ml) – in 23. Positive test result indicates high activity of mycobacterial population, confirmed by the detection of mycobacteria using three methods in such patients: fluorescent microscopy, cultural method on BACTEC and PCR diagnostics(83,3%, 100% and 83,3%, respectively) in contrast to the group of patients with negative test result (17,4%, 34,8% and 47,8%, respectively). In the patients with positive procalcitonin test, reliably greater production of some proinflammatory cytokines, MIF, TNF-α and IFN-γ, has been revealed.

***Keywords:** tuberculosis in children and adolescents, procalcitonin, cytokines*

Введение

Поиск новых лабораторных маркеров инфекционного процесса при туберкулёзе, указываю-щих на тяжесть заболевания и служащих ориентиром эффективности проводимой терапии, по-прежнему является актуальной проблемой. Любой воспалительный процесс, в том числе и туберкулёз, сопровождается продукцией различных белков неспецифического иммунитета, белков острой фазы воспаления и цитокинов, запускающих реакции неспецифического и специфического иммунитета, определение которых может говорить о наличии воспаления и степени его тяжести. В настоящий момент одним из таких неспецифических маркеров, характеризующих тяжесть генерализованного инфекционного процесса, является прогормон кальцитонина – прокальцитонин, открытый в 1984 г. [10]. В многочисленных работах было показано что, уровень прокальцитонина (ПКТ) был значительно повышен у взрослых больных с различными инфекционными заболеваниями, в том числе сепсисом и септическим шоком, и у детей с бактериальным, но не вирусным менингитом [3]. O. Baylan и соавт. (2006) [2] установили, что уровень ПКТ повышен у больных активным туберкулёзом по сравнению со здоровыми лицами, хотя его концентрация была значительно ниже, чем у больных сепсисом и септическим шоком. Помимо клеток щитовидной железы ПКТ синтезируют нейроэндокринные клетки легкого, печени и, в меньшей степени, почек и моноциты крови при действии на них липополисахаридов (ЛПС) [13]. G. Matera и соавт. [11] показали, что молекула ПКТ имеет в своей пространственной структуре две инвагинации, которые способны связывать и инактивировать активность ЛПС из различных источников. В эксперименте и в клинике было показано, что выработку ПКТ стимулируют различные провоспалительные цитокины, такие как интерлейкин (ИЛ)-6, ИЛ-8, фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) [6].

Цель работы – определение уровня ПКТ в сыворотке крови больных различными формами туберкулёза детей и подростков в сравнении со спонтанной и антиген стимулированной выработкой в культуре крови ряда провоспалительных цитоков.

Табл. Результаты микробиологического обследования больных с помощью метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q)

BRAHMSPCT-Q / Метод обнаружения МБТ	ПКТ+ (n=12) положительно/ отрицательно	ПКТ- (n=23) положительно/ отрицательно
Люминесцентная микроскопия	10/2 (83,3%)	4/19 (17,4%)
Метод BACTEC	12/0 (100%)	8/15 (34,8%)
Метод ПЦР	10/2 (83,3%)	11/12 (47,8%)

Материал и методы

В исследование были включены 35 больных туберкулёзом детей и подростков в возрасте от 3 до 17 лет, находившихся в клинике Центрального НИИ туберкулёза РАМН. Из них у четырех диагностирован туберкулёз внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ), у одного – очаговый туберкулёз, у 15 – инфильтративный (в фазе распада), у трех – диссеминированный, у двух – казеозная пневмония, у восьми – фиброзно-кавернозный туберкулёз (ФКТ), у одного – диссеминированный туберкулёз в сочетании с ТВГЛУ, внутрибрюшных и периферических лимфатических узлов (шейная группа), туберкулёзом мозга, туберкулёзом печени, у одного туберкулёз трахеи в фазе инфильтрации, очаговый туберкулёз, состояние после пневмонэктомии (по поводу казеозной пневмонии). В исследовании применяли клинические, лабораторные и рентгенологические методы. Микробиологическое исследование на наличие микобактерий туберкулёза проводили методами бактериоскопии, посева на жидких средах (система BACTEC 960) и ПЦР-диагностики. Для определения концентрации прокальцитонина в плазме крови использован полуколичественный иммунохроматографический метод экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q). При концентрации ПКТ менее 0,5 нг/мл (отсутствие опытной полоски на планшете) результат считали отрицательным. При концентрации 0,5 нг/мл и более опытная полоска окрашивалась в красный цвет, при этом интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации ПКТ (референсный ряд значений: до 0,5 нг/мл, от 0,5 до 2 нг/мл, от 2 до 10 нг/мл, 10 нг/мл и более). Тест проводили при поступлении больных в клинику, до назначения противотуберкулёзной терапии. Из 35 больных у 12 получен положительный ответ (ПКТ+), у 23 отрицательный (ПКТ-). Определение миграцию ингибирующего фактора (МИФ), ФНО-α, интерферона-γ (ИНФ-γ) и хемокина CXCL-10 проводили в супернатантах культивированной крови. 1,0 мл цельной крови смешивали с 1,0 мл безсывороточной культуральной среды RPMI 1640 с необходимыми добавками и стимулировали 20 мкг/мл ППД или 1 мкг/мл ESAT-6/CFP-10. Образцы супернатантов собирали через 18-22 часов культивирования. Концентрацию цитокинов определяли методом ELISA, для чего использовали наборы DuoSetHumanMIF и CXCL-10 иммуноферментного анализа R@D (Великобритания). Для определения ФНО-альфа и ИНФ-γ использовали наборы Вектор-БЕСТ (Россия). Результаты обрабатывали статистически с помощью программы MicrosoftExel.

Результаты и обсуждение

Результаты микробиологического обследования больных, имеющих положительные и отрицательные значения иммунохроматографического метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q) представлены в таблице.

Из 12 больных, имеющих результат ПКТ+, микобактерии обнаружены при люминесцентной микроскопии у 10 (83,3%), при посеве на жидкие среды (BACTEC 960) – у всех 12 (100%) и методом ПЦР – у 10 (83,3%). Из 23 больных, имеющих результат ПКТ-, микобактерии обнаружены при люминесцентной микроскопии у четырех (17,4%), при посеве на жидкие среды у восьми (34,8%) и методом ПЦР – у 11 (47,8%).

При изучении продукции МИФ в культуре крови больных выявлено, что в группе ПКТ+ показатели спонтанной и антигенстимулированной продукции достоверно превышали аналогичные в группе ПКТ- (рис.1).

Интересным является то, что показатели спонтанной и антигенстимулированной продукции внутри групп не различаются

Рис.1. Спонтанная и антигенстимулированная продукция МИФ у больных ПКТ+ и ПКТ-

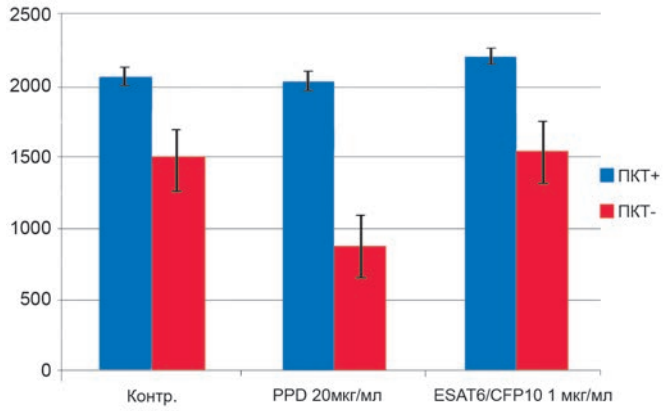
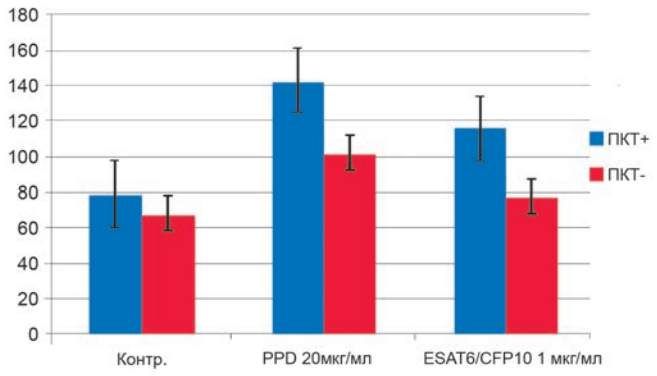


Рис.2. Спонтанная и антигенстимулированная продукция ФНО-альфа у больных ПКТ+ и ПКТ-



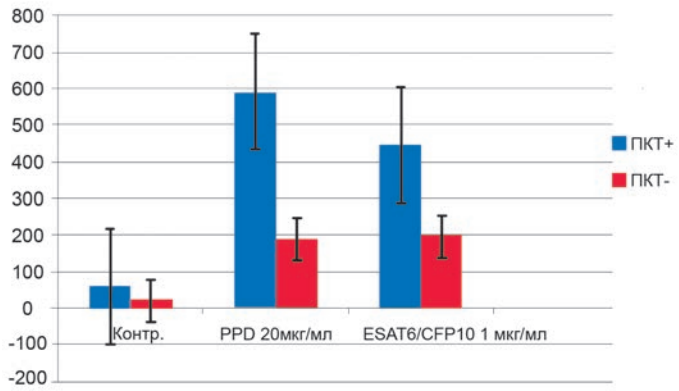


Рис.3. Спонтанная и антигенстимулированная продукция ИНФ-гамма у больных ПКТ+ и ПКТ-

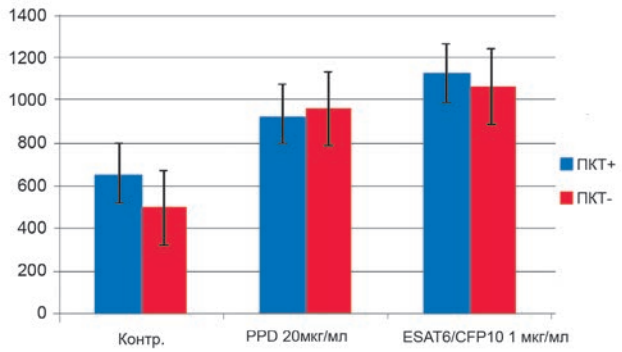


Рис. 4. Спонтанная и антигенстимулированная продукция CXCL-10 у больных ПКТ+ и ПКТ-

между собой. Аналогичные результаты получены ранее при исследовании продукции МИФ клетками селезенки зараженных мышей CBA и I/St и мононуклеарами периферической крови больных туберкулёзом детей и подростков [1].

При изучении продукции ФНО-α в культуре крови больных выявлено, что в группах ПКТ+ и ПКТ- показатель ППД стимулированной продукции достоверно превышал показатель спонтанной продукции ФНО-α. Этого не наблюдали при стимуляции культур крови ESAT-6/CFP-10. При стимуляции культур крови больных ПКТ+ 20 мкг/мл ППД или 1 мкг/мл ESAT-6/CFP-10 продукция ФНО-α была достоверно выше, чем у больных ПКТ- (рис. 2).

При изучении продукции ИНФ-γ в культуре крови больных выявлено, что в группах ПКТ+ и ПКТ- показатель ППД и ESAT-6/CFP-10 стимулированной продукции достоверно превышал показатели спонтанной продукции ИНФ-γ. Антигенстимулированная продукция ИНФ-γ была достоверно выше у больных ПКТ+ по сравнению с больными ПКТ- (рис. 3).

При изучении продукции CXCL-10 в культуре крови больных выявлено, что в группах ПКТ+ и ПКТ- ESAT-6/CFP-10 стимулированная выработка этого хемокина достоверно превышала показатели спонтанной продукции. Сравнение данных спонтанной, стимулированной антигенами ППД и ESAT-6/CFP-10 выработки этого хемокина между исследуемыми группами различий не выявило (рис. 4).

Полученные результаты изучения выраженности секреции ПКТ экспресс-методом у больных различными формами туберкулёза детей и подростков указывают, что положительную реакцию отмечают в тех наблюдениях, когда активность микобактерий туберкулёза в организме значительно выражена. Об этом свидетельствуют положительные результаты микробиологических тестов. G. Matera и соавт. (2012) предполагают, что ПКТ связывает не только ЛПС грамотрицательных микроорганизмов, но и сходные структуры липополисахаридной природы у бактерий других видов, в том числе и микобактерий туберкулёза [11].

Степень выраженности специфического воспалительного процесса у ПКТ+ больных характеризуется также достоверно большим выбросом у них ряда провоспалительных цитокинов (МИФ, ФНО-α и ИНФ-γ). МИФ рассматривается в качестве важной части стрессорной реакции организма и его содержание в сыворотке крови зависит в основном от выработки гипоталамо-гипофиз-надпочечниковой системой под влиянием гормона гипофиза кортиколиберин [14]. МИФ существует также в клетках макрофагальной, лимфоцитарной природы в преформированном виде и поэтому быстро выделяется в ответ на воздействие эндо- и экзотоксинов, ФНО-α и ИНФ-γ в местах воспаления [4]. Кроме того, отмечена вариабельность уровня синтеза МИФ в зависимости от стадии заболевания и высокая концентрация МИФ в сыворотке коррелировала со степенью тяжести туберкулёзного процесса [8]. Высокая продукция ФНО-α и ИНФ-γ в активную фазу туберкулёзного процесса отмечена многими исследователями, однако обнаружена и вариабельность этих показателей, в зависимости от степени выраженности бактериовыделения и, в случае ИНФ-γ, локализации процесса в легких или при внелегочных формах [5, 9].

Хемокин CXCL10 или IP10 секретируется при инфекциях лейкоцитами, нейтрофилами, эозинофилами, моноцитами, эпителиальными и стромальными клетками и через CXCR3 рецептор, экспрессированный преимущественно на активированных Т- и В-лимфоцитах, NK- и дендритных клетках, индуцирует их хемотаксис и апоптоз в очагах воспаления [12]. В настоящее время этот хемокин интенсивно исследуют у больных с активным и латентным туберкулёзом в комбинации с ИНФ-γ, ИЛ-2 и другими хемокинами (MCP-1, MCP-2). Результаты неоднозначны, но отмечено, что его спонтанная продукция (наличие в сыворотке или культуральных супернатантах) несколько выше у больных с латентным, чем активным туберкулёзом, а стимуляция культур крови и клеток не приводит к увеличению выработки CXCL10 (аналогичные данные получены как у детей [16], так и у взрослых [15]). Отсутствие различий

в спонтанной и антигенстимулированной продукцией CXCL10 подтверждено в настоящем исследовании.

Заключение

Результаты положительного теста на прокальцитонин, полученные с помощью полуколичественного иммунохроматографического метода экспресс-диагностики (BRAHMSPCT-Q) у больных туберкулёзом детей и подростков свидетельствуют о высокой активности микобактериальной популяции, что подтверждается более высокими показателями таких провоспалительных цитокинов как МИФ. ФНО-α и ИНФ-γ.

Литература

1. *Авербах М.М. мл., Кондратьева Е.В., Горелова Л.А., Губкина М.Ф., Панова Л.В. Изучение выработки МИФ на экспериментальной модели и при различных формах туберкулёза у детей и подростков // Юбилейный сб. статей 50 лет отделу иммунологии ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН. – М., 2013. – С. 21-30.*
2. *Baylan O., Balkan A., Inal A. et al. The predictive value of procalcitonin levels in adult patients with active pulmonary tuberculosis // Jpn. J. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 59. – P. 164-167.*
3. *Bohuon C. A Brief history of procalcitonin // Intens. Care Med. – 2000. – Vol. 26. – S. 146-147.*
4. *Calandra T. Macrophage migration inhibition factor and host innate immune response to microbes // Scan. J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 35. – P. 573-576.*
5. *Cooper A.M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis // Annu. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 27. – P. 393-422.*
6. *Dandona P., Nix D., Wilson M.F. et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1994. – Vol. 79. – P. 1605-1608.*
7. *Ghillani P., Motte P., Troalen F. et al. Identification and measurement of calcitonin precursors in serum of patient with malignant diseases // Cancer Res. – 1989. – Vol. 4. – P. 6845-6851.*
8. *Kibiki G.S., van der Ven A.J., Geurts-Moespot A. et al. Serum and BAL macrophage migration inhibitory factor levels in HIV infected Tanzanians with pulmonary tuberculosis or other lung diseases // Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 123. – P. 60-65.*
9. *Kunnath-Velayudhan S., Gennaro M. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery // Clin. Microbiol. Rev. – 2011. – Vol. 24. – P. 792-805.*
10. *LeMoullec J.M., Jullienne A., Chenais J. et al. The complete sequence of human preprocalcitonin // FEBS. – 1984. – Vol. 167. – P. 93-97.*
11. *Matera G., QuirinoA., Giancotti A. et al. Procalcitonin neutralizes bacterial LPS and reduces LPS-induced cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells // BMC Microbiol. – 2012. – V. 12. – P. 68. doi: 10.1186/1471-2180-12-68.*
12. *Mingli L., Shanchun G., Stiles J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications // Cytokine growth factor Rev. – 2011. – Vol. 22. – P. 121-130.*
13. *Russwurm S., Stonans I., Stonane E. et al. Procalcitonin and CGRP-1 mrna expression in various human tissues // Shock. – 2001. – Vol. 16. – P. 109-12.*
14. *Nishino T., Bernhagen J., Calandra T. et al. Localization of macrophage-migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotropic and thyreotropic cells // Mol. Med. – 1995. – Vol. 1. – P.781-788.*
15. *Sen Wang S., Diao N.,1 Lu C. et al. Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population // PLoSOne. – 2012. – Vol. 7 (12): e51338.*
16. *Whittaker E., Gordon A., Kampmann B. Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFNγ? // PLoSONE. –.2008. – Vol 3 12): e3901.*

Сведения об авторах

***Авербах Михаил Михайлович** – главный научный сотрудник ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: 119311, г. Москва, ул. Строителей, д. 6, корп.1, кв. 12.
Телефон (499) 785-90-72; факс (499) 785-91-08
e-mail: amm50@mail.ru

***Панова Людмила Владимировна** – старший научный сотрудник ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: 141078, Московская область, г. Королев, пр. Королева, д.3 а, кв.30.
Телефон (499) 785-90-05; факс (499) 785-91-08
e-mail: detstvocniit@mail.ru

***Губкина Марина Федоровна** – ведущий научный сотрудник детско-подросткового отдела ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785-90-27; факс (499) 785-91-08
e-mail: detstvocniit@mail.ru

***Овсянкина Елена Сергеевна** – заведующая детско-подростковым отделом ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук, профессор*
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785-90-05; факс (499) 785-91-08
e-mail: detstvocniit@mail.ru

УДК 616.24-002.5:616-091.8

ПРИЗНАКИ ДИФФУЗНОГО АЛЬВЕОЛЯРНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПРИ ВЫСОКИХ ПОКАЗАТЕЛЯХ СИНДРОМА СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННО–УСТОЙЧИВЫМ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЕГКИХ

Л.Н. Лепеха, О.Г. Комиссарова, Р.Ю. Абдуллаев, В.В. Ерохин
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

SIGNS OF DIFFUSIVE ALVEOLAR DAMAGE IN HIGH INDICES OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROME IN PATIENTS WITH DRUG–RESISTANT PULMONARY TUBERCULOSIS

L.N. Lepekha, O.G. Komissarova, R.Yu. Abdullaev, V.V. Erokhin

У 36 оперированных больных деструктивным туберкулёзом легких с МЛУ МБТ изучен характер тканевых и клеточных реакций респираторного отдела при разной выраженности синдрома системного воспалительного ответа (ССВО). Установлено, что при резко выраженном ССВО имеет место обширное специфическое поражение легочной ткани с преобладанием экссудативно-альтеративной реакции, развитием обширного серозно-фибринозного воспаления в свободных от казеоза участках паренхимы, где можно наблюдать: деструкцию компонентов воздушно-кровяного барьера; нарушение выработки легочного сурфактанта альвеолоцитами 2-го типа; метаплазию плоского альвеолярного эпителия в кубический; появление значительного количества липофагов и эритрофагов, эозинофильного материала и нитей фибрина в составе внутриальвеолярного содержимого. Полученные данные свидетельствуют о корреляции основных показателей ССВО со структурными изменениями микроциркуляции, тканевыми и клеточными реакциями респираторного отдела и указывают на возможность развития ДАП у больных с остропрогрессирующим деструктивным туберкулёзом легких, вызванном МБТ с МЛУ.

Ключевые слова: *туберкулёз легких с МЛУ МБТ, синдром системного воспалительного ответа, нарушения микроциркуляции, диффузное альвеолярное повреждение.*

The features of the tissue and cellular responses of the respiratory system at different severity of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) were studied in 36 operated patients with destructive pulmonary MDR TB. It was found that extensive specific lesion of the lung tissue with predominance of exudative alterative reaction and development of extensive seroplastic inflammation in parenchyma areas, free from caseation, took place in a pronounced SIRS. The destruction of air-blood barrier components, dysfunction of pulmonary surfactant production by the type 2 alveolocytes, metaplasia of flat alveolar epithelium in the cube one, appearance of a significant number of lipophages and erythrophages, eosinophilic material and comprising strands of fibrin in the intra-alveolar content could be observed. The findings suggest that the correlation of the main SIRS indicators with structural changes of microcirculation, the tissue and cellular responses of the respiratory system exists, and indicate the possibility of the diffusive alveolar damage development in patients with acute progressing of destructive pulmonary tuberculosis caused by MDR MBT.

Keywords: *pulmonary tuberculosis, MDR MBT, systemic inflammatory response syndrome, microcirculation dysfunction, diffuse alveolar damage.*

Введение

Низкая эффективность терапевтических методов лечения больных туберкулёзом легких с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) микобактерий туберкулёза (МБТ) способствует прогрессированию деструктивных форм заболевания, создает постоянную угрозу рецидива процесса, а в ряде случаев и жизни больного.

Прогрессирование специфического воспалительного процесса в легочной паренхиме сопровождается структурно-функциональными изменениями респираторного отдела (отек, ателектаз и др.), которые приводят к развитию дыхательной недостаточности, осложняют течение и исход заболевания [6]. Описаны клинико-морфологические проявления острого повреждения легких (*т.н. острый респираторный дистресс-синдром взрослых – ОРДСВ*) у больных казеозной пневмонией [2], отмечены различные признаки развития диффузного альвеолярного повреждения (ДАП), образования гиалиновых мембран в ряде случаев остро прогрессирующего диссеминированного туберкулёза легких [5].

Диффузное альвеолярное повреждение – универсальная реакция респираторного отдела легких в ответ на глубокое повреждение микроциркуляторного русла различными токсическими агентами [7]. Среди них важная роль отводится легочным инфекциям (вирусы, бактерии, микоплазмы, пневмоцисты и др.), которые оказывают как прямое воздействие на эндотелиальные клетки, так и опосредованное, через активацию различных компонентов синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) – защитного механизма макроорганизма в ответ на проникновение возбудителя в кровеносное русло [8, 9]. Секвестрированные лейкоциты высвобождают активные формы кислорода, различные протеазы, гидролазы, которые вызывают деструкцию эндотелиальных и эпителиальных клеток воздушно-кровяного барьера, повышение проницаемости его мембран для различных компонентов крови, разрушение альвеолярного сурфактанта и избыточное накопление жидкости в интерстиции и альвеолярном пространстве. Очевидно, что степень повреждения микроциркуляторного русла и выраженность проявлений ДАП могут варьировать в зависимости от массивности и длительности персистирования возбудителя, в частности МБТ, в организме. В этой связи большой практический интерес представляют случаи лекарственно-устойчивого туберкулёза легких у больных с высокими показателями ССВО из-за возможного риска развития ДАП, которое является морфологическим субстратом ОРДСВ.

Цель исследования: изучить тканевые и клеточные реакции респираторного отдела при различной выраженности показателей ССВО у больных деструктивным туберкулёзом легких, вызванным МЛУ МБТ.

Материалы и методы

В исследование включены 36 больных, оперированных в отделе хирургии Центрального НИИ туберкулёза РАМН (руководитель отдела – доктор медицинских наук М.А. Багиров) по поводу деструктивных форм туберкулёза легких с МЛУ МБТ: фиброзно-кавернозного туберкулёза (ФКТ, 25 чел.), множественных туберкулем (МТ, 6 чел.), казеозной пневмонии (КП, 5 чел.) Среди них преобладали мужчины (84%), преимущественно молодого и среднего возраста (69%). В крови всех больных перед операцией для оценки выраженности ССВО определяли комплекс наиболее информативных его маркеров: С-реактивного белка (СРБ), сывороточного амилоидного белка А (САБ), α1-антитрипсина (α1-АТ), гаптоглобина (ГП) и фибриногена [4]. Состояние плазменной системы гемостаза оценивали по общепринятым показателям свертывающей, антисвертывающей и фибринолитической систем крови [3]. Статистическую обработку полученных данных проводили по программе ExcelXP. Статистически значимыми различия признавались при $p < 0,05$).

Для морфологического исследования кусочки легкого фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, заключали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по ван Гизону. Кроме того, легочную ткань 10 больных ФКТ подготавливали для изучения на полутонких срезах. Для этого из операционного материала вырезали фрагменты величиной около 2 × 3 мм, фиксировали 2,5-3,0 часа в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 м кокодилатном буфере (pH 7,2-7,4), 1 час дофиксировали 1% OsO_4 на том же буфере. После промывания материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, окиси пропилена и заключали в эпон-аралдит общепринятым способом. Полутонкие срезы получали на ультратоме LKB-8800 (Швеция), окрашивали 1,0% раствором толуидинового или метиленового синего и просматривали в световом микроскопе «Olimpus-1000» с иммерсией.

Результаты и их обсуждение

При морфологическом исследовании у всех больных деструктивным туберкулёзом легких с МЛУ МБТ имели место признаки прогрессирования очагов специфического воспаления, характер и распространенность которых коррелируют с показателями реактантов острой фазы. Так, основную группу наблюдения составили 25 больных (80% – ФКТ, 12% – КП, 8% – МТ), у которых содержание СБР и САБ в крови увеличено в десятки раз, а их средние величины достигают 87,2±6,2 мг/л (в норме < 3 мг/л) и 181,6±8,6 мг/л (в норме < 10 мг/л) соответственно. У всех больных этой группы наблюдается достоверное повышение активности α1-АТ (2,85±0,09 мг/мл; в норме 1,69±0,02 мг/мл), ГП (4,0±0,2 г/л; в норме 1,15±0,03 г/л) и фибриногена (5,3±0,3 г/л; в норме 3,15±0,13г/л). У остальных

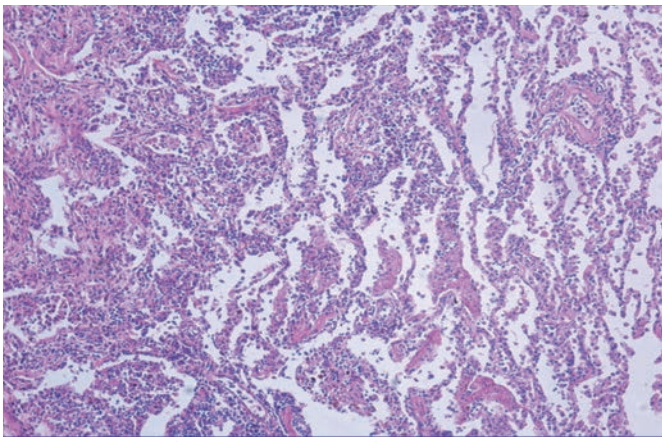


Рис.1. ФКТ. Перифокальная неспецифическая пневмония у больного с высокими показателями синдрома системного воспалительного ответа. Окраска гематоксилином и эозином; × 150.

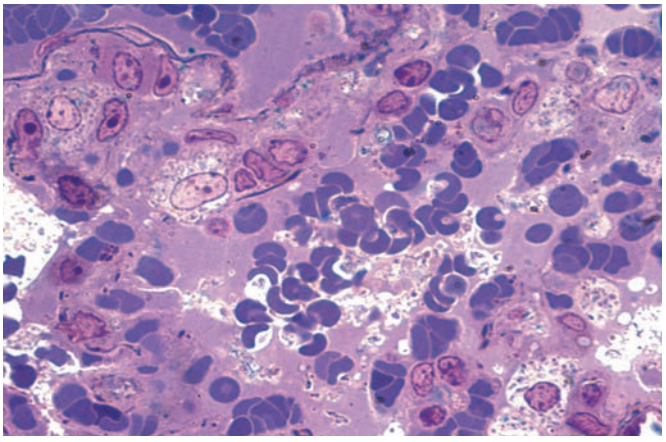


Рис.2. Скопления эритроцитов и макрофагов в свободных от очагов казеоза участках паренхимы. Полутонкий срез, окраска толуидиновым синим; × 1000.

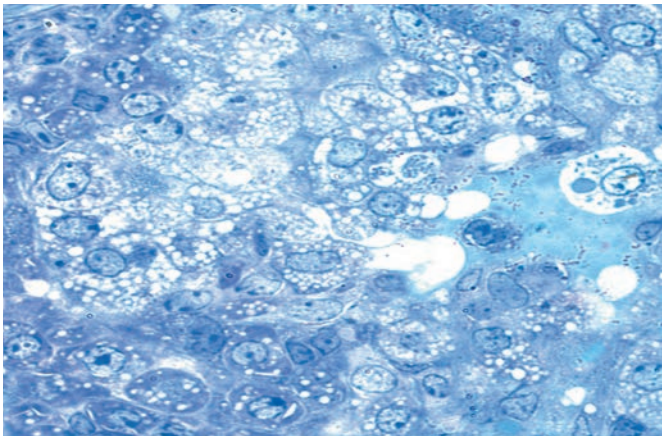


Рис.3. Зона внутриальвеолярного отека с деструкцией альвеолярного эпителия в свободных от очагов казеоза участках паренхимы. Полутонкий срез, окраска метиленовым синим; × 1000.

11 пациентов (54,5% – МТ, 45,5% – ФКТ) степень ССВО была менее выражена, о чем свидетельствовали достоверно низкие значения показателей ССВО по сравнению с основной группой. Эти больные составили группу сравнения.

У всех больных основной группы признаки острого прогрессирования очагов туберкулёза морфологически проявлялись широким слоем казеозного некроза, окруженного рыхлым слоем грануляционной ткани, содержащей небольшое число многоядерных макрофагов, единичные эпителиоидноклеточные гранулемы. Перифокально и в отдаленных участках легочной паренхимы имелись множественные очаги-отсевы. Признаки организации в них были выражены слабо, казеозные массы содержали полинуклеары и их фрагменты. Очаги казеоза имели тенденцию к слиянию между собой, формируя более крупные фокусы деструкции, что отражало прогрессирование ФКТ по типу казеозной пневмонии. При этом в перифокальной зоне воспаления наблюдалась характерная для основной группы экссудативно-альтеративная тканевая реакция, тогда как в группе сравнения – экссудативно-продуктивная, с выявлением хорошо выраженных эпителиоидноклеточных и макрофагальных гранулем, участков воздушной альвеолярной паренхимы. У больных с высокими показателями ССВО значительная часть альвеол здесь была полностью заполнена серозной жидкостью, определялись нити и сгустки фибрина, клеточные элементы воспаления, в том числе нейтрофильные лейкоциты (как при неспецифической пневмонии) (рис.1).

Обширные зоны внутриальвеолярного отека наблюдали у больных основной группы и в более отдаленных, свободных от очагов казеоза периферических участках паренхимы, где альвеолы содержали фибриноидный малоклеточный экссудат и/или скопления эритроцитов и макрофагов-эритрофагов (рис.2).

В ряде случаев определяли нити фибрина и рыхлые эозинофильные массы; в то же время образование сформированных гиалиновых мембран наблюдать не удалось. Межальвеолярные перегородки были утолщены за счет полнокровия капиллярной сети, интерстициального отека и инфильтрации клеточными элементами воспаления, среди которых имелись полиморфноядерные лейкоциты. В этих же участках выявлены выраженные деструктивные изменения альвеолярного эпителия (рис.3).

Характерно, что разрушению и слущиванию во внутриальвеолярное пространство подвергались не только наиболее чувствительные к туберкулёзной инфекции альвеолоциты 1-го типа, но и вырабатывающие сурфактант альвеолоциты 2-го типа. Значительная часть альвеолярной поверхности была представлена кубическим эпителием, содержащим единичные секреторные гранулы. Крупные, функционально активные альвеолоциты 2-го типа выявляли заметно реже и, помимо осмиофильных пластинчатых телец, они часто имели включения нейтральных липидов (рис. 4), что является струк-

турным отражением характерных для прогрессирующего туберкулёза биохимических нарушений в системе легочного сурфактанта [1].

Этот же материал определяли в фагосомах альвеолярных макрофагов-липофагов. Последние могли достигать крупных размеров и имели характерную пенистую цитоплазму и образовывали крупные скопления (рис. 5).

Характерные фагосомные вакуоли выявляли в альвеолярных макрофагах в зонах отека и отложений фибрина. Здесь особенно часто можно видеть многоядерные макрофаги с большим числом очень крупных, видимых в световом микроскопе, темных включений, очевидно, липопротеидной природы.

При гистологическом исследовании микроциркуляторного русла у больных основной группы выявлены признаки выраженного васкулита и панваскулита с характерной полиморфноклеточной инфильтрацией нейтрофильными и эозинофильными лейкоцитами, гистиоцитами и зрелыми плазматическими клетками. Для эндотелия характерно развитие внутриклеточного отека, вакуолизация цитоплазмы; имели место очаговая десквамация и/или пролиферация эндотелиоцитов, периваскулярный фиброз (рис. 6). Во многих сосудах, в том числе в свободной от очагов паренхиме, формируются пристеночные и обтурирующие просвет тромбы.

Исследование показателей плазменной системы гемостаза показало, что у больных данной группы по сравнению с группой сравнения имеет место более выраженный гиперкоагуляционный сдвиг. Об этом свидетельствуют достоверно более высокие значениям концентрации фибриногена (5,2±0,3 и 3,4±0,2 г/л при норме 3,15±0,13 г/л; $p<0,01$), фибринстабилизирующего фактора (118,5±3,9 и 99,2±4,5% при норме 89,0±4,5%; $p<0,01$), растворимых комплексов фибрин-мономера (230,7±9,1 и 135,0±7,2 мг/л при норме 35,0±0,12 мг/л; $p<0,01$) и значительное удлинение времени лизиса (397,0±5,4 и 210,0±7,0 сек при норме 169,0±12,0 сек.; $p<0,01$).

Заключение

Морфологическое исследование резецированной легочной ткани больных деструктивным туберкулёзом легких с МЛУ МБТ позволило выявить ряд особенностей развития тканевых и клеточных реакций респираторного отдела, характерных для острого прогрессирования заболевания у больных с резко выраженным синдромом ССВО. Среди них первостепенное значение имеет обширность специфического поражения легких, для которого экссудативно-альтеративная реакция является преобладающей. Некроз тканей в очаге туберкулёзной инфекции сопровождается развитием обширного серозно-фибринозного воспаления в свободных от казеоза участках паренхимы, где можно наблюдать те или иные проявления ДАП различной степени выраженности: деструкцию компонентов воздушно-кровяного барьера; нарушение

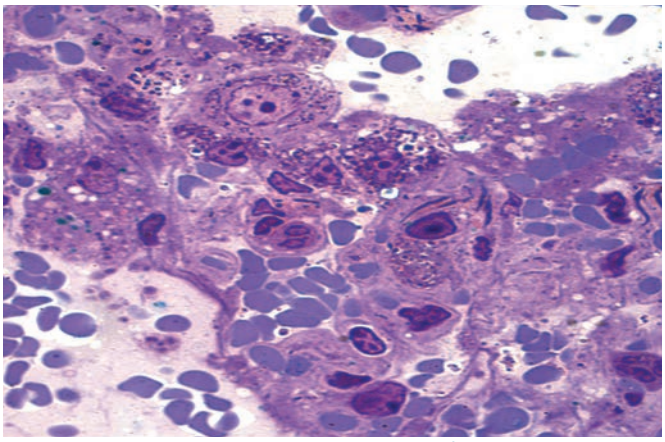


Рис.4. Крупные альвеолоциты 2-го типа, содержащие осмиофильные пластинчатые тельца и включения нейтральных липидов в свободных от очагов казеоза участках паренхимы.
Полутонкий срез, окраска толуидиновым синим; × 1000.

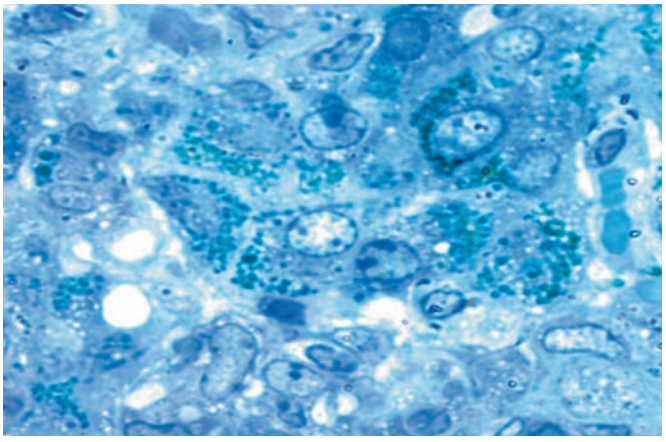


Рис.5. Скопления альвеолярных макрофагов, содержащих в цитоплазме гранулы нейтральных липидов.
Полутонкий срез, окраска метиленовым синим; × 1000.

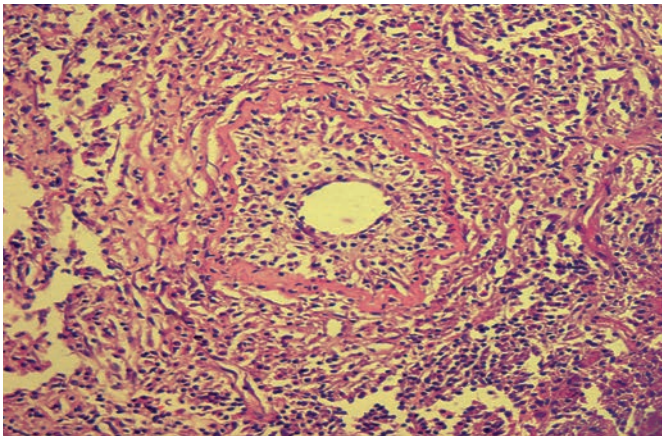


Рис.6. Панваскулит с отеком эндотелия, полиморфноклеточной инфильтрацией субэндотелиального и периваскулярного пространства в легочной ткани у больного с высокими показателями синдрома системного воспалительного ответа.
Окраска гематоксилином и эозином; × 200

выработки легочного сурфактанта альвеолоцитами 2-го типа; метаплазию плоского альвеолярного эпителия в кубический; появление среди альвеолярных макрофагов значительного количества липофагов и эритрофагов; выявление эозинофильного материала и нитей фибрина в составе внутриальвеолярного содержимого. Вместе с тем, характерного формирования гиалиновых мембран не было отмечено, что может быть связано с дефицитом альвеолярного сурфактанта у больных ФКТ и КП, составлявших основную группу наблюдения. Выраженность деструктивных изменений респираторного отдела у этих больных коррелирует с глубиной повреждения микроциркуляторного русла. Деструкция стенок сосудов приводит к снижению функционального статуса эндотелиальной выстилки, гиперкоагуляционному синдрому. Отмеченные нарушения сосудистого русла носят диффузный характер, определяют признаки развития ДАП, причиной которого является бактериальная токсемия при длительном персистировании в организме больного МБТ с МЛУ.

Литература

1. *Ерохин В.В., Лепеха Л.Н. Сурфактант и инфекция. – М.: ЦНИИТ РАМН. – 2004. – 131 с.*
2. *Ерохин В.В., Лепеха Л.Н., Карпина Н.Л. и др. Морфологические признаки острого повреждения легких у больных казеозной пневмонией // Пробл. туберкулёза. – 2006. – № 10. – С. 43-47.*
3. *Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. – М., 2007.*
4. *Комиссарова О.Г., Абдуллаев Р.Ю., Лепеха Л.Н., Ерохин В.В. Лекарственно-устойчивый туберкулёз легких при различной интенсивности синдрома системного воспалительного ответа. – М.: ИПО «У Никитских ворот», 2013. – 168 с.*
5. *Михайловский А.М., Лепеха Л.Н., Сазыкин В.Л. Частота выявления и признаки диффузного альвеолярного повреждения при остропрогрессирующем туберкулёзе легких и его сочетании с ВИЧ-инфекцией // Пробл. туберкулёза. – 2013. – № 2. – С. 56-59.*
6. *Фтизиатрия. Национальное руководство / Под ред. акад. РАМН М.И. Перельмана. – М.,2007. – 506 с.*
7. *Черняев А.Л., Самсонова М.В. Диффузное альвеолярное повреждение: этиология, патогенез и патологическая анатомия // Пульмонология. – 2005. –№ 4. – С. 65-69.*
8. *Gando S. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and endothelial cell injury // Nippon Rinsho. – 2004. – Vol. 62. – P. 2244-2250.*
9. *Nystrom P.O. The systemic inflammatory response syndrome, definitions and aetiology //J. Antimicrob. Chemother. – 1998. – Vol. 41, suppl. A. – P. 1-7.*

Сведения об авторах

Лепеха Лариса Николаевна *– заведующая лабораторией патоморфологии и электронной микроскопии, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, доктор биологических наук, профессор*
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон/факс: (499) 785-91-79
e-mail: lep3@yandex.ru

Комиссарова Оксана Геннадьевна *– старший научный сотрудник отдела фтизиатрии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, кандидат медицинских наук*
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон/факс: (499) 748-30-23
e-mail: okriz@rambler.ru

Абдуллаев Ризван Юсиф Оглы *– заведующий биохимической лабораторией, ведущий научный сотрудник ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук*
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон/факс: (499) 748-30-23
e-mail: rizalla@mail.ru

Ерохин Владислав Всеволодович *– заведующий отделом патологической анатомии, электронной микроскопии и биохимии, директор ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН*
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон/факс: (499) 785-90-19
e-mail: office_cniit@mail.ru

УДК 57.083.1:579.871.9:577.212:616-002.5

СРАВНЕНИЕ КАРТРИДЖНОЙ ТЕХНОЛОГИИ XPERT MTB/RIF С МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

С.Н. Андреевская, Т.Г. Смирнова, Е.Е. Ларионова, М.В. Буракова, И.А. Васильева, Л.Н. Черноусова
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва

COMPARISON OF XPERT MBT/RIF CARTRIDGE TECHNOLOGY WITH MICROBIOLOGICAL METHODS FOR MBT DETECTION AND DRUG SUSCEPTIBILITY TESTING

S.N. Andreevskaya, T.G. Smirnova, E.E. Larionova, M.V. Burakova, I.A. Vasiljeva, L.N. Chernousova

С целью сравнения результатов выявления МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину с использованием тест-системы Xpert MTB/RIF и классическими микробиологическими методами было исследовано 104 образца мокроты, полученных от больных туберкулезом легких из клиники ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН. Кроме того, в задачу исследования входило изучение влияния концентрирования диагностических образцов на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF. Показано, что Xpert MTB/RIF являлся наиболее чувствительным, так как был положительным в 78,2% случаев, по сравнению со световой микроскопией нативной мокроты, выявляющей 48,5% случаев, люминесцентной микроскопией осадка мокроты – 67,3%, культуральным исследованием на среде Левенштейна-Йенсена – 56,4% и на BACTECMGIT 960 – 71,3%. Концентрирование образца мокроты не оказывало существенного влияния на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF. Образцы, в которых были выявлены НТМ, при использовании теста Xpert MTB/RIF были зафиксированы как отрицательные, что свидетельствует о высокой специфичности метода. Было показано полное совпадение результатов определения устойчивости к рифампицину на биологических микрочипах и в системе Xpert MTB/RIF.

Ключевые слова: *технология Xpert MTB/RIF, сравнение с данными микробиологических исследований BACTECMGIT 960*

104 sputum samples obtained from the patients with pulmonary tuberculosis in the Central Research Institute for Tuberculosis of the Russian Academy of Medical Sciences were studied in order to compare the results of MBT detection and identification of drug susceptibility to rifampicin using test system Xpert MBT/RIF and classical microbiological methods. In addition, the aim of the research was to study the effect of concentrating of diagnostic specimens to an increase of the test Xpert MBT/RIF sensitivity. The Xpert MBT/RIF demonstrated most sensitivity with positive results in 78,2% of cases to compare with the native light microscopy of sputum, detecting 48,5% of cases, fluorescent microscopy of sputum sediment – 67,3%, cultural method with Lowenstein-Jensen medium – 56,4% and on BACTEC MGIT 960 – 71,3%.Concentration of sputum samples had no significant effect on the increase of the test sensitivity. Samples with identified non-tuberculous mycobacteria by the test Xpert MTB/RIF were recorded as negative ones, showing high specificity of the method. Complete coincidence of the results of rifampicin resistance detection using biological microchips and the system Xpert MBT/RIF was found.

Keywords: *Xpert MBT/RIF technology, comparison with the data of microbiological examination on BACTEC MGIT 960.*

Введение

В Российской Федерации за последнее десятилетие зарегистрирован неуклонный рост туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ). Так с 2004 по 2012 гг., на фоне снижения заболеваемости (с 83,3 до 68,1 случаев на 100 тыс. населения) и распространенности туберкулеза (с 218,3 до 157,7 случаев на 100 тыс. населения), распространенность МЛУ-ТБ выросла почти в 2 раза (с 14,2 до 24,6 на 100 тыс. населения) [1, 2]. Быстрое выявление МЛУ-ТБ необходимо для своевременного распределения потоков поступающих больных (МЛУ / не-МЛУ) и направления их в специализированные отделения, где они будут получать оптимальную терапию. Для ускоренного выявления МЛУ-ТБ в настоящее время широко применяют молекулярно-генетические методы, направленные на выявление мутаций в геноме микобактерий туберкулеза (МБТ), обусловливающих устойчивость

к рифампицину и изониазиду, а нередко и только к рифампицину, так как устойчивость к рифампицину считается надежным индикатором МЛУ МБТ.

Тест Xpert MTB/RIF™, проводимый с помощью анализатора GeneXpert™ (Cepheid, США) – это новый полностью автоматизированный метод молекулярной диагностики для выявления ДНК МТБ и определения устойчивости к рифампицину. Данный тест был одобрен ВОЗ в декабре 2010 г. Тест Xpert MTB/RIF основан на полимеразной цепной реакции (ПЦР). В нем используется картридж с системой замкнутого цикла, благодаря чему можно одновременно выявлять ДНК МБТ и определять устойчивость к рифампицину через 2 часа после получения диагностического материала от больного.

Цель работы – сравнение результатов выявления МБТ и определения чувствительности к рифампицину с использованием тест-системы Xpert MTB/RIF, классическими микробиологическими методами (микроскопия нативного и концентрированного образцов мокроты, культуральное исследование образцов на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена) и в системе автоматического определения роста BACTEC MGIT 960 (BD, США), а также изучение влияния концентрирования диагностических образцов на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF.

Материалы и методы

Диагностический материал. 104 образца мокроты от больных туберкулезом легких из клиники Центрального НИИ туберкулеза РАМН. Все исследования проводили из одной и той же порции диагностического материала.

Микроскопия с окраской по Ziehel-Neelsen. Для данного исследования использовали нативную мокроту. Приготовление растворов для окраски и процедуру окрашивания проводили согласно Приказу Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3]. Исследовали мазки с помощью микроскопа Olympus CKX 41 с увеличением 1000×.

Микроскопия с окраской люминесцентными красителями проводилась из осадка мокроты, предварительно разжиженной и деконтаминированной раствором BBLMycoPrepNALC-NaOH (BD, США). Мазки окрашивали аурамином ОО и родамином С (Приказ Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3]). Микроскопию мазков осуществляли при помощи микроскопа Olympus CKX 41 с увеличением 400×.

Выявление МБТ на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) осуществляли при культивировании осадка мокроты, предварительно разжиженной и деконтаминированной раствором BBLMycoPrepNALC-NaOH (BD, США), согласно Приказу Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3].

Культуральный метод выявления МБТ на жидких средах в системе BACTEC MGIT 960 (BD, USA) проведен согласно стандартному протоколу изготовителя [4]. Все положительные культуры подвергали контролю на видовую специфичность (принадлежность к МБТ). Для определения кислотоустойчивости выросшей культуры проводили микроскопию мазков по Ziehel-Neelsen [3]. Если в положительной пробирке MGIT подтверждалось присутствие кислотоустойчивых бактерий, проводили иммунохроматографический экспресс-тест BD MGIT TB с ID для качественного определения антигена комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (МБТК) MPT64. Тест проводили согласно инструкции изготовителя. При положительном результате теста делается вывод о присутствии в образце МБТК. При отрицательном результате теста и положительном результате микроскопии с окраской по Ziehel-Neelsen делали вывод о наличии кислотоустойчивых бактерий, не относящихся к МБТК. В этом случае использовали ДНК-стриповую технологию (HainLifescience), включающую два вида тестов для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий (НТМБ): GenoType Mycobacterium CM/AS. Исследование проводили согласно инструкции изготовителя. Для контроля роста в системе BACTEC MGIT 960 неспецифической микрофлоры проводили посев культуры на кровяной агар. При наличии роста микроорганизмов на кровяном агаре через 24 часа инкубации при 37°С делали вывод о контаминации исследуемого материала неспецифической микрофлорой.

Определение лекарственной чувствительности МБТ методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена проводили согласно Приказу Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 [3].

Определение лекарственной чувствительности МБТ с использованием автоматизированной системы BACTECMGIT 960 к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда осуществляли согласно стандартному протоколу производителя (BD, США) [4].

Выявление МБТ и определение чувствительности к рифампицину с использованием теста XpertMTB/RIF. Исследование выполняли с помощью набора реагентов и картриджей Xpert MTB/RIF на анализаторе GeneXpert (Cepheid, США), согласно инструкции изготовителя. Для исследования использовали как образцы нативной мокроты, так и осадок мокроты, предварительно разжиженной и деконтаминированной раствором BBLMycoPrepNALC-NaOH (BD, США).

Определение чувствительности к изониазиду и рифампицину на биологических микрочипах осуществляли с использованием набора «ТБ-биочип» (ООО Биочип, Россия), согласно инструкции изготовителя. Выделение ДНК проводили в роботизированной системе для автоматического раскапывания жидкостей EVO 150 (TECAN, Швеция) с набором реагентов «М-Сорб-Туб-Автомат» (НПК «Синтол», Россия) согласно инструкции изготовителя. Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклере «Терцик» (ДНК-Технология, Россия), инкубацию биочипов для осуществления гибридизации проводили в гибридизационной печи LabLine

Табл. 1. Несовпадения при выявлении МБТ с использованием теста Xpert MTB/RIF

№ культуры	Результат выявления					
	Xpert MTB/RIF		Световая микроскопия нативной мокроты	Люминесцентная микроскопия осадка мокроты	Посев на среду Л-Й	BACTEC MGIT 960
	нативная мокрота	осадок мокроты				
8 CDC	+	–	–	**9 КУМ**	–	–
27 CDC	+	–	–	–	–	–
56 CDC	–	+	–	–	+	+
98 CDC	–	+	–	–	–	+

– – отрицательный результат
+ – положительный результат

(LabLine, США), визуализацию результатов осуществляли с использованием чип-детектора и программного обеспечения, разработанного ООО «Биочип».

Результаты

Сравнение выявления МБТ с использованием теста Xpert MTB/RIF и микробиологическими методами. При микроскопии нативного образца мокроты, окрашенного по Ziehel-Neelsen, в 54 образцах не было обнаружено КУМ, в шести образцах визуализировались единичные КУМ, в 14 образцах содержание КУМ соответствовало «1+», в 13 – «2+» и в 17 – «3+». Таким образом, методом световой микроскопии было выявлено 50 образцов, содержащих КУМ.

Микроскопия осадка мокроты с окраской люминесцентными красителями выявила 72 образца, содержащие КУМ. Из них в 10 случаях визуализировались единичные КУМ, содержание КУМ на «1+» было выявлено в 13 образцах, на «2+» – в 14 образцах и на «3+» в 35 образцах.

При культивировании диагностических образцов на среде Левенштейна-Йенсена не было получено роста культуры в 44 случаях, в трех были зафиксированы проросты вследствие контаминации посторонней микрофлорой. Для 57 образцов мокроты был получен специфический рост на среде.

При исследовании клинического материала в системе автоматической регистрации роста BACTEC MGIT 960 32 образца были зарегистрированы как отрицательные, 72 – как положительные. Идентификация культур показала, что три из них представляли собой НТМБ (одна культура *M. avium* и две культуры *M. kansasii*).

При тестировании образцов мокроты в анализаторе GeneXpert с тест-системой Xpert MTB/RIF было выявлено по 77 положительных образцов, как при использования для анализа нативной мокроты, так и при работе с осадком мокроты. В четырех случаях результаты выявления МБТ в нативной мокроте и в осадке не совпали: два образца, зафиксированные как положительные при анализе нативной мокроты, были отрицательны при работе с осадком, а еще два образца, наоборот, были положительными при анализе осадка мокроты, но отрицательными в случае исследования нативной мокроты (табл.1).

При сравнении не совпавших результатов теста Xpert MTB/RIF, полученных при разных способах обработки образцов, с бактериологическими методами было показано, что положительный результат в двух случаях (образцы 8 CDC и 98 CDC) был получен только одним из бактериологических методов, а для образца 27 CDC положительным был только тест Xpert MTB/RIF. Полученные результаты свидетельствуют о низком содержании МБТ в образце и отражают вероятностный процесс попадания в анализ микобактериальных клеток. Однозначного влияния концентрирования мокроты на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF не отмечено.

Если учитывать суммарный результат теста, т.е. считать его положительным, если положительное значение было получено при анализе хотя бы одного из вариантов образца, то использование Xpert MTB/RIF позволило выявить 79 положительных образцов. Далее при сравнении результатов теста Xpert MTB/RIF с микробиологическими методами будут учитываться суммарные результаты теста.

При сравнении чувствительности методов из анализа были исключены образцы, представленные НТМБ. Положительные результаты бактериоскопии считали специфическими только при их подтверждении культуральными исследованиями или тестом Xpert MTB/RIF. Поэтому число положительных результатов световой микроскопии снизилось на один, т.к. в этом образце была обнаружена *M. avium*, а число положительных результатов люминесцентной микроскопии осадка мокроты сократилось на четыре, так как в одном случае также была выявлена *M. avium*, а в трех случаях результат не был подтвержден ни одним методом, что свидетельствовало о наличии в мазке посторонней кислотоустойчивой флоры. Результаты сравнения чувствительности методов представлены в таблице 2.

Сравнение результатов выявления МБТ разными методами показало, что суммарно тест Xpert MTB/RIF выявил дополнительно 30 положительных образцов по сравнению с микроскопическим исследованием нативного образца мокроты, 11 образцов по сравнению с люминесцентной микроскопией осадка, 22 по сравнению с результатами посева на среду Левенштейна-Йенсена и 7 – по сравнению с исследованием в системе BACTEC MGIT 960.

Табл. 2. Сравнение чувствительности методов выявления МБТ

Метод	Число положительных результатов (из 101 образца)	% выявления
Световая микроскопия нативной мокроты	49	48,5
Люминесцентная микроскопия осадка мокроты	68	67,3
Культуральное исследование на среде Левенштейна-Йенсена	57	56,4
Культуральное исследование в системе BACTEC MGIT 960	72	71,3
Тест Xpert MTB/RIF (нативная мокрота)	77	76,2
Тест Xpert MTB/RIF (осадок мокроты)	77	76,2
Тест Xpert MTB/RIF (суммарные результаты)	79	78,2

Только в одном случае результаты теста Xpert MTB/RIF были отрицательным при положительном результате BACTEC MGIT 960 (результаты бактериоскопии и культурального исследования на среде Левенштейна-Йенсена были для этого образца также отрицательными).

Таким образом, было показано, что тест Xpert MTB/RIF наиболее чувствителен среди всех представленных методов, особенно по сравнению с бактериоскопией нативной мокроты и культуральным исследованием на среде Левенштейна-Йенсена.

Следует отметить, что образцы, в которых были выявлены НТМБ, при использовании теста Xpert MTB/RIF были расценены как отрицательные, что свидетельствует о высокой специфичности метода.

Сравнение определения чувствительности к рифампицину с использованием теста Xpert MTB/RIF и культуральными методами. Анализ определения устойчивости к рифампицину с использованием теста Xpert MTB/RIF показал, что результаты, полученные для нативной мокроты и для осадка мокроты, полностью совпадали между собой для каждого образца. Суммарно этим методом было определено, что 24 положительных образца чувствительны, а 55 – устойчивы к рифампицину.

Сравнение определения чувствительности к рифампицину методом Xpert MTB/RIF и культуральными методами показало идентичные результаты.

Расхождения были обнаружены в случае несовпадения культурального определения лекарственной чувствительности к рифампицину методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена и в системе BACTEC MGIT 960. Так, для одного образца, определенного тестом Xpert MTB/RIF как устойчивый к рифампицину, устойчивость была подтверждена методом абсолютных концентраций, но в системе BACTEC MGIT 960 культура была определена как чувствительная к рифампицину. Для четырех образцов, чувствительных к рифампицину по тесту Xpert MTB/RIF, результат был подтвержден на BACTEC MGIT 960, но методом абсолютных концентраций культуры были определены как устойчивые к рифампицину.

Для этих пяти спорных образцов, а также для восьми образцов, положительных по данным теста Xpert MTB/RIF (три устойчивых и пять чувствительных к рифампицину), но отрицательных при проведении культуральных исследований, в целях подтверждения полученных результатов были определены мутации на биологических микрочипах «ТБ-биочип» и было показано полное совпадение результатов, полученных этими методами.

Кроме того, для всех образцов (за исключением одного), которые по результатам теста Xpert MTB/RIF были устойчивы к рифампицину, культуральными методами была выявлена устойчивость к изониазиду, что подтверждает возможность использования устойчивости к рифампицину в качестве маркера МЛУ МБТ.

Заключение

При сравнении результатов выявления МБТ и определения лекарственной чувствительности к рифампицину с использованием тест-системы Xpert MTB/RIF и классическими микробиологическими методами на 104 образцах мокроты больных туберкулезом легких (диагностированном на основании клинических и рентгенологических данных) показано, что тест Xpert MTB/RIF являлся наиболее чувствительным, так как был положительным в 78,2% случаев, по сравнению со световой микроскопией нативной мокроты (48,5% положительных результатов), люминесцентной микроскопией осадка мокроты (67,3%), культуральным исследованием на среде Левенштейна-Йенсена (56,4%) и на BACTEC MGIT 960 (71,3%). Концентрирование образца мокроты не оказывало существенного влияния на повышение чувствительности теста Xpert MTB/RIF.

Образцы, в которых были выявлены НТМБ, при использовании теста Xpert MTB/RIF были расценены как отрицательные, что свидетельствует о высокой специфичности метода.

Определение чувствительности к рифампицину с использованием теста Xpert MTB/RIF подтверждалось, по крайней мере, одним культуральным методом. В случае несовпадения результатов определения устойчивости к рифампицину, полученных культуральными методами, а также для образцов, положительных при использовании теста Xpert MTB/RIF, для которых не было получено культуры, проводили исследование на биологических микрочипах. Было показано полное совпадение результатов устойчивости к рифампицину на биологических микрочипах и в системе Xpert MTB/RIF.

Таким образом, в результате проведенного исследования доказана высокая степень совпадения результатов теста Xpert MTB/RIF с микробиологическими методами при выявлении МБТ и определении их лекарственной чувствительности и подтверждена высокая чувствительность теста Xpert MTB/RIF.

Работа была поддержана грантом «Влияние на лечение туберкулеза стратегии, основанной на внедрении Xpert MTB/RIF исследовании» RUB1-31073-MO-11 CRDF 2012 – 2012.

Литература

1. Туберкулез в Российской Федерации 2011 г. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – М., 2013. – 280 с. (http://www.mednet.ru/images/stories/files/CMT/tbreview2011.pdf).
2. Нечаева О.Б. Ситуация по туберкулезу и работе противотуберкулезной службы Российской Федерации в 2012 г. (http://www.mednet.ru).
3. Приказ Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
4. Siddiqi S., Rusch-Gerdes S. Руководство по работе с системой BACTEC MGIT 960, 2006.

Сведения об авторах

Андреевская Софья Николаевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, кандидат медицинских наук
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91
e-mail: andsofia@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, кандидат медицинских наук
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91

Ларионова Елена Евгеньевна – старший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, кандидат биологических наук
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91

Буракова Марина Владимировна – врач-фтизиатр, младший научный сотрудник отдела фтизиатрии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.

Васильева Ирина Анатольевна – руководитель отдела фтизиатрии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук, профессор
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
e-mail: vasil39@list.ru

***Черноусова Лариса Николаевна** – руководитель отдела микробиологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, доктор биологических наук, профессор*
Адрес: г. Москва, Яузская аллея, д. 2.
Телефон (499) 785 90 91

УДК 57.083.1:579.871.9:615.03

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ–СИСТЕМЫ «SENSITITRE»

М.В. Макарова, Ю.Д. Исаева, Е.Н. Хачатурьянц, В.И. Литвинов
ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

DRUG SUSCEPTIBILITY MYCOBACTERIA WITH TEST SYSTEMS «SENSITITRE»

M.V. Makarova, Yu.D. Isaeva, E.N. Hachaturyants, V.I. Litvinov

Своевременное назначение адекватного лечения снижает уровень и скорость появления устойчивых штаммов микобактерий. Поэтому актуальной является разработка методов раннего и достоверного определения лекарственной чувствительности. С помощью тест-системы Sensititre MycoTB исследовано 149 штаммов M. tuberculosis, выделенных из респираторного материала больных с хроническими формами туберкулезного процесса. С помощью тест-систем Sensititre SLOMyco и RAPMyco исследован 471 штамм НТМБ, выделенный от пациентов с подозрением на туберкулез или микобактериоз, принадлежащих к видам: MAC – 139, M. kansasii – 57, M. xenopi – 59, M. fortuitum group – 170 и M. chelonae group – 46.

Полученные результаты позволили сделать вывод о том, что тест-системы Sensititre имеют преимущества, связанные со стандартизацией процесса и возможностью определения степени чувствительности/устойчивости изолятов микобактерий, а также с возможностью получения сведений о спектре лекарственной чувствительности к большому числу препаратов в короткие сроки.

Ключевые слова: *лекарственная чувствительность, Mycobacterium tuberculosis, nontuberculosis mycobacteria, Sensititre.*

Timely administration of appropriate treatment reduces the level and rate of emergence of resistant strains of mycobacteria. Therefore, the actual is to develop methods for early and reliable drug susceptibility testing. With the help of test systems Sensititre MycoTB studied 149 strains of M. tuberculosis, isolated from respiratory material patients with chronic forms of tuberculosis. With the help of test systems Sensititre SLOMyco RAPMyco were tested 471 NTMB strain isolated from patients with suspected tuberculosis or mycobacteriosis belonging to species: MAC – 139, M. kansasii – 57, M. xenopi – 59, M. fortuitum group – 170 and M. chelonae group – 46.

The results allowed to conclude that the test system Sensititre have advantages associated with the standardization process and to determine the extent susceptibility/resistant isolates of mycobacteria, as well as the possibility of obtaining information about the spectrum of drug sensitivity to a large number of drugs in the short term.

Keywords: *drug sensitivity, Mycobacterium tuberculosis, nontuberculosis mycobacteria, Sensititre.*

Введение

Повсеместно отмечается рост заболеваний, вызванных микобактериями – возбудителями туберкулеза и микобактериозов. При этом одной из главных проблем является развитие устойчивости микобактерий к лекарственным препаратам. Во фтизиатрии в последние годы эта проблема стала глобальной [15]. Что касается возбудителей микобактериозов – нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), то они часто изначально (первично) устойчивы к применяемым для их лечения химиопрепаратам (в первую очередь – противотуберкулезным) [10, 13, 14].

Своевременное назначение адекватного лечения снижает уровень и скорость появления устойчивых штаммов микобактерий. Поэтому разработка методов раннего и достоверного определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) является актуальной [1, 9].

В течение многих лет ЛЧ микобактерий туберкулеза (МБТ) и НТМБ к противотуберкулезным (ПТП) и другим химиопрепаратам определяли с использованием, чаще всего, метода абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) (в соответствии с Приказом Минздрава России от 21.03.2003 г. № 109). Недостатком этого

Табл. 1. Концентрации химиопрепаратов, содержащихся в лунках тест-систем Sensititre

Антимикробный препарат	Диапазон разведений, мкг/мл		
	MycoTB	SLOMYCO	RAPMYCO
Амикацин	0,12-16	1-64	1-64
Амоксициллин/клавулановая кислота			2/1-64/32
Доксициклин		0,12-16	0,12-16
Имипенем			2-64
Изониазид	0,03-4	0,25-8	
Канамицин	0,6-40		
Кларитромицин		0,06-64	0,06-16
Линезолид		1-64	1-32
Моксифлоксацин	0,06-8	0,12-8	0,25-8
Миноциклин			1-8
Офлоксацин	0,25-32		
Парааминосалициловая кислота			0,5-64
Рифабутин	0,12-16	0,25-8	
Рифампицин	0,12-16	0,12-8	
Стрептомицин	0,25-32	0,5-64	
Триметоприм/сульфаметоксазол		0,12/2,38-8/152	0,25/4,75-8/152
Тигециклин			0,015-4
Тобрамицин			1-16
Цефепим			1-32
Цефокситин			4-128
Цефтриаксон			4-64
Ципрофлоксацин		0,12-16	0,12-4
Циклосерин	2-256		
Этамбутол	0,5-32	0,5-16	
Этионамид	0,3-40	0,3-20	

метода, в первую очередь, является длительный срок получения результатов.

Существующие молекулярно-генетические методы, основанные на обнаружении специфических для устойчивости к каждому препарату хромосомных мутаций, позволяют получить данные в короткие сроки, но до сих пор не известны все мутации, отвечающие за лекарственную устойчивость (ЛУ) [5, 6]. Поэтому молекулярно-генетические тесты могут, с одной стороны, не выявить часть случаев ЛУ, а с другой – идентифицировать мутации, которые не формируют фенотипическую устойчивость. В связи с вышесказанным, культуральные (фенотипические) методы определения ЛЧ возбудителя остаются актуальными.

Из автоматизированных систем культивирования на основе использования жидких питательных сред наиболее широко применяется система BACTEC™ MGIT™ 960 (BACTEC 960) со средой Middlebrook 7H9 (7H9), для которой разработаны критерии оценки ЛЧ/ЛУ МБТ к ряду ПТП, необходимые для разделения штаммов на чувствительные и устойчивые [1, 7, 12].

В последнее десятилетие специалисты компании TREK Diagnostic Systems разработали три тест-системы Sensititre: MycoTB (предназначенную для определения ЛЧ МБТ к ПТП первого и второго ряда одновременно), SLOMyco (для определения ЛЧ медленнорастущих НТМБ) и RAPMyco (для определения ЛЧ быстрорастущих НТМБ.) Тест-системы представляют собой полистироловые планшеты, в 96 лунках которых содержатся соответствующие лиофилизированные препараты в двукратных концентрациях, в которые вносится исследуемая культура микобактерий, инокулированная в питательный бульон [3, 4, 8, 11, 15].

Материалы и методы

С помощью тест-системы Sensititre MycoTB исследовано 149 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных из респираторного материала, поступившего на исследование в Централизованную бактериологическую лабораторию Московского городского научно-практического центра борьбы с туберкулезом (МНПЦБТ) от больных с хроническими формами туберкулеза, а с помощью тест-систем Sensititre SLOMyco и RAPMyco – 471 штамм НТМБ, выделенный от пациентов с подозрением на туберкулез или микобактериоз (из них принадлежащих к видам: MAC – 139, *M. kansasii* – 57, *M. xenopi* – 59, *M. fortuitum group* – 170 и *M. chelonae group* – 46).

Для исследования на ЛЧ использовали культуры микобактерий, выделенные как в жидкой (BACTEC 960), так и на плотной (Л-Й) питательных средах. Результаты определения чувствительности МБТ и медленнорастущих НТМБ учитывали на 7-12 день инкубации при 37°С, быстрорастущих – на 4-7 день. При этом для *M. tuberculosis* в качестве оценочного критерия использовали значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК), указывающих на ЛЧ/ЛУ к данному препарату, рекомендованные M. Abuali и соав. (2011) [3], S. Mpagama и соавт., (2013) [11], для НТМБ – Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [7]. Перечень и концентрации препаратов, к которым с помощью тест систем Sensititre можно определить чувствительность МБТ, медленно- и быстрорастущих НТМБ приведены в таблице 1.

Результаты и обсуждение

Данные, полученные при изучении ЛЧ изолятов *M. tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre MycoTB представлены в таблице 2.

Установлено, что к стрептомицину устойчивы 3/4, к изониазиду – 4/5, к рифампицину – 2/3 штаммов МБТ. К рифабутину было устойчиво около половины штаммов (около 20% устойчивых к рифампицину штаммов МБТ были чувствительны к рифабутину), к канамицину – почти половина, к амикацину – 1/3 (около 10% устойчивых к канамицину штаммов МБТ сохраняли чувствительность к амикацину), к офлоксацину – почти половина, к моксифлоксацину – 1/3 (около 10% устойчивых к офлоксацину штаммов МБТ сохраняли чувствительность

Табл. 2. Результаты определения лекарственной чувствительности штаммов M. tuberculosis (n=149) к противотуберкулезным препаратам с помощью тест-системы Sensititre MycoTB

Лекарственный препарат	Количество штаммов			
	чувствительных		устойчивых	
	абс.	%	абс.	%
Амикацин	107	71,8	42	28,2
Изониазид	27	18,1	122	81,9
Канамицин	86	57,7	63	42,3
Моксифлоксацин	103	69,1	46	30,9
Офлоксацин	85	57,0	64	43,0
ПАСК	102	68,5	47	31,5
Рифабутин	78	52,3	71	47,7
Рифампицин	45	30,2	104	69,8
Стрептомицин	39	26,2	110	73,8
Циклосерин	136	91,3	13	8,7
Этамбутол	105	70,5	44	29,5
Этионамид	91	61,1	58	38,9

к моксифлоксацину), к этионамиду – более 1/3, к ПАСК – 1/3, к этамбутолу – 1/3, к циклосерину – менее 10%. Выделенные от 11 больных культуры МБТ обладали широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), что составило 5,6% от числа обследованных.

M. Abuali и соавт. (2011) [3], при сравнении результатов определения ЛЧ 37 клинических штаммов МБТ, установили, что с помощью тест-системы Sensititre MycoTB удается получить данные, сопоставимые с таковыми при применении метода пропорций на агаровой среде Middlebrook 7H10, но в более короткие сроки. Кроме того, при использовании тест-системы Sensititre MycoTB появилась возможность определения уровня ЛЧ/ЛУ исследуемого изолята МБ. Такая информация о возбудителе очень важна для лечащего врача при выборе тактики лечения [3, 8, 11].

Результаты определения ЛЧ НТМБ к тем препаратам, для которых установлены «критические» значения МИК, позволяющие отделить чувствительные штаммы от устойчивых, представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы, большинство культур МАС были чувствительны к кларитромицину, более 70% к моксифлоксацину и более 60% к линезолиду.

Данные литературы свидетельствуют о том, что штаммы МАС, выделенные от больных, не получавших ранее лечения макролидами, как правило, к ним чувствительны. Устойчивость к макролидам у «диких» штаммов может развиться в течение нескольких месяцев терапии. Активность кларитромицина *in vitro* коррелирует с его клинической эффективностью, что не установлено в отношении ряда других препаратов, применяющихся для лечения микобактериозов, вызванных МАС, в частности этамбутола, рифампицина и клофазимина [4, 14].

Большинство ПТП проявляют в 10-100 раз меньшую активность *in vitro* в отношении *МАС*, чем в отношении *M. tuberculosis* [7, 10]. Это подтверждено и данными, полученными ранее в МНПЦБТ – при изучении ЛЧ изолятов *МАС* методом абсолютных концентраций в среде Л-Й установлено, что в 2/3 случаев они устойчивы ко всем ПТП [2].

Большинство штаммов *M. kansasii* были чувствительны к этамбутолу, рифабутину, рифампицину, амикацину, кларитромицину, моксифлоксацину, линезолиду и устойчивы к ципрфлоксацину и триметоприм / сульфометоксазолу. По рекомендациям CLSI [7], широко используется на практике определение чувствительности *M. kansasii* только к рифампицину. Резистентность к рифампицину часто ассоциируется с устойчивостью к изониазиду и этамбутолу. Изоляты, чувствительные к рифампицину, также чувствительны и к рифабутину. Если изоляты устойчивы к рифампицину, имеет смысл определение их чувствительности к таким препаратам, как амикацин, ципрофлоксацин, кларитромицин, этамбутол, рифабутин, стрептомицин, сульфаниламиды, изониазид и др. [7, 10, 14].

Проведенные ранее в МНПЦБТ исследования по изучению чувствительности изолятов *M. kansasii* к основным и резервным ПТП методом абсолютных концентраций на среде Л-Й показали, что в большинстве случаев *M. kansasii* проявляли ЛУ к изониазиду и ПАСК, при сохранении ЛЧ к другим основным и резервным ПТП [2].

Определение ЛЧ *M. xenopi* CLSI рекомендует проводить с теми же лекарственными препаратами, что и для *M. kansasii* и для интерпретации результатов применять те же МИК [7].

M. xenopi в большинстве случаев были чувствительны к рифабутину, моксифлоксацину, линезолиду, амикацину и кларитромицину, в 80,0% – к ципрофлоксацину, в 3/4 случаев – к изониазиду и стрептомицину, в 2/3 – к рифампицину, ципрофлоксацину и рифампину, в половине случаев – к триметоприм/сульфометоксазолу и менее чем в половине – к этамбутолу и доксициклину.

В литературе имеются отдельные сообщения о чувствительности этого вида НТМБ к ПТП основного ряда, при этом показано,

что устойчивость к рифампицину и этамбутолу варьирует и большинство штаммов чувствительны к изониазиду [4, 10, 14]. Полученные ранее в МНПЦБТ результаты изучения ЛЧ *M. xenopi* методом абсолютных концентраций на среде Л-Й также показали, что к большинству ПТП этот вид НТМБ чувствителен [2].

При изучении ЛЧ быстрорастущих НТМБ, установлено (табл.3), что большинство штаммов *M. chelonae group* чувствительны к амикацину, кларитромицину, линезолиду, тигециклину, а половина – к имипенему, моксифлоксацину, триметоприм/сульфометоксазолу; при этом они устойчивы к доксициклину, миноциклину и тобрамицину. В большинстве случаев существенных различий в ЛЧ/ЛУ штаммов *M. chelonae* и *M. abscessus* не было, однако *M. abscessus* чаще были устойчивы к триметоприм/сульфометоксазолу, а M. chelonae к цефокситину.

По данным литературы, для *M. abscessus*, выделенных от не получавших лечение больных, характерны низкие или средние уровни МИК к кларитромицину, амикацину, цефокситину, клофазимину. Как правило, изоляты *M. chelonae* обладают высокой или средней чувствительностью к тобрамицину, кларитромицину, линезолиду, имипенему [14, 15].

Установлено также, что изоляты *M. fortuitum group* были в большинстве случаев чувствительны к амикацину, кларитромицину, линезолиду, моксифлоксацину, тигециклину, ципрофлоксацину и напротив устойчивы к доксициклину, имипенему, миноциклину, тобрамицину и триметоприм/ сульфометоксазолу. Также в большинстве случаев не было существенных различий ЛЧ/ЛУ *M. fortuitum* и *M. peregrinum*, однако *M. fortuitum* были чаще устойчивы к миноциклину, а *M. peregrinum* к цефокситину. Вместе с тем, следует иметь в виду, что число изученных штаммов *M. chelonae* и *M. peregrinum* было существенно меньше, чем *M. abscessus* и *M. fortuitum*.

По данным литературы, изоляты *M. fortuitum* обычно чувствительны к макролидам, фторхинолонам, доксициклину и миноциклину, сульфаниламидам [14, 15].

Проведенное ранее в МНПЦБТ исследование ЛЧ быстрорастущих микобактерий методом абсолютных концентраций на среде Л-Й показало, что большинство штаммов были устойчивы ко всем ПТП, но в 50% случаев – чувствительны к левофлоксацину и офлоксацину [2].

Табл. 3. Определение чувствительности к химиопрепаратам штаммов нетуберкулезных микобактерий

	Амикацин	Доксициклин	Имипенем	Кларитромицин	Линезолид	Миноциклин	Моксифлоксацин	Рифабутин	Рифампицин	Тигециклин	Тобрамицин	Триметоприм/	Цефокситин	Ципрфлоксацин	Этамбутол
***MAC* (n=139)**															
Кол-во (у) штаммов абс/%				5/ 3,6	54/ 38,8		38/ 27,3								
Кол-во (ч) штаммов абс/%				134/ 96,4	85/ 61,2		101/ 72,7								
***M. kansasii* (n=57)**															
Кол-во (у) штаммов абс/%	10/ 17,5			5/ 8,8	-		7/ 12,3	4/ 7,0	11/ 19,3			44/ 77,2		31/ 54,4	11/ 19,3
Кол-во (ч) штаммов абс/%	47/ 82,5			52/ 91,2	57/ 100		50/ 87,7	53/ 93,0	46/ 80,7			13/ 22,8		26/ 45,6	46/ 80,7
***M. xenopi* (n=56)**															
Кол-во (у) штаммов абс/%	6/ 10,7			2/ 3,6	4/ 7,1		4/ 7,1	5/ 8,9	19/ 33,9			24/ 42,9		17/ 30,4	31/ 55,4
Кол-во (ч) штаммов абс/%	50/ 89,3			54/ 96,4	52/ 92,9		52/ 92,9	51/ 91,1	37/ 66,1			32/ 57,1		39/ 69,6	25/ 44,6
***M. fortuitum group* (n=170)**															
Кол-во (у) штаммов абс/%	8/ 4,7	126/ 74,1	107/ 62,9	55/ 32,4	7/ 4,1	103/ 60,6	8/ 4,7			6/ 3,5	143/ 84,1	125/ 73,5	70/ 41,2	9/ 5,3	
Кол-во (ч) штаммов абс/%	162/ 95,3	44/ 25,9	63/ 37,1	115/ 67,6	163/ 95,9	67/ 39,4	162/ 95,3			164/ 96,5	27/ 15,9	45/ 26,5	100/ 58,8	161/ 94,7	
***M. chelonae group* (n=46)**															
Кол-во (у) штаммов абс/%	4/ 8,7	40/ 87,0	24/ 52,2	7/ 15,2	8/ 17,4	30/ 65,2	19/ 41,3			7/ 15,2	30/ 65,2	23/ 50,0	25/ 54,3	20/ 43,4	
Кол-во (ч) штаммов абс/%	42/ 91,3	6/ 13,0	22/ 47,8	39/ 84,8	38/ 82,6	16/ 34,8	27/ 58,7			39/ 84,8	16/ 34,8	23/ 50,0	21/ 45,7	26/ 56,5	

(у) – устойчивость
(ч) – чувствительность

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что тест-системы Sensititre имеют преимущества, связанные со стандартизацией процесса (химиопрепараты внесены в лунки планшетов) и возможностью определения степени устойчивости изолята (количественный метод), так как используются несколько концентраций препарата. Метод определения ЛЧ с помощью тест-систем Sensititre существенно превосходят по скорости метод абсолютных концентраций на среде Л-Й. Sensititre MycoTB также имеет преимущества перед BACTEC 960, так как в последнем случае определение ЛЧ осуществляется последовательно, вначале к препаратам первого ряда и только после получения результатов – к препаратам второго ряда. Кроме того, Sensititre значительно проще технически, чем исследования в системе BACTEC 960.

Все вышеизложенное позволяет рекомендовать тест-системы Sensititre MycoTB, SLOMyco и RAPMyco для использования в широкой микобактериологической практике.

Литература

1. *Дорожкова И.Р. Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза. Методы определения. Оценка результатов //Лабораторные исследования при туберкулезе. – М., 2013. – 343 с.*
2. *Литвинов В.И., Макарова М.В., Краснова М.А. Нетуберкулезные микобактерии. – М.: ЗАО «Информационные технологии в медицине», 2008. – 254 с.*
3. *Abuali M. M., Katariwala R., LaBombardi V.J. A comparison of the Sensititre® MYCOTB panel and the agar proportion method for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 31. – P. 835–839.*
4. *Brown B.A., Wallace R.J., Jr., Onyi G.O. Activities of clarithromycin against eight slowly growing species of nontuberculous mycobacteria, determined by using a broth microdilution MIC system // Antimicrob. Agents Chemother. – 1992. – Vol. 36. – P. 1987–1990.*
5. *Campbell P.J., Morlock G.P., Sikes R.D. et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis //Antimicrob. Agents Chemother. – 2011. – Vol. 55. – P. 2032–2041.*
6. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Molecular Detection of Drug Resistance (MDDR) (http://www.cdc.gov/tb/topic/laboratory/ UserGuide) доступ 14.07.2007.*
7. *CLSI. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard – 2nd ed. // CLSI document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. – 2011. (http://www.techstreet.com/ products/ 1779589) доступ 10.12.2013.*
8. *Hall L., Jude K. P., Clark S.L. et al. Antimicrobial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex for first and second line drugs by broth dilution in a microtitre plate format // J. Vis. Exp. – 2011. – Jun. 24 ; (52). Pii: 3094. doi: 10.3791/3094.*
9. *Heifets L: Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology // Am. Rev. Respir. Dis. – 1998, – Vol. 137. – P. 1217–1222.*
10. *Griffith D., Aksamit T., Brown-Elliott B.et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculousis mycobacterial diseases // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2007. – Vol. 175. – P. 367-416.*
11. *Mpagama S., Houpt E., Stroup S. et al. Application of quantitative second-line drug susceptibility at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania // BMC Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 13. – 432.*
12. *Rusch-Gerdes S., Pfyffer G., Casal M. et al. Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of mycobacterium tuberculosis to classical second-line drugs and newer antimicrobials // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 6886-6892.*
13. *Thomson R. Changing epidemiology of pulmonarary nontuberculous mycobacteria infections // Emerg. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 16. – P.1576-1583.*
14. *Wallace R., Glassroth J., Griffith D. et al. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria (American Thoracic Society Statement) // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1997. – Vol 156. – P. 1-25.*
15. *Woods, G. L., Bergmann J. S., Witebsky F. G. et al Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae, and Mycobacterium fortuitum. //J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P.1676-1682.*
16. *World Health Organization. Global Tuberculosis Control // WHO, 2010: Geneva, Switzerland. (http://www.who.int/bulletin/volumes/89/8/11-086801) доступ 10.12.2013.*

Сведения об авторах

Макарова Марина Витальевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д.10.
Телефон (496) 603 30 33
e-mail: makarova75@yandex.ru

Исаева Юлия Дмитриевна *– научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д.10.
Телефон (496) 603 30 33

Хачатурьянц Елена Николаевна *– врач-бактериолог Централизованной бактериологической лаборатории ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д.10.

Литвинов Виталий Ильич *– научный руководитель ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д.10.
Телефон (495) 603-09-63
e-mail: mnpcbtlv@yandex.ru

УДК 616.24-002.5:615.035:579.61

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ПРОТИВОГРИБКОВЫМ ПРЕПАРАТАМ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ГРИБОВ РОДА CANDIDA, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЕГКИХ

А.Б. Кулько
ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

THE STUDY ON SENSITIVITY OF FUNGI CANDIDA CLINICAL STRAINS, ISOLATED FROM PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS, TO ANTIFUNGAL DRUGS

A.B. Kulko

В статье представлены собственные данные определения чувствительности штаммов C. albicans, C dubliniensis, C. glabrata, C. guilliermondii, C. kefyr, C. krusei, C. lipolytica, C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. rugosa, C. tropicalis и C. zeylanoides к противогрибковым препаратам. Проанализирована активность амфотерицина В, флуконазола, итраконазола, вориконазола, флуцитозина (5-фторцитозина) в отношении штаммов Candida, выделенных в клинике туберкулёза.

Ключевые слова: *чувствительность видов Candida к противогрибковым препаратам, кандидоз бронхов и легких, туберкулёз легких*

The article presents original data on strain sensitivity determination of C. albicans, C dubliniensis, C. glabrata, C. guilliermondii, C. kefyr, C. krusei, C. lipolytica, C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. rugosa, C. tropicalisand C. zeylanoides to antifungal drugs. Activity of amphotericin B, fluconazole, itraconazole, voriconazole, flucytosine (5-fluorocytosine) against Candidastrains, isolated in the tuberculosis clinic, was analyzed.

Keywords: *susceptibility of Candida strains to antifungal drugs, candidiasis of the bronchi and lungs, pulmonary tuberculosis*

Введение

Кандидоз – группа инфекционных оппортунистических заболеваний, вызываемых болезнетворными (условно-патогенными) видами грибов рода *Candida*. Некоторые виды возбудителей кандидоза кожи и слизистых оболочек способны вызывать у предрасположенных лиц развитие глубокого кандидоза, включая различные формы кандидоза бронхов и легких. Отметим, что массивная колонизация бронхов грибами *Candida* может осложнять течение туберкулёзного процесса и хронических обструктивных заболеваний легких [4, 7, 8], являясь существенным фактором риска развития у пациента инвазивного кандидоза легких. Бронхолегочный кандидоз – заболевание преимущественно эндогенной природы, с предшествующей колонизацией слизистых оболочек *Candida spp*. [7, 8]. Из более чем 700 описанных видов грибов рода *Candida* к возбудителям инфекций относят менее 40: *C. africana, C. albicans, C. catenulata, C. chiropterorum, C. ciferrii, C dubliniensis, C. fabianii, C. famata, C. glabrata, C. guilliermondii, C. haemulonii, C. intermedia, C. kefyr, C. krusei, C. lambica, C. lipolytica, C. lusitaniae, C. magnoliae, C. metapsilosis, C. nivariensis, C. norvegensis, C. orthopsilosis, C. parapsilosis, C. pelliculosa, C. pseudohaemulonii, C. pseudorugosa, C. pulcherrima, C. rugosa, C. tropicalis, C. utilis, C. viswanathii, C. zeylanoides* [2, 6, 11]. В группу наиболее распространенных возбудителей кандидоза включают *C. albicans* (главный возбудитель всех форм заболевания), а также *C. glabrata, C. krusei, C. parapsilosis* и *C. tropicalis*. Вместе с тем в последние годы с возрастающей частотой выявляются *C. dubliniensis, C. guilliermondii, C. kefyr, C. lusitaniae* и некоторые другие виды [1, 2, 5]. Важно знать, что различные возбудители кандидоза отличны по уровням исходной (природной) чувствительности к противогрибковым препаратам, в первую очередь к азолам – флуконазолу и итраконазолу [1–3, 6; 11; 12]. Для многих редких возбудителей кандидоза уровни чувствительности к антимикотикам к настоящему времени не определены.

Цель настоящего исследования – анализ результатов тестирования чувствительности к противогрибковым препаратам штаммов различных видов *Candida*, выделенных от больных туберкулёзом легких с вторичной грибковой инфекцией органов дыхания.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили пробы различного диагностического материала (мокрота; материалы, полученные при фибробронхоскопии – БАЛ, бронхиальный секрет, бронхиальный смыв; материалы из полостных образований легких и плевральных полостей – резекционный материал, биоптаты, аспираты, экссудаты), поступавшего на микологическое исследование от больных туберкулёзом, а также штаммы 12 видов грибов рода *Candida*, выделенные в микологической лаборатории Московского научно-практического центра борьбы с туберкулёзом (МНПЦБТ) в 2011-2013 гг.

Выделенные из посевов штаммы дрожжевых грибов идентифицировали до вида с помощью комплекса общепринятых в медицинской микологии современных и классических методик [4]. Штаммы *C. albicans* идентифицировали по наличию ферментативной активности при росте на специальных хромогенных средах («CandiSelect 4», Bio-Rad Labs.; «Brilliance Candida Agar», Oxoid; «chromID Candida», BioMerieux). Штаммы дрожжевых грибов, не относящиеся к виду *C. albicans*, идентифицировали с помощью дифференциальных тест-систем для биохимических исследований («Auxacolor 2», Bio-Rad; «ELIchrom FUNGI», ELITech MICROBIO) и дополнительных признаков (температурные границы роста, морфологические характеристики на агаризованных питательных средах и др.).

Ряд выделенных от пациентов штаммов грибов рода *Candida* тестировали на чувствительность к пяти распространенным противогрибковым препаратам: амфотерицину B, флуконазолу, итраконазолу, вориконазолу, флуцитозину (5-фторцитозину). Чувствительность штаммов исследовали микрометодом серийных разведений в бульоне со средой RPMI 1640 [9, 10] с помощью тест-системы «FUNGIFAST AFG» (ELItech MICROBIO, Франция). Препараты в выбранной нами тест-системе представлены в нескольких концентрациях (трех или четырех), что позволяет лабораторному микологу интерпретировать результат тестирования штамма *Candida*, согласно официальной международной методологии, как чувствительный (S), промежуточный / чувствительный-дозозависимый (I / S-DD) или устойчивый (R). В случае выделения возбудителя кандидоза с зависимой от дозы препарата чувствительностью, для успешной терапии следует подбирать дозу антимикотика, превышающую среднюю терапевтическую [2, 8].

Результаты и обсуждение

Всего был протестировано 138 клинических штаммов грибов *Candida*, из них 81 штамм *C. albicans,* 3 – *C dubliniensis*, 15 – *C. glabrata*, 3 – *C. guilliermondii*, 7 – *C. kefyr*, 12 – *C. krusei*, 2 – *C. lipolytica*, 1 – *C. lusitaniae*, 4 – *C. parapsilosis*, 2 – *C. rugosa*, 6 – *C. tropicalis*, 2 – *C. zeylanoides.*

Обобщенные результаты исследования активности противогрибковых препаратов в отношении *Candida spp*. представлены в таблице.

Подавляющее большинство протестированных штаммов *C. albicans* (99%) определялись как чувствительные к флуконазолу. Таким образом, у штаммов *C. albicans*, выделенных от больных туберкулёзом, сохранялся высокий уровень чувствительности *in vitro* к флуконазолу, что и характерно для главного возбудителя кандидоза [2, 7, 8].

Напротив, у вида *C. krusei* не было выявлено ни одного чувствительного к флуконазолу штамма, а доля устойчивых штаммов составила 75%. К настоящему времени установлено, что вид *C. krusei* обладает исходной устойчивостью к препарату флуконазол [1, 2, 5, 8]. Согласно последним рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности к антибиотикам (EUCAST), при выявлении *C. krusei* в качестве возбудителя кандидоза следует обозначать штамм как устойчивый к флуконазолу без проведения исследования *in vitro*.

Значительное число выявленных штаммов *C. glabrata,* устойчивых к флуконазолу (33%), объясняется тем, что данный вид из группы основных возбудителей кандидоза обладает пониженной исходной чувствительностью к этому азоловому препарату [2, 7, 8]. Обращает на себя внимание наличие устойчивых к флуконазолу штаммов не только у вида *C. tropicalis* (гриб, с вариабельной исходной чувствительностью к азолам [7, 8], но также у *C. guilliermondii* и *C. zeylanoides*.

Проведенные исследования показали относительно низкую активность итраконазола в отношении *C. albicans*, причем доля чувствительных штаммов (53%) ненамного превышала долю устойчивых штаммов (46%). Полученные нами результаты не подтверждают данные литературы о высокой активности итраконазола *in vitro* в отношении *C. albicans* [7, 8] и скорее свидетельствуют о ее вариативности у разных штаммов. С другой стороны, заметное присутствие штаммов *C. albicans*, устойчивых к итраконазолу, может объясняться селекцией устойчивых штаммов или накоплением штаммов с приобретенной лекарственной устойчивостью на фоне широко распространенного лечения итраконазолом.

Доля чувствительных к итраконазолу штаммов *C. glabrata* (66%) заметно превышала долю устойчивых (34%). У *C. krusei* устойчивых к итраконазолу штаммов выявлено не было вовсе и более 80% исследованных штаммов определялись как чувствительные.

Из 138 протестированных штаммов *Candida spp*. только шесть (4,3%) обладали перекрестной устойчивостью к флуконазолу и итраконазолу: четыре штамма *C. glabrata* (27% от общего числа штаммов данного вида), а также, неожиданно, по одному штамму *C. guilliermondii* и *C. zeylanoides*.

В сравнении с флуконазолом и итраконазолом, активность *in vitro* третьего азолового препарата – вориконазола –

Таблица. Чувствительность к противогрибковым препаратам штаммов Candida spp. (%), выделенных от больных туберкулёзом легких

Вид (n)	КЧ	Препарат				
		Амфотерицин В	Флуконазол	Итраконазол	Вориконазол	Флуцитозин
C. Albicans (81)	S	100	99	53	99	99
	I	0	0	1	1	0
	R	0	1	46	0	1
C dubliniensis (3)	S	100	100	100	100	67
	I	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	33
C. glabrata (15)	S	100	33	66	86	86
	I	0	33	0	14	7
	R	0	33	34	0	7
C. guilliermondii (3)	S	100	67	67	100	100
	I	0	0	0	0	0
	R	0	33	33	0	0
C. kefyr (7)	S	100	100	100	100	100
	I	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
C. krusei (12)	S	100	0	83	100	67
	I	0	25	17	0	33
	R	0	75	0	0	0
C. lipolytica (2)	S	100	100	100	100	100
	I	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
C. lusitaniae (1)	S	100	100	100	100	100
	I	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
C. parapsilosis (4)	S	100	100	100	100	100
	I	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
C. морщинистая (2)	S	100	50	100	100	100
	I	0	50	0	0	0
	R	0	0	0	0	0
C. tropicalis (6)	S	100	66	83	100	83
	I	0	17	0	0	0
	R	0	17	17	0	17
C. zeylanoides (2)	S	100	50	50	100	100
	I	0	0	0	0	0
	R	0	50	50	0	0

Примечание: (n) – число протестированных штаммов данного вида; КЧ – категория чувствительности:
S – чувствительные к препарату штаммы, I – штаммы с промежуточной чувствительностью (дозозависимые),
R – устойчивые (резистентные).

в отношении штаммов *Candida spp.* была заметно выше. Было выявлено 99% чувствительных к вориконазолу штаммов *Candida spp.* и только 1% штаммов с дозозависимой чувствительностью (штамм *C. albicans* и два штамма *C. glabrata*).

Следует отметить, что все протестированные штаммы *C. dubliniensis, C. kefyr, C. lipolytica, C. lusitaniae, C. parapsilosis* и *C. rugosa* были чувствительны одновременно к трем азолам – флуконазолу, итраконазолу и вориконазолу.

Все исследованные штаммы определялись как чувствительные к амфотерицину В, в том числе и штамм *C. lusitaniae*, рассматриваемый рядом авторов как вид, устойчивый к данному препарату [6-8].

При относительно высокой активности *in vitro* флуцитозина, штаммы устойчивые к данному препарату были выявлены у видов *C. albicans, C dubliniensis, C. glabrata* и *C. tropicalis*.

Заключение

Проведенные исследования показали, что флуконазол сохраняет высокую фунгицидную активность в отношении штаммов главного возбудителя кандидоза *C. albicans*. Штаммы *C. albicans* заметно варьировали по чувствительности к итраконазолу, что дает основание предположительно расценивать *C. albicans,* как вид с вариабельной чувствительностью к данному азоловому препарату.

Проведенное исследование выявило высокую активность итраконазола в отношении *C. krusei* – возбудителя кандидоза, устойчивого к флуконазолу.

У более четверти протестированных штаммов *C. glabrata* определялась перекрестная устойчивость к вориконазолу и итраконазолу, что осложняет подбор препарата для лечения кандидоза, вызванного *C. glabrata*.

Вместе с тем, из 138 протестированных штаммов *Candida spp*. не было выявлено ни одного штамма, обладающего устойчивостью к вориконазолу (98% чувствительных штаммов) и амфотерицину В (100% чувствительных штаммов), что позволяет использовать данные препараты для проведения эмпирической терапии кандидоза легких у больных туберкулёзом. Перед проведением противогрибковой терапии бронхолегочного кандидоза флуконазолом и итраконазолом необходимо выполнить полное лабораторное исследование с идентификацией возбудителя до уровня вида и определением его чувствительности к противогрибковым препаратам *in vitro*.

Литература

1. Атлас грибковых заболеваний. Под ред. К.А. Кауфман, Д.Л. Манделла (Kauffmann C.A., Mandell G.L.) Пер. с англ. под ред. Ю.В.Сергеева. – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 240 с.

2. Елинов Н.П., Васильева Н.В., Степанова А.А., Чилина Г.А. Candida. Кандидозы. Лабораторная диагностика. Под редакцией з.д.н. РФ проф. Елинова Н.П. – СПб.: Коста, 2010. – 224 с.

3. Кулько А.Б. Исследование чувствительности к противогрибковым препаратам клинических штаммов Candida krusei, выделенных от больных туберкулёзом легких // Антибиотики и химиотерапия. – 2008. – Т. 53. – № 11-12. – С. 22-24.

4. Кулько А. Б., Дорожкова И.Р., Исаева Е.Л., Кузьмин Д.Е. Методические подходы к проведению микологических исследований во фтизиатрической практике // Туберкулёз и болезни легких. – 2011. – № 6. – С. 56-59.

5. Кулько А.Б. Спектр возбудителей глубоких микозов человека // Онкогематология. – 2012. – № 3. – С. 55-61.

6. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. (Sutton D., Fothergill A., Rinaldi M.) Определитель патогенных и условно патогенных грибов: Пер. с англ. – М.: Мир, 2001. – 468 с.

7. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Кандидоз: природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, диагностика и лечение. – М.: Триада-Х, 2001. – 472 с.

8. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. – М.: Бином, 2008. – 480 с.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard – Third edition. CLSI document M27A3, 2008. – 40 p.

10. Rodriguez-Tudela J.L., Arendrup M.C., Barchiesi F. et al. EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts // Clin. Microbiol. Infect. – 2008. – Vol. 14. – P. 398–405.

11. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of clinical fungi. Electronic Version 3.1 – CBS: Reus, 2011.

12. Kulko A., Mitrokhin S. Species distribution and antimycotic susceptibility of Candida strains isolated from pulmonary tuberculosis patients // 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Copenhagen, Denmark. 2-5 April 2005. Abstracts // Clinical Microbiology and Infection. – 2005. – Vol. 11. Suppl. 2. – P. 714-715.

Сведения об авторе

Кулько Александр Борисович *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д.10.

Телефон: 8 (499) 268-70-33.

e-mail: kulko-fungi@yandex.ru

УДК 616.24-002.5:615.035:579.6

МОНИТОРИНГ ОППОРТУНИСТИЧЕСКОЙ МИКРОФЛОРЫ ПРИ ВТОРИЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЁГКИХ И ДИНАМИКА УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ STREPTOCOCCUS GR. VIRIDANS

Л.В. Ивушкина
ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

MONITORING OF OPPORTUNISTIC MICROFLORA IN SECONDARY INFECTIONS OF THE RESPIRATORY SYSTEM IN PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS AND THE DYNAMICS OF STREPTOCOCCUS GR. VIRIDIANS STRAINS RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS

L.V. Ivushkina

Представлены результаты трехлетнего (2010-2012 гг.) локального микробиологического мониторинга при вторичных инфекциях у больных туберкулёзом органов дыхания, вызванных оппортунистической микрофлорой в г. Москве. Определены лидирующие микроорганизмы, представителями которых являются грамположительные кокки Streptococcus gr. viridians. Проведен сравнительный анализ in vitro динамики устойчивости S. gr. viridans к антибиотикам широкого спектра действия, обладающим противотуберкулёзной активностью (рифампицину, левофлоксацину, моксифлоксацину), который продемонстрировал отличие по профилю резистентности штаммов, выделенных от пациентов, находящихся на обследовании в филиалах и структурных подразделениях МНПЦБТ.

Ключевые слова: *туберкулёз легких, оппортунистическая инфекция, условно-патогенные микроорганизмы, антибиотикорезистентность, микробиологический мониторинг.*

The results of local microbiological monitoring at the secondary infections, caused by opportunistic micro flora in patients with pulmonary tuberculosis, carried out 2010-2012 in Moscow are presented. Gram-positive cocci Streptococcus gr. viridian have been identified as leading microorganisms. Comparative analysis of the microorganisms resistance dynamics in vitro to broad-spectrum antibiotics with anti-TB activity – rifampicin, levofloxacin, moxifloxacin, was performed. It demonstrated the difference in the profile of resistance of S. gr. viridian strains, isolated from the patients, examined in the branches and subdivisions of the Moscow Research and Clinical Center for Tuberculosis Control of the Moscow Government Health Department.

Keywords: *pulmonary tuberculosis, opportunistic infection, opportunistic pathogens, antibiotics resistance, microbiological monitoring*

Введение

Течение туберкулёза легких (ТБЛ) нередко осложняется присоединением неспецифического воспаления, вызванного оппортунистической микрофлорой, что изменяет и усложняет клинические проявления туберкулёза. При сочетанном процессе ухудшаются результаты лечения ТБЛ – снижается частота закрытия полостей распада и прекращения бактериовыделения, удлиняются сроки выздоровления, отмечается многосимптомность, преобладание альтернативных и экссудативных изменений [4, 6, 9]. В то же время, больные с хроническими неспецифическими заболеваниями легких (ХНЗЛ) составляют контингент лиц с повышенным риском заболевания туберкулёзом.

К факторам риска развития вторичных инфекций у больных фтизиатрической клиники относятся: длительное применение антибактериальных препаратов широкого спектра действия, повышенная колонизация верхних и нижних отделов дыхательных путей условно-патогенными микроорганизмами (УПМ), инвазивные процедуры [2, 3, 4].

Вторичные инфекции, возникающие в виде обострения неспецифических бронхитов, пневмонии и осложняющие течение фиброзно-кавернозного туберкулёза, инфильтративного туберкулёза, туберкулем и т. д., разнообразны и не представлены определенным возбудителем [5, 7, 9].

Ведущую роль в определении этиологии неспецифических инфекций нижних дыхательных путей играют микробиологические

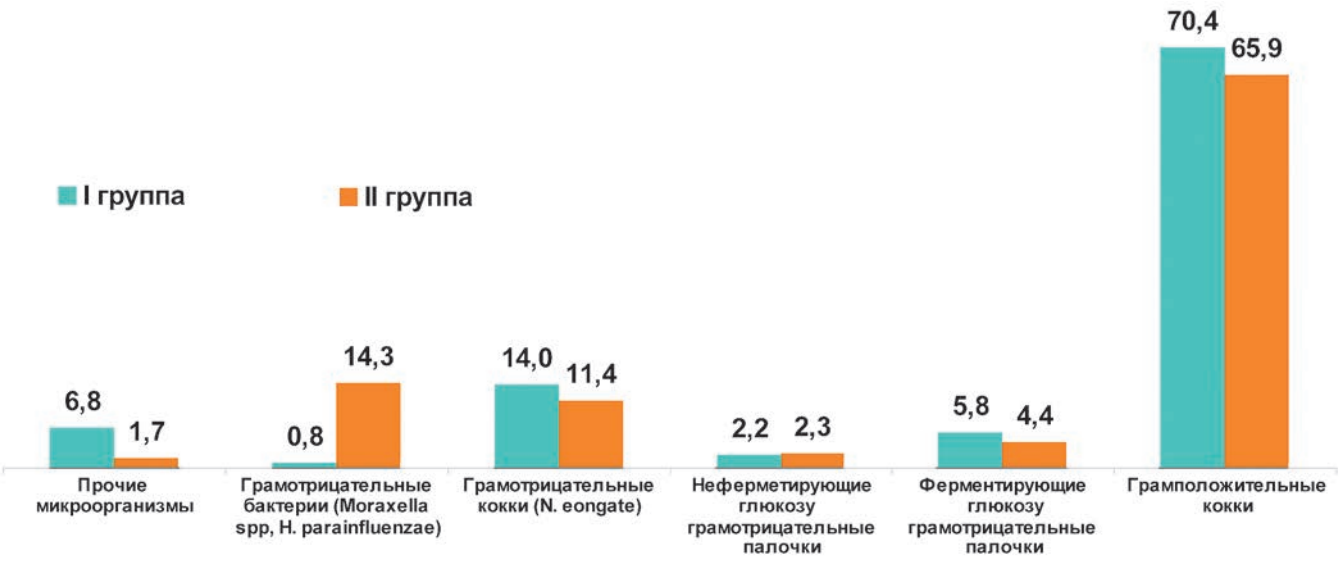


Рис.1. Частота выделения (в %) условно-патогенной микрофлоры у пациентов МНПЦБТ (2010-2012 гг.)

методы исследования, позволяющие не только определить видовую принадлежность возбудителя, но и получить его качественную и количественную характеристику, определить чувствительность к антибиотикам. Поэтому своевременная диагностика вторичной инфекции нижних дыхательных путей у больных ТБЛ и направленное лечение вызванных ею осложнений – одна из актуальных проблем современной фтизиатрии [8, 11, 13].

Цель работы – изучение спектра нетуберкулёзной микрофлоры, выделенной из органов дыхания, и оценка чувствительности доминирующих грамположительных бактерий *S. gr. viridans* к антибактериальным препаратам у больных туберкулёзом легких.

Материалы и методы исследования

Динамика лекарственной устойчивости *S. gr. viridans* проанализирована *in vitro* у больных ТБЛ, находившихся на стационарном и амбулаторном лечении в Московском городском научно-практическом центре борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы (МНПЦБТ) в течение трех лет (2010-2012 гг.).

Выделено две группы наблюдения. Первую составили 3858 амбулаторных пациентов, наблюдаемых в филиалах и подразделениях МНПЦБТ, от которых были получены образцы диагностического материала из нижних дыхательных путей (мокрота и бронхиальный секрет). Из этих образцов выделено и идентифицировано 4436 штаммов микроорганизмов (доля положительных посевов – 88,3%). Вторую группу составили больные, находившиеся на стационарном лечении в клинике №1 МНПЦБТ. От них получено 3388 образцов мокроты и бронхиального секрета, из которых выделено и идентифицировано 5497 штаммов микроорганизмов (высеваемость этиологически значимых микроорганизмов в диагностических титрах – 92,1%).

Поводом для исследования на неспецифическую микрофлору (вторичную бактериальную инфекцию нижних отделов дыхательного тракта) служили:

- клинические данные (ухудшение состояния больного на фоне специфической антибактериальной терапии, появление признаков вторичной инфекции: слизисто-гнойная, гнойная, слизисто-гнойная с прожилками крови мокрота, воспалительные изменения периферической крови, высокая лихорадка, обильная аускультативная картина);
- рентгенологически подтвержденное наличие жидкого содержимого в полостях;
- выявление неспецифических катаральных эндобронхитов 1 и 2 степени интенсивности воспаления при бронхоскопическом исследовании;
- подготовка больного к операции на легких и послеоперационные осложнения (пневмония, эмпиема остаточной полости, свищ и др.)

Материал для исследования собирали в стерильную посуду и доставляли в микробиологическую лабораторию не позднее двух часов с момента сбора мокроты. Для оценки качества доставленных образцов микроскопировали окрашенные по Граму мазки мокроты при малом (×10) увеличении, оценивая при этом правильность её сбора по методу Murray/Washington (1975). Образцы, не отвечавшие требованиям, браковались и в исследование не включались [8].

Посев исследуемого материала проводили на питательные среды с колумбийским агаром (Columbia agar Bio-Rad, США) – основа для требовательных микроорганизмов с добавлением 5% крови крупного рогатого скота. Все дальнейшие исследования по выделению и идентификации выросших на питательных средах микроорганизмов проводили по общепринятым отечественным и зарубежным методикам [Приказ Минздрава СССР № 535, 1985 г.; Manual of Clinical Microbiology, 1999].

Идентификацию выделенных микроорганизмов проводили с учетом морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств. Для идентификации использовали микробиологический анализатор BD BBL™ Crystal™ AutoReader (Becton Dickinson, США). Штаммы УПМ, полученных при свободном откашливании, расценивали как этиологически значимые при концентрации >10^6 КОЕ/мл, и полученные с помощью инвазивных методов — в концентрации <10^3 КОЕ/мл [8].

Чувствительность этиологически значимых микроорганизмов к антибактериальным препаратам определяли стандартизированным диско-диффузионным методом (ДДМ), согласно общепринятым методикам [МУК 4.2.1890-04 от 04. 03. 2004, Минздрава России; NCCLS (США), 2002, 2003, 2004] «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», а также руководствуясь стандартами Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS), с 2005 г. – Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI). При определении чувствительности использовали стандартизированные качественные диски фирм Bio-Rad Laboratories (США) [1, 10].

Для интерпретации полученных результатов антибиотикограмм, использовали анализатор «OSIRIS», фирмы Bio-Rad Laboratories (США).

Ввод, статистическую обработку и анализ данных проводили с помощью компьютерной системы микробиологического мониторинга «МИКРОБ-2» (СМММ).

Внутренний контроль качества определения чувствительности к антибиотикам осуществляли с использованием референтных штаммов Американской коллекции типовых культур (ATCC) - *Stahpylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, рекомендуемых МУК 4.2.1890-04 Минздрава России.

Результаты работы и их обсуждение

По результатам микробиологического мониторинга за 2010-2012 годы была сопоставлена этиологическая структура микроорганизмов отделяемого нижних дыхательных путей при вторичных инфекционных процессах у пациентов с ТБЛ I и II групп (табл. 1, рис. 1).

Спектр микроорганизмов, выделенных из нижних дыхательных путей пациентов I группы, представлен следующими видами микроорганизмов:

Табл. 1 Структура родового и видового состава ведущей микрофлоры нижних дыхательных путей

Виды микроорганизмов	МНПЦБТ филиалы		МНПЦБТ клиника №1	
	число культур	%	число культур	%
Грамположительные кокки	**3122**	**70,4**	**3610**	**65,9**
в том числе:				
Streptococcus gr.viridans	2591	58,4	3463	63,1
Streptococcus pneumoniae	205	4,6	199	3,6
Staphylococcus ssp. (S.epidermidis, S.cohnii S.haemoliticus)	74	1,6	133	2,4
Staphylococcus aureus	121	2,7	101	1,8
Ферментирующие грамотрицательные палочки семейство *Enterobacteriaceae:*	**293**	**5,8**	**244**	**4,4**
E.coli	82	1,8	76	1,3
Klebsiella pneumoniae	99	2,2	89	1,6
Enterobacter spp.	89	2,0	75	1,4
P. mirabilis, S.marcescens, S.liguefaciens, C.freundii	23	0,5	-	-
Неферментирующие грамотрицательные бактерии:				
Pseudomonas aeruginosa	69	1,5	112	2,0
Семейство *Neisseriaceae:*	651	14,06	643	13,4
N. elongate	622	14,0	628	11,4
Acinetobacter spp. (A.baumannii, A.iwoffii)	29	0,6	15	0,3
Грамотрицательные палочки	**39**	**0,8**	**783**	**14,2**
в том числе:				
Moraxella .spp	30	0,6	683	12,4
Семейство *Pasteurellaceae H. parainfluenzae*	9	0,2	100	1,8
Прочие	**232**	**6,8**	**94**	**1,7**
ВСЕГО:	**4436**	**100,0**	**5486**	**100,0**

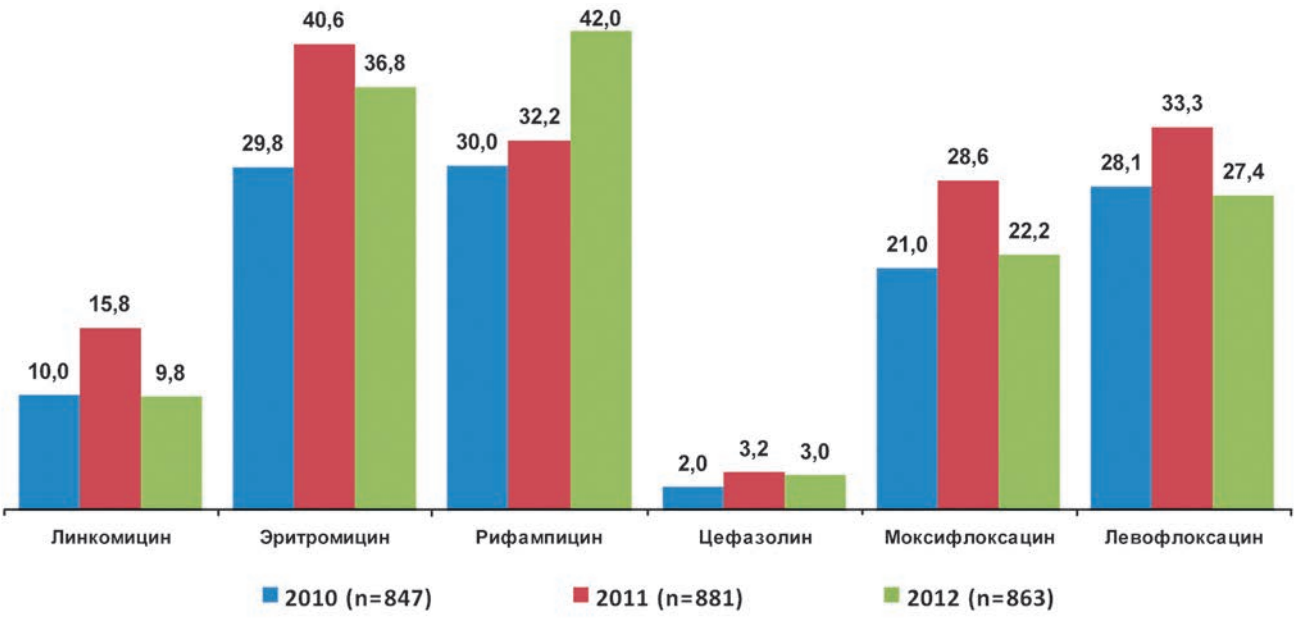


Рис. 2. Динамика резистентности (в %) Streptococcus gr. viridians (n=2591) к антибиотикам in vitro, I группа пациентов.

1) традиционно преобладали штаммы грамположительных кокков (70,4%), среди которых доминировали *S. gr. viridans* – 58,4%, реже высевали *S. pneumoniae* – 4,6%, *S. aureus* – 2,7%, *Staphylococcus spp.* – 1,6%;

2) грамотрицательные ферментирующие глюкозу палочки семейства *Enterobacteriaceae* (5,8%): *K. pneumoniae* (2,2%), *Enterobacter spp. (E. cloaceae, E. aerogenes, E. sacazaki)* (2,0%,), *E. coli* (1,8%), *P. mirabilis* (0,5%); на долю штаммов *P. mirabilis, Serratia spp. (S. marcescens, S. liguefaciens), C. freundii* пришлось 0,5% (у больных из стационара МНПЦБТ – II группа – данные виды за три года не высевали);

3) неферментирующие глюкозу грамотрицательные палочки (2,1%), из них большинство составили штаммы *P. aeruginosa* (1,5%), в остальных 0,6% случаев выделили *Acinetobacter spp.* (*A. baumannii, A. iwoffii*); достаточно часто высеваемые грамотрицательные кокки *N. elongate* (14,0%) не имели существенного клинического значения, представителей этого рода чаще всего выделяли в ассоциациях с *S. gr. viridians, S. pneumoniae, Staphylococcus spp.* (87,5% случаев);

4) прочие микроорганизмы (*Peptococcus spp., Stomatococcus ssp., Gemmella ssp., Candida spp., Streptococcus spp.*) – 6,8% от всех выделенных штаммов.

Микробный пейзаж нижних дыхательных путей больных, находящихся на стационарном лечении в МНПЦБТ (II группа) отличался по количественному составу от микробного пейзажа пациентов I группы незначительно. Однако выявлены некоторые различия в структуре видового состава ведущей микрофлоры нижних дыхательных путей:

1) грамположительные кокки сохраняли лидирующее положение (65,9%): преобладали также *S. gr. viridans* (63,1%), *S. pneumoniae, S. aureus, Staphylococcus spp.* выделили в 3,6%, 1,8% и 2,4% случаев соответственно;

2) доля грамотрицательных ферментирующих глюкозу палочек семейства *Enterobacteriaceae* составила 4,4%, *K. pneumoniae, Enterobacter cloaceae., E. coli* высеяли соответственно в 1,6%, 1,4% и 1,3% случаев.

3) неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии *P. aeruginosa* были выделены в 2,0% случаев, A. baumannii – в 0,3%; в составе ассоциаций также присутствовали бактерии рода *Neisseria* (11,4%) и появились грамотрицательные палочки рода *Moraxella, Haemophilus* (14,2% случаев, причем преобладали штаммы *Moraxella spp.* – 12,4%), наибольший рост этих изолятов отмечен в 2011 году;

4) прочие аэробные и факультативные грамположительные кокки составили 1,7% от всех выделенных штаммов.

При анализе динамики профиля лекарственной устойчивости (ЛУ) доминирующих грамположительных микроорганизмов *S. gr. viridans*, выделенных из нижних дыхательных путей при вторичных инфекциях у пациентов I группа выявлено, что количество штаммов, устойчивых к антибактериальным препаратам, в течение 2010-2012 гг. менялось скачкообразно (рис. 2).

Отмечено незначительно нарастание ЛУ к левофлоксацину: с 28,1% в 2010 г. до 33,3% в 2011 г., но в 2012 г. ЛУ к левофлоксацину выявлена только у 27,4% штаммов. Также отмечено достоверное нарастание числа штаммов с ЛУ к моксифлоксацину: с 21,0% до 28,6% случаев в 2010-2011 гг. ($p < 0,05$), но в 2012 г. среди выделенных штаммов ЛУ к моксифлоксацину имели только 22,2%, что равно показателю 2010 г.

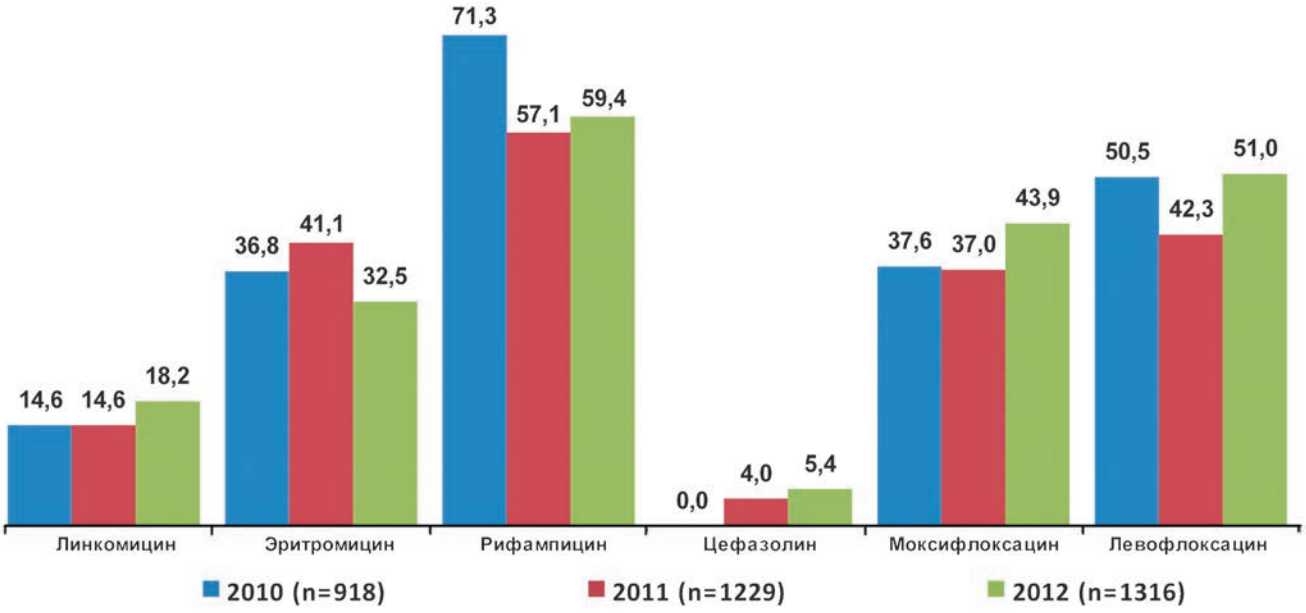


Рис. 3. Динамика резистентности (в %) Streptococcus gr. viridians (n=3463) к антибиотикам in vitro, II группа пациентов

Аналогично, после достоверного нарастания ЛУ к эритромицину в 2010-2011 гг. (с 29,8% до 40,6% штаммов, $p < 0,05$), в 2012 г. доля устойчивых штаммов снизилось 36,8% случаев. Доля штаммов с ЛУ к линкомицину сотавила в 2010 г. 10,0%, в 2011 г. – 15,8% и в 2012 г. – 9,8%. Достоверных изменений частоты ЛУ к цефазолину в 2010-2012 гг. не выявлено (2,0%, 3,2%, 3,0%; $p > 0,05$). В то же время, отмечено достоверное нарастание ЛУ к рифампицину: 2010 г. – 30,3%, 2011 г. – 32,2%, 2013 г. – 42,0% ($p < 0,05$).

При анализе динамики устойчивости штаммов *Streptococcus gr. viridians* у больных ТБЛ II группы выявлена высокая вариабельность уровня ЛУ клинических штаммов (рис. 3).

Достоверного увеличения числа штаммов с ЛУ к левофлоксацину в 2010-2012 гг. не выявлено (по 50,0%), тогда как в 2011г. таких штаммов было 42,3%. К моксифлоксацину же за 2010-2012 гг. прослежено достоверное нарастание устойчивости – с 37,0% до 43,9% случаев ($p < 0,05$).

Доля штаммов с ЛУ к эритромицину в 2010 г. составила 36,8% и в 2012 г. – 32,5%, но в 2011 г. наблюдалось увеличение доли ЛУ штаммов до 41,1%. К рифампицину в 2010 г. были устойчивы 71,3% штаммов, в 2011-2012 гг. их доля была меньше – 57,1% и 59,4% соответственно. Отмечено незначительное нарастание штаммов с ЛУ к линкомицину: 14,0% в 2010-2011 гг. и 18,2% в 2012 г. Достоверного увеличения числа штаммов с ЛУ к цефазолину не выявлено.

Следует подчеркнуть, что микробиологические исследования при оппортунистических инфекциях у больных ТБЛ представляют большие сложности, т.к. в диагностическом материале, как правило, присутствуют ассоциации микробов, в которые входят как возбудители заболевания, так и «заносные» из других органов, внешней среды виды, а также микробы, которые могут попасть в материал в процессе его забора и доставки. Часто возникают некоторые трудности бактериологического подтверждения диагноза, связанные с немедленным началом химиотерапии основного заболевания – ТБЛ. Поскольку забор материала проводят на фоне поликомпонентного антибактериального лечения, возбудитель определить достаточно сложно, количественный и видовой состав микрофлоры варьирует у разных больных и меняется в процессе лечения.

Поэтому необходимо проведение регулярного мониторинга ЛУ, который позволит оценивать этиологическую структуру микробного пейзажа, профили ЛУ микроорганизмов, учитывать современные направления в антибиотикотерапии, и подборе антибиотиков для конкретного больного по результатам антибиотикограммы или до получения таковой.

Выводы

1. Объем клинического исследования и включение в него как амбулаторных пациентов филиалов МНПЦБТ из различных групп, так и больных ТБЛ, находившихся в клинике №1 МНПЦБТ можно считать, что результаты исследования микробного пейзажа отделяемого органов дыхания (мокрота, содержимое бронхов) позволили получить достоверное представление о видовом составе предполагаемых возбудителей вторичных инфекций при ТБЛ и их ЛУ в целом в г. Москве.

2. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у больных ТБЛ представлен микроорганизмами 8 родов; предполагаемыми этиологическими агентами в развитии вторичных инфекций лёгких являются *Streptococcus gr. viridans, Streptococcus*

pneumoniae, Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus, Moraxella spp., Neisseria elongata, P. aeruginosa, Klebsiella spp., Escherichia coli, Enterobacter spp.

3. Анализ динамики ЛУ лидирующих штаммов *Streptococcus gr. viridans*, выделенных от пациентов с ТБЛ, находящихся на лечении в клинике №1 МНПЦБТ, отличается по профилю резистентности от штаммов микроорганизмов, выделенных от пациентов, находящихся на обследовании в филиалах МНПЦБТ высоким уровнем устойчивости к рифампицину, левофлоксацину, моксифлоксацину. Это свидетельствует о высокой степени селекции устойчивых штаммов УПМ на фоне длительного применения противотуберкулёзных препаратов.

4. При выборе антибактериального средства для лечения вторичных инфекций органов дыхания у больных ТБЛ следует учитывать, что изоляты оппортунистических инфекций являются представителями высокорезистентной нозокомиальной микрофлоры, среди которых преобладают низковирулентные аэробные и факультативно грамположительные кокки.

Литература

1. *Авдеев С.Н., Чучалин А.Г. Роль бактериальной инфекции и выбор антибиотиков при обострении хронического бронхита // Consilium medicum. – 2000. – № 2. – С. 418—425.*
2. *Барлет Д.Д. Инфекции дыхательных путей: практическое руководство по диагностике и лечению инфекций респираторного тракта / Пер. с англ. – М.: Бином, 2000. – 192 с.*
3. *Вишнякова Л. А, Путов Н. В. Этиология острых пневмоний // Тер. архив. – 1990. – № 3. – С. 15–18.*
4. *Гаврильев С.С., Николаев В.П. и др. Совершенствование технологии химиотерапии туберкулёза легких, отягощенного сопутствующими заболеваниями // Пробл. туберкулёза. – 2001. – № 2. – С. 8-11.*
5. *Гизатулина Э.Д. // Характеристика неспецифической микрофлоры у больных туберкулёзом // Клинич. микробиология и антимикробн. терапия. – 2010. – № 3. – С. 15-21*
6. *Ерохин В.В., Филиппенко Л.Н., Давыдов А.П. Электронно-микроскопическое изучение легких при туберкулёзе и неспецифическом воспалении // Пробл. туберкулёза. – 1982. – № 10. – С. 58-62.*
7. *Ивушкина Л.В., Митрохин С.Д., Мороз А.М. Роль отдельных представителей оппортунистической микрофлоры в развитии вторичной инфекции у больных туберкулёзом легких // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – Т. 49. – № 10. – С.7 - 9.*
8. *Ивушкина Л.В. Микробиологическая диагностика оппортунистических инфекций у больных туберкулёзом легких // Лабораторные исследования при туберкулёзе / Под ред. В.И. Литвинова, А. М. Мороза. – М.: МНПЦБТ. – 2013.- С. 283-320.*
9. *Мишин В.Ю., Завражнов С.П. Эффективность химиотерапии у больных туберкулёзом легких с сопутствующей неспецифической бронхолегочной инфекцией // Пульмонология. – 2005. – № 2. – С. 33-35.*
10. *Приказ Минздрава СССР № 535 от 22.04.1985. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».*
11. *Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания Минздрава России: МУК 4.2.1890-04 от 04.03.2004.- 53 с.*
12. *Плетнев Г.В., Краснов В.А., Поташова В.А. Лечение больных деструктивным туберкулёзом легких и неспецифическим гнойным эндобронхитом // Пробл. туберкулёза. – 2003. - № 2. – С. 33-35.*
13. *Скала Л.З., Нехорошева А.Г., Лукин И.Н. и др. Современные технологии в клинической микробиологии и химиотерапии. Автоматизированное рабочее место врача-микробиолога, химиотерапевта и эпидемиолога // Клиническая лабораторная диагностика.– 2001. - № 12. – С. 25-32.*
14. *Шмелев Е.И. Хронические обструктивные болезни легких. – М.: Медицина, 2000. – С. 39-56.*

Сведения об авторе

***Ивушкина Лариса Валентиновна** – врач-бактериолог Централизованной бактериологической лаборатории ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*

Москва, 107014, ул. Стромынка, д. 10

Телефон (499) 268 70 33

e-mail: mnpcbdir2012@yandex.ru

УДК 616.24-002.5-079:57.083

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЖНОГО ТЕСТА С АЛЛЕРГЕНОМ ТУБЕРКУЛЁЗНЫМ РЕКОМБИНАНТНЫМ И ЛАБОРАТОРНОГО ТЕСТА QUANTIFERON–GIT У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Л.В. Слогоцкая[1], Д.А. Иванова[1], О.Ю. Сенчихина[1], М.В. Макарова[2], О.И. Алещенкова[1], Н.В. Куликовская[1], Т.В. Ванеева[1]

COMPARATIVE RESULTS OF SKIN TESTING USING TUBERCULOSIS ALLERGEN RECOMBINANT AND QUANTIFERON–GIT IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH TB INFECTION

L.V. Slogotskaya, D.F. Ivanova, O.Yu. Senchihina, M.V. Makarova, O.I. Aleschenkova, N.V. Kulikovsraya, T.V. Vaneeva

Цель: *сопоставить результаты кожного теста с аллергеном туберкулёзным рекомбинантным CFP-10-ESAT-6 (ДИАСКИНТЕСТ®–ДСТ) и лабораторного теста QuantiFERON-TBGold-IT (QFT) у детей и подростков с туберкулёзом органов дыхания (ТОД) и латентной туберкулёзной инфекцией (ЛТИ).*

Обследовано 210 детей и подростков, в том числе 47 (22,4%) с ЛТИ и 163 (77,6%) с ТОД. Дети с ЛТИ получали химиотерапию более 2 месяцев; больные ТОД – более 6 месяцев. Положительные реакции на пробу с ДСТ отмечены у 172 обследованных (81,9%, 95% ДИ 76,1-86,6%), причем у больных ТОД 90,7%, тогда как у детей с ЛТИ – 51,1% (p<0,001 по критерию χ^2). Положительные результаты теста QFT отмечены у 176 пациентов (83,8%, 95%ДИ 78,2-88,2%) причем также чаще в группе детей с ТОД (92,6% по сравнению с 53,2% в группе с ЛТИ, p<0,001 по критерию χ^2). Результаты обоих тестов (ДСТ и QFT) совпадали в 90,5% (у 190 чел., 95% ДИ 85,7-93,8%). Коэффициент согласия каппа свидетельствует о высокой степени согласия результатов тестов (0,67±0,07; p<0,001). Обнаружена прямая корреляция между размером папулы ДСТ и количественным результатом QFT (ρ=0,51, p<0,001). Процент дискордантных реакций составил 9,5% (20 пациентов). У 11 детей с отрицательной реакцией на ДСТ тест QFT оказался положительным. В их числе были 9 детей, у которых ранее, перед началом терапии, проба с ДСТ была положительной, а при проведении тестов в рамках данного исследования стала отрицательной. Возможно, у этих детей реверсия ДСТ на фоне химиотерапии опередила негативацию QFT, что и определило дискордантность результатов.

Ключевые слова: *тест QuantiFERON-TBGold-IT (QFT), тест с аллергеном туберкулёзным рекомбинантным CFP-10-ESAT-6 (ДИАСКИНТЕСТ®), дети и подростки*

Aim: *to compare results of skin testing using the preparation CFP-10-ESAT-6 (DST) and QuantiFERON – GIT (QFT) in children and adolescents with local TB or latent TB infection (LTBI). 210 children and adolescents were studied including 163 (77,6%) with TB and 47 (22,4%) with LTBI. All the children received chemotherapy for at least 2 months for LTBI and 6 months for active TB. Positive DST was observed in 172 (81,9%, 95%CI 76,1-86,6%) including 90,7% in TB-patients and 51,1% in LTBI, p<0,001. Positive QFT-GIT was registered in 176 (83,8%, 95%CI 78,2-88,2%) subjects including 92,6% in TB-patients and 53,2% in LTBI, p<0,001. Agreement of DST and QFT-GIT was 90,5% (95%CI 85,7-93,8%), kappa coefficient was 0,67±0,07 (p<0,001). Discordance was registered in 20 (9,5%) cases. 11 patients with negative DST reactions have positive QFT results. Among them 9 patients initially had positive DST – reactions and after chemotherapy reaction became negative. Probably DST reversion in these children as a result of chemotherapy pass ahead of reversion QFT results. This determined the discordant reactions.*

Keywords: *skin testing using the preparation CFP-10-ESAT-6 (DST) and QuantiFERON–GIT (QFT), children and adolescents*

[1] *ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»*
[2] *ГКУЗ «Туберкулёзная больница № 6 Департамента здравоохранения города Москвы»*

Введение

В конце XX века была завершена расшифровка геномов *M. tuberculosis, M. bovis* и *M. bovis BCG* [9]. Сравнительные исследования геномов [7, 13, 17] привели к идентификации зоны RD1, присутствующей во всех штаммах *M. tuberculosis* и патогенных штаммах *M. bovis*, но отсутствующей во всех штаммах вакцины *M. bovis* BCG и большинстве нетуберкулёзных микобактерий. В этой зоне, в частности, кодируется секреция двух белков: ESAT-6 и CFP-10. В связи с их отсутствием у *M. bovis* BCG, они способны в диагностическом тесте дифференцировать туберкулёзную инфекцию и вакцинацию BCG [10].

В последние 10 лет были разработаны и во многих странах разрешены к применению два варианта лабораторных тестов для диагностики латентной туберкулёзной инфекции, основанные на измерении продукции интерферона-γ (ИНФ-γ) Т-лимфоцитами крови в ответ на стимуляцию белками ESAT-6 и CFP-10 (IGRA – *Interferon–Gamma Release Assays*). Один из них, QuantiFERON (QFT), его поздняя версия QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT), (Cellestis, Австралия), использует твердофазный иммуносорбентный анализ для измерения антиген специфичной продукции ИНФ-γ циркулирующими Т-клетками в цельной крови. Другой тест, T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Великобритания), использует технику Elispot для измерения количества мононуклеарных клеток периферической крови, продуцирующих ИНФ-γ. Последние версии тестов используют 3 антигена *M. tuberculosis* – ESAT-6, CFP-10 и TB7.7.

Поскольку ESAT-6, CFP-10 экспрессируются при размножении микобактерий [4, 20], иммунный ответ на эти антигены отражает наличие в организме активной туберкулёзной инфекции [6, 12, 14].

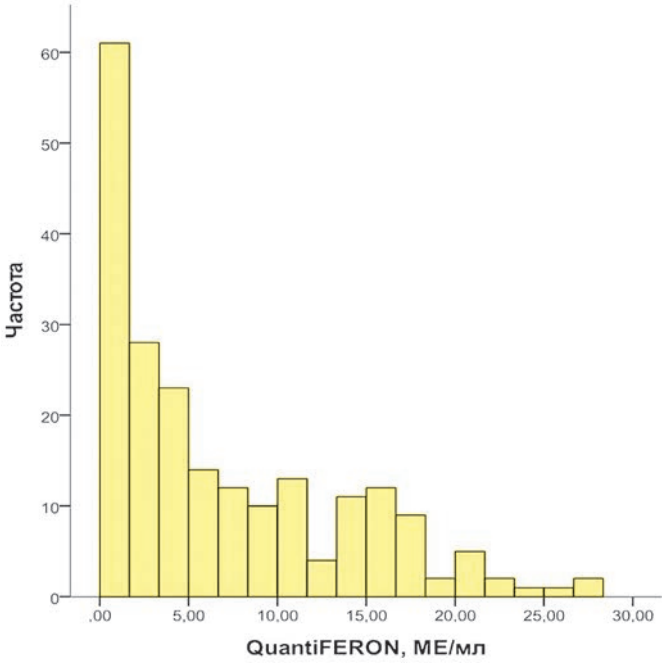


Рис. 1. Распределение пациентов по результатам теста QFT-GIT

Тесты IGRA обладают достаточно высокой чувствительностью и почти 100% специфичностью [5, 15, 16, 18].

Однако в некоторых исследованиях отмечена значительная вариабельность результатов IGRA при исследовании одного и того же испытуемого [8, 11, 15, 19]. По мнению ряда авторов, сомнительные результаты (или «серая зона») находятся для QFT-GIT в диапазоне 0,2-0,6 МЕ/мл (при официальном пороговом значении 0,35 МЕ/мл) и, очевидно, потребуется пересмотреть эти пороговые значения для определения понятий конверсии и реверсии в данных тестах [19].

Имеющейся на сегодня информации для оценки чувствительности, специфичности и воспроизводимости IGRA у детей недостаточно.

Недостатками тестов IGRA являются: высокая стоимость (только расходных материалов – 24 € за одно исследование), потребность в оснащенной лаборатории, внутривенные манипуляции.

Разработанный в России кожный тест с аллергеном туберкулёзным рекомбинантным CFP-10-ESAT-6 (ДИАСКИНТЕСТ) работает по принципу «включить/выключить» – папула любого размера считается положительной реакцией. Исследования показали, что повторные тесты при изначально отрицательных результатах не приводят к конверсии при отсутствии контакта с бактериовыделителем, конверсия наблюдается только при наличии такого подтвержденного контакта [1]. Преимущества теста – простота исполнения (аналогично пробе Манту), низкая стоимость препарата – 2,0 € за одно исследование.

В 2013 году опубликовано сообщение H. Aggerbeck и соавт. [2] о первой и второй фазе клинических испытаний кожного теста с препаратом C-Tb, представляющим собой смесь двух рекомбинантных белков ESAT-6 и CFP-10 в соотношении 1:1, продуцируемых Lactococcus lactis, в дозе 0,1 мкг и 0,01 мкг. Первая доза по кожной реакции у 38 взрослых больных туберкулёзом соответствовала дозе 1 ТЕ датского туберкулина. Кожная проба у 151 здорового, вакцинированного BCG добровольца показала специфичность 97%. У взрослых больных туберкулёзом кожную реакцию C-Tb сравнивали с тестом QFT-GIT. В дозе 0,1 мкг C-Tb сравнение с QFT-GIT показало сходные результаты у 18 из 22 пациентов (82%). В четырех случаях (в двух – при туберкулёзе лимфоузлов, в двух – при туберкулёзе лёгких) были разноречивые результаты: у двух больных при положительных результатах кожных тестов (по одному с туберкулёзом лимфоузлов и туберкулёзом лёгких) были отрицательные результаты теста QFT-GIT (0,13 МЕ/мл и 0,31 МЕ/мл). У двух других, имевших положительный результат теста QFT-GIT (1,33 МЕ/мл и 2,19 МЕ/мл), были отрицательные кожные реакции. У четырёх пациентов оба теста были отрицательными.

Цель исследования – сопоставить результаты кожного теста с аллергеном туберкулёзным рекомбинантным CFP-10-ESAT-6 (ДИАСКИНТЕСТ®) и лабораторного теста оценки продукции

гамма интерферона в ответ на стимуляцию специфическими антигенами (CFP-10, ESAT-6 и TB7.7) QFT-GIT у детей и подростков с туберкулёзом органов дыхания (ТОД) и латентной туберкулёзной инфекцией (ЛТИ).

Материал и методы исследования

В наблюдение включено 210 детей в возрасте 12,4±3,14 лет (от 6 до 18 лет, медиана 13 лет), 50,5% мальчиков и 49,5% девочек с ТОД и ЛТИ.

Вираж туберкулиновых проб без клинико-рентгенологических признаков активного туберкулёза имел место у 47 детей (22,4%) – ситуация расценена как ЛТИ. У 163 детей (77,6%) установлен диагноз ТОД. В структуре клинических форм преобладали туберкулёз внутригрудных лимфатических узлов (50,6%), первичный туберкулёзный комплекс (21%), очаговый туберкулёз (15,4%); встречались случаи инфильтративного (8,6%) и диссеминированного (3,1%) туберкулёза, кавернозный туберкулёз и туберкулема (по одному случаю). Все случаи туберкулёза были подтверждены с применением необходимого комплекса диагностических мероприятий (посевы диагностического материала, полное рентгенологическое исследование, включая компьютерную томографию при необходимости). Более чем у половины больных туберкулёзом (54,6%) на момент обследования имела место неактивная фаза процесса (уплотнение и/или кальцинация туберкулёзных очагов). Дети с ЛТИ получали превентивную терапию двумя препаратами длительностью более двух месяцев; больные ТОД – химиотерапию согласно Приказу Минздрава России № 109, длительность которой к моменту включения в исследование превышала шесть месяцев.

Все дети обследованы с помощью двух методик в течение одного дня: сначала забор крови для теста QFT-GIT, затем постановка внутрикожного теста с рекомбинантным туберкулёзным антигеном ESAT-6-CFP-10 (ДСТ) 0,2 мкг в 0,1 мл с целью предупреждения возможного бустер-эффекта.

У 169 детей (80,5%) кожный тест с ДСТ проведен дважды – при выявлении заболевания и через 6 месяцев (в рамках данного исследования на фоне проводимой химиотерапии).

Согласно инструкциям производителей, тест QFT-GIT считали положительным при значении 0,35 МЕ/мл и выше; пробу с ДСТ – при наличии папулы любого размера.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel for Windows XP. Оценивали частоту положительных и отрицательных результатов обоих тестов в процентах от общего числа обследованных, частоту дискордантных реакций с указанием 95%-ных доверительных интервалов. При оценке различий в результатах теста между несвязанными группами использовали критерии χ^2 и Манна-Уитни. Для оценки согласованности результатов обоих тестов рассчитывали коэффициент каппа. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

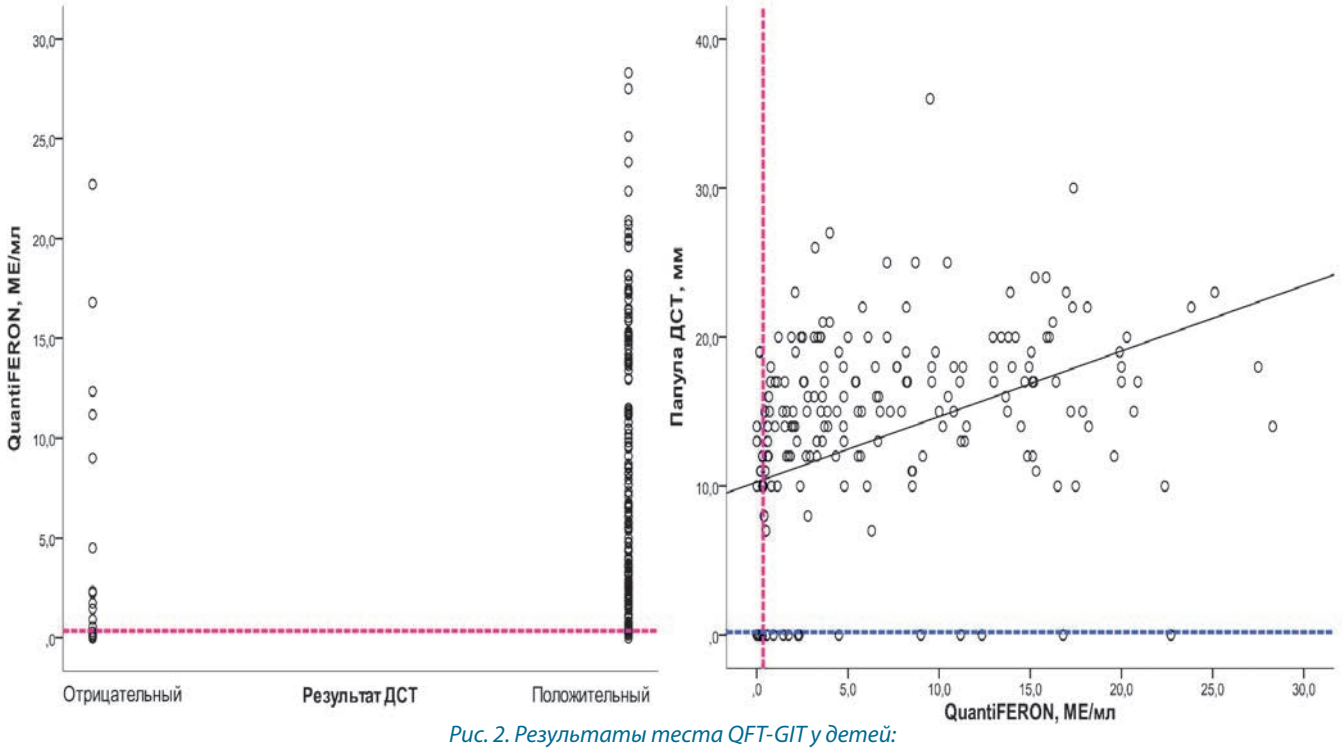


Рис. 2. Результаты теста QFT-GIT у детей:
а – с положительными и отрицательными реакциями на пробу с ДСТ,
б – с различным диаметром папулы после введения ДСТ.
Пунктиром обозначены линии разделения положительных и отрицательных результатов при интерпретации соответствующего теста: синим – для результатов QFT (0,35 МЕ/мл), красным – для ДСТ (папула любого размера); на рис. 2б указана линия регрессии

Результаты и обсуждение

Положительные результаты пробы с ДСТ отмечены у 172 обследованных (81,9%, 95%ДИ 76,1–86,6%), отрицательные – у 38 (18,3%, 95%ДИ 13,5–23,9%). У больных ТОД частота положительных проб ДСТ составила 90,7%, тогда как у детей с ЛТИ – 51,1% ($p < 0,001$ по критерию χ2). Средний размер папулы составил 16,2±4,43 мм (от 7 до 36 мм, медиана 16 мм).

У 169 детей ранее (до начала химиотерапии) уже выполняли пробу с ДСТ: положительные результаты были отмечены у 147 из 169 (87,0%, 95%ДИ 81,0–91,3%), средний размер папулы составлял 16,9±6,11 мм (от 5 до 54 мм, медиана 16 мм). При этом у 11 из 147 больных на фоне химиотерапии отмечена реверсия ранее положительной пробы с ДСТ в отрицательную (7,5%); у одной пациентки с активным инфильтративным туберкулёзом – напротив, конверсия реакции (появление папулы 20 мм), что можно отнести за счет исчезновения феномена отрицательной анергии (т. е. имело место восстановление клеточного иммунитета на фоне лечения).

Положительные результаты теста QFT-GIT получены у 176 пациентов (83,8%, 95%ДИ 78,2–88,2%), отрицательные – у 34 (16,2%, 95%ДИ 11,8–21,8%). Положительный результат теста чаще отмечали в группе детей с ТОД (92,6% по сравнению с 53,2% в группе с ЛТИ, $p < 0,001$ по критерию χ^2).

Среднее значение продукции гамма-интерферона в ответ на стимуляцию специфическими антигенами составило 6,84±6,74 МЕ/мл, медиана 4,45 МЕ/мл, разброс значений от 0 до 28,3 МЕ/мл (распределение см. рис. 1).

Продукция гамма-интерферона была выше у больных детей (7,63±6,85 МЕ/мл, медиана 5,5 МЕ/мл, интерквартильный размах 1,89-12,96 МЕ/мл), чем при ЛТИ (4,21±5,68 МЕ/мл, медиана 1,13 МЕ/мл, интерквартильный размах 0-7, 14 МЕ/мл). Различия были статистически значимы ($p < 0,001$ по критерию Манна-Уитни).

У 14 пациентов (6,6%) результаты QFT-GIT находились в диапазоне 0,2 – 0,6 МЕ/мл. Как было указано выше, такие значения могут быть расценены как сомнительные или «серые». Если опираться на данный вариант интерпретации, частота положительных результатов QFT-GIT составила 170 (79,8%), сомнительных – 14 (6,6%), отрицательных – 29 (13,6%).

Результаты обоих тестов (ДСТ и QFT-GIT) совпадали в 90,5% (у 190 больных, 95%ДИ 85,7–93,8%). Коэффициент согласия каппа составил 0,67±0,07 ($p < 0,001$), что свидетельствует о высокой степени согласия результатов обоих тестов. Обнаружена прямая корреляция между размером папулы ДСТ и количественным результатом QFT-GIT ($\rho = 0,51$, $p < 0,001$, см. рис. 2б). Результаты теста QFT-GIT у больных с положительными и отрицательными реакциями ДСТ представлены на рисунке 2 (а, б).

Процент дискордантных реакций составил 9,5% (20 пациентов).

У 11 детей с отрицательной реакцией на пробу с ДСТ тест QFT-GIT оказался положительным. В их числе были девять детей, у которых ранее, перед началом терапии, проба с ДСТ была положительной, а затем, при проведении тестов в рамках данного исследования, зафиксированы отрицательные результаты ДСТ и положительные – QFT-GIT. Возможно, у этих детей реверсия ДСТ на фоне химиотерапии опередила негативацию QFT-GIT, что и определило дискордантность результатов.

У двух больных результат ДСТ изначально был отрицательным и сохранялся таковым, между тем как QFT-GIT показал положительный результат. Еще у девяти детей с положительной реакцией на пробу с ДСТ тест QFT-GIT оказался отрицательным.

С целью объяснить расхождение результатов тестов у этих 11 детей проведен детальный анализ каждого случая, с учетом преимущественной направленности обоих тестов не столько на диагностику туберкулёза как такового, сколько на оценку активности процесса. Клинические характеристики больных детей представлены в таблице.

У пациентов № 2, 3, 6, 7, 8 результаты QFT-GIT отрицательны, а результаты ДСТ – положительны (по рентгенологическим данным – фаза инфильтрации). У пациента № 4 процесс в фазе кальцинации, результат QFT-GIT положителен, а результат ДСТ – отрицателен. У пациента № 5 процесс также в фазе кальцинации, отмечена значительная регрессия папулы и «сомнительный» результат QFT-GIT.

У некоторых детей результаты QFT-GIT могли быть отнесены в группу «сомнительных». При возможности такой трактовки дискордантность тестов была бы меньше. Исследование необходимо продолжить для получения статистически более значимых результатов при их клинико-рентгенологическом согласовании.

Заключение

Оба теста продемонстрировали высокую частоту положительных реакций: ДСТ – 81,7% (95%ДИ 76,1–86,6%) и QFT-GIT 85,0% (95%ДИ 78,2–88,2%). Эти цифры нельзя считать точно характеризующими чувствительность теста, поскольку больные и пациенты с ЛТИ прошли курс лечения, и у части из них произошла реверсия положительных результатов.

Результаты проведения обоих тестов демонстрируют высокую степень согласованности между собой (совпадение в 90,5% случаев, коэффициент каппа 0,67±0,07, $p < 0,001$).

Частота дискордантных реакций в данном исследовании отмечена в 9,5% случаев (95%ДИ 6,2–14,3%). Реверсия реакции на пробу с ДСТ до отрицательных значений отмечена у 11 человек (что соответствовало динамике клинико-рентгенологической картины), у 9 из них отмечена положительный результат QFT-GIT.

Таблица. Клинические характеристики пациентов с дискордантными результатами теста QFT-GIT и пробы с ДСТ

№	Основной диагноз	Возраст	Папула ДСТ, мм		Результат QFT-GIT	
			при выявлении	на фоне лечения	МЕ/мл	интерпретация
1	Диссеминированный ТБ в фазе рассасывания	18	0	0		
2	ТБ ВГЛУ в фазе инфильтрации	14	–*	11	0,19	отрицат.
3	ТБ ВГЛУ в фазе инфильтрации	16	–	11	0,21	отрицат. (сомнит.*)
4	ТБ ВГЛУ в фазе кальцинации	14	0	0	22,7	полож.
5	ТБ ВГЛУ в фазе кальцинации	14	18	10	0,3	отрицат. (сомнит.*)
6	Первичный туберкулезный комплекс в фазе инфильтрации	16	–	14	0,00	отрицат.
7	Первичный туберкулезный комплекс в фазе инфильтрации	15	–	13	0,00	отрицат.
8	Инфильтративный ТБ верхней доли правого легкого в фазе инфильтрации	17	18	19	0,15	отрицат.
9	Очаговый ТБ левого легкого в фазе уплотнения	17	14	12	0,3	отрицат. (сомнит.*)
10	Латентная туберкулезная инфекция	10	0	0	2,33	полож.
11	Латентная туберкулезная инфекция	15	10	10	0,00	отрицат.

– – нет данных (тест не проводили).

* – сомнительный результат только по мнению экспертов (не производителя).

Литература

1. *Слогоцкая Л.В., Кочетков Я.А., Сенчихина О.Ю. и др. Динамика кожной пробы (диаскинтест) у детей при оценке активности туберкулёзной инфекции // Туберкулёз и болезни лёгких.– 2011. – № 2 – С. 59-63.*
2. *Aggerbeck H. Giemza R., Joshi P. et al. Randomised clinical trial investigating the specificity of a novel skin test (C-Tb) for diagnosis of M. tuberculosis infection // PLoS One. – 2013. – Vol. 8: e64215. doi: 10.1371/ journal. pone.0064215*
3. *Aiken A., Hill P., Fox A. et al. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases // BMC Infect. Dis. – 2006. – Vol.6. – P. 66.*
4. *Andersen P., Andersen A., Sorensen A., Nagai S. Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice // J. Immunol. – 1995. – Vol. 154. – 7. – P. 3359-3372.*
5. *Andersen P., Munk M., Pollock J., Doherty T. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis // Lancet. – 2000. – Vol. 356. – P. 1099-1104.*
6. *Bakir M, Millington K, Soysal A et al. Prognostic value of a T-cell-based, interferon-gamma biomarker in children with tuberculosis contact // Ann. Intern. Med. – 2008. – Vol. 149(11). – P. 777–7787.*
7. *Behr M., Wilson M., Gill W. et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 1520-1523.*
8. *Belknap R., Kelahar J., Wall K., et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection in US health care workers: reproducibility, repeatability and 6 month follow-up with interferon gamma release assays (IGRAs) //Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2009. – Vol. 179:A4101.*
9. *Cole S., Brosch R., Parkhill J. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence // Nature. – 1998. – Vol. 393. – P. 537-544.*
10. *Connell T., Ritz N., Paxton G. et al. A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON TB Gold and T-SPOT.TB in children // PLoSONE – 2008. – Vol. 3. – e2624. doi:10.1371/journal.pone.0002624.*
11. *Detjen A., Loebenberg L., Grewal H., et al. Short-term Reproducibility of a Commercial Interferon-gamma Release Assay // Clin. Vaccine Immunol. –2009. – Vol. 16. – P. 1170–1175.*
12. *Diel R., Loddenkemper R., Meywald-Walter K. et al. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 177. – P. 1164-1170.*
13. *Dillon D., Alderson M., Day H. et al. Molecular and immunological characterization of Mycobacterium tuberculosis CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterium bovis BCG // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38. – P. 3285-3290.*

14. Doherty T., Demissie A., Olobo J. et al. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40. – P. 704-706.
15. Ewer K., Millington K., Deeks J. et al. Dynamic antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to Mycobacterium tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2006. – Vol. 174. – P. 831-839.
16. Goletti D., Stefania C., Butera O., et al. Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: a multicenter TBNET-Study // PLoS ONE 2008; 3:e3417)
17. Mahairas G., Sabo P., Hickey M. et al. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis // J. Bacteriol. – 1996. –Vol. 178. – P. 1274-1282.
18. Munk M., Arend S., Brock I. et al. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis // J. Infect Dis. – 2001. – Vol.183 (1). – P.175-176.
19. van Zyl-Smit R., Pai M., Peprah K. et al. Within-subject variability and boosting of T Cell IFN-γ responses following tuberculin skin testing // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2009. – Vol. 180.– P. 49-58.
20. Vordermeier H., Chambers M., Cockle P. et al. Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following Mycobacterium bovis BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis // Infect. Immun. – 2002. – Vol. 70. – P. 3026-3032.

Сведения об авторах

Слогоцкая Людмила Владимировна *– заведующая научно-клиническим отделом ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор медицинских наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д.10
Телефон (499) 269-14-10
e-mail: lyu186@yandex.ru

Иванова Диана Александровна *– ведущий научный сотрудник научно-клинического отдела ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д.10
Телефон (499) 269-14-10

Сенчихина Ольга Юрьевна *– заведующая отделением фтизиатрической помощи детям и подросткам ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д.10
Телефон (499) 268-19-70; факс (499) 785-20-81

Макарова Мария Владимировна *– заведующая туберкулезным легочным отделением ГКУЗ «Туберкулезная больница № 6 Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 141034, Московская обл., Мытищинский р-н, пос. Здравница, ул. Дубки, д. 7
Телефон (495) 586-75-65
e-mail: info: tb6/mosgorzdrav.ru

Алещенкова Ольга Ивановна *– заведующая филиалом «Детское отделение» ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 105568, г. Москва, ул. Чечулина, д. 5
Телефон (499) 308-97-40
e-mail: det-otdel@mail.ru

Куликовская Наиля Вафиновна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д. 10
Телефон (496) 603 30 33

Ванеева Татьяна Владимировна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, Москва, ул. Стромынка, д.10
Телефон (496) 603 30 33

УДК 57.083:615.074

СТАБИЛЬНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДИАСКИНТЕСТ® ПРИ ХРАНЕНИИ В СТРЕСС–УСЛОВИЯХ

И.В. Бочарова [1], К.Б. Майоров [1], О.В. Демихова [1], Д.А. Кудлай [2]

STABILITY OF SPECIFIC ACTIVITY AND SPECIFICITY OF DIAGNOSTIC PRODUCT DIASKINTEST® IN STORAGE UNDER STRESS CONDITIONS

I.V. Bocharova, K.B. Majorov, O.V. Demikhova, D.A. Kudlay

Проведено исследование по оценке стабильности диагностического препарата ДИАСКИНТЕСТ®– аллерген туберкулёзный рекомбинантный в стандартном разведении, раствора для внутрикожного введения, по показателям «Специфическая активность» и «Специфичность» на морских свинках, согласно требованиям ФСП ЛСР-006435/08-110808, в зависимости от температуры и длительности хранения. Установлено отсутствие достоверных различий специфической активности и специфичности препарата ДИАСКИНТЕСТ® в зависимости от температуры хранения препарата в диапазоне от 2°С до 23°С и длительности хранения от 7 до 30 дней.

***Ключевые слова**: диагностика туберкулёза, «ДИАСКИНТЕСТ®» –аллерген туберкулёзный рекомбинантный в стандартном разведении, M.tuberculosis, вакцинация BCG, индекс специфической активности.*

A study to assess the stability of the diagnostic product DIASKINTEST®– TB recombinant allergen in the standard dilution, solution for intradermal administration, in terms of «specific activity» and «specificity» in guinea pigs, according to the requirements of FSP LSR-006435/08-110808, depending on storage temperature and time, was performed. The absence of significant differences in the specific activity and specificity of the DIASKINTEST®was founddepending on the storage temperature in the range of 2°C to 23°C and the duration of storage of 7 to 30 days.

***Keywords:** diagnosis of tuberculosis, DIASKINTEST®– allergen tuberculous recombinant in the standard dilution, M. tuberculosis, BCG vaccination, index of specific activity.*

Введение

Одним из диагностических тестов для выявления раннего инфицирования микобактериями туберкулёза (МБТ), является рекомбинантный туберкулёзный аллерген – ДИАСКИНТЕСТ®, разработанный в НИИ молекулярной медицины Первого МГМУ им. И.М. Сеченова [1]. Основой препарата является гибридный белок, состоящий из двух антигенов, специфичных для МБТ– CFP-10 и ESAT-6. Именно эти белки играют ключевую роль в диагностике и оценке развития МБТ-инфекции [4, 5, 6]. Зарегистрированный в 2008 г. (№ ЛСР-006435/08), ДИАСКИНТЕСТ® хранится и транспортируется согласно СП 3.3.2.1248-03 при температуре от 2°С до 8°С [3]. Однако в условиях массового применения препарата и при транспортировке, и при повседневной работе в диагностических кабинетах эти условия могут нарушаться, что может вызвать сомнения в результатах проб. Это обусловило необходимость исследования стабильности ДИАСКИНТЕСТА® при отклонении от требуемых условий хранения.

Цель исследования – определение специфической активности и специфичности диагностического препарата ДИАСКИНТЕСТ® производства компании «Генериум» (Москва) при нестандартных условиях хранения.

[1] *ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
[2] *ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, г. Москва*

Табл. 1. Группы экспериментальных животных, используемые в эксперименте

№	Инфицирование	Тестирование	t° хранения препарата	Количество животных в группе
1	МБТH_{37}Rv аэрогенно	Специфическая активность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413;030513	2-8°С в течение 30 дней	18
2	МБТH_{37}Rv аэрогенно	Специфическая активность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413;030513	13°С в течение 30 дней	18
3	МБТH_{37}Rv аэрогенно	Специфическая активность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413;030513	23°С в течение 7 дней	18
4	BCG-M внутрикожно	Специфичность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413;030513	2-8°С в течение 30 дней	9
5	BCG-M внутрикожно	Специфичность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413;030513	13°С в течение 30 дней	9
6	BCG-M внутрикожно	Специфичность «ДИАСКИНТЕСТ®» серий 010413; 020413;030513	23°С в течение 7 дней	9

Задачи исследования

Для выполнения поставленной цели были определены следующие задачи:

а) провести *in vivo* исследование специфической активности трех промышленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® (t° хранения – 13±2°С в течение 30 дней и t° хранения – 23±2°С в течение 7 дней) на морских свинках, инфицированных вирулентной культурой *M. tuberculosis* штамма H_{37}Rv;

б) провести *in vivo* исследование специфичности трех промышленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® (t° хранения – 13±2°С в течение 30 дней и t° хранения – 23±2°С в течение 7 дней) на BCG-вакцинированных морских свинках.

Материалы и методы исследования

Исследуемые препараты – производственные серии препарата «ДИАСКИНТЕСТ®» (010413; 020413; 030513) и Разведенный Стандартный Образец предприятия (РСОп) препарата «ДИАСКИНТЕСТ®» серии 01/050113. 1 доза препарата и РСОп содержит 0,2 мкг/100 мкл активного вещества – рекомбинантного белка CFP-10–ESAT-6.

Аллерген туберкулёзный в стандартном разведении – туберкулин – 1 доза препарата содержит 2ТЕ/100 мкл.

Вакцина туберкулёзная (BCG) сухая для внутрикожного введения BCG-1 производства Филиал «Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва.

M. tuberculosis – фильтрованная вирулентная культура штамма H_{37}Rv.

Экспериментальные животные

Исследование проводили на самках аутбредных морских свинок-альбиносов, полученных из филиала «Андреевка» ФГБУ НЦБМ РАМН. Вес морских свинок перед инфицированием – 370-380 г. Перед началом эксперимента животные прошли двухнедельное карантинирование. В течение всего эксперимента животные содержались в стандартных условиях, согласно ветеринарно-санитарным требованиям РФ [2]. Морских свинок инфицировали аэрозольным введением *M. tuberculosis* штамма H_{37}Rv из коллекции института Пастера (Франция) с использованием аппарата для аэрогенного инфицирования фирмы «GlasCol» (США) в дозе 300 КОЕ/легкое, согласно ФСП ЛСР-006435/08-110808 [3]. Вакцинацию животных проводили внутрикожно, в области живота, в количестве 0,5 мг сухой вакцины /100 мкл растворителя на одно животное. Температура хранения РСОп препарата ДИАСКИНТЕСТ®, относительно которого определяли специфическую активность всех исследованных серий с разной температурой хранения, соответствовала ФСП ЛСР-006435/08-110808, т.е. поддерживалась в пределах 2-8°С. Для хранения исследуемых образцов препарата ДИАСКИНТЕСТ® при температуре 13°С в течение 30 дней использовали термостат фирмы «Sanyo» модель MIR–153 с функцией принудительного охлаждения. Образцы препарата ДИАСКИНТЕСТ® с температурой хранения 23°С выдерживали в течение 7 дней в термостате «BINDER», Германия.

Экспериментальных животных разделили на группы, представленные в таблице 1.

Тестирование специфической активности и специфичности трех представленных производственных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® проводили слепым методом через пять недель после инфицирования и вакцинации соответствующих групп, чередуя шприцы с препаратами по методу случайных чисел, используя предварительно подготовленные таблицы кодов. Количество животных в группе для тестирования каждой серии определено в ФСП ЛСР-006435/08-110808 и составило шесть животных для тестирования специфической активности и три – для оценки специфичности [3]. Препараты

Табл. 2. Значения среднего диаметра эритем у морских свинок, инфицированных M. tuberculosis штамма $H_{37}Rv$, в ответ на введение исследуемых серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® при различных условиях хранения и введение РСОп ДИАСКИНТЕСТа

	Условия хранения	Серия 010413/РСОп	Серия 020413/РСОп	Серия 030513/РСОп
D (mm)	t° =2-8°C 30 дней	12,0/11,96	11,58/11,75	13,4/13,0
	t° =13°C 30 дней	13,04/13,04	13,17/13,46	13,79/13,75
	t° =23°C 7 дней	11,88/11,96	13,79/13,71	12,04/12,12

p > 0,05 для всех испытуемых серий препарата ДИАСКИНТЕСТ®.

вводили внутрикожно в количестве 100 мкл на 1 кожную пробу. Учет проб проводили через 24 часа после введения. Специфическую активность оценивали с помощью индекса специфической активности (I) по отношению к производственному стандарту (РСОп), а специфичность – по отсутствию эритем у BCG-вакцинированных животных в ответ на введение ДИАСКИНТЕСТа® и их появлению в ответ на введение туберкулина в стандартной дозе.

Статистический анализ проведен с помощью программного обеспечения «Биостатистика» и «MSOfficeExcel». Оценивали среднее значение диаметра эритем (в мм) в ответ на введение ДИАСКИНТЕСТа® (M), индекс специфической активности тестируемых серий ДИАСКИНТЕСТа®, ошибку среднего (SEM), стандартное отклонение (SD), статистическую значимость (*p*) при 95% доверительном интервале.

Результаты исследования

Полученные данные показывают (табл. 2 и рис.), что средний диаметр эритем у инфицированных животных в ответ на введение ДИАСКИНТЕСТа® равнялся 12-14 мм вне зависимости от температуры и длительности хранения. Индекс специфической активности тестируемых серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® находился в пределах 0,9 до 1,05, что соответствует требованиям ФСП ЛСР-006435/08-110808. Не обнаружено достоверных отличий ($p \geq 0{,}05$) специфической активности в зависимости от измененных условий хранения представленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® относительно РСОп серии 01/050113. В группах морских свинок, вакцинированных BCG, внутрикожное введение всех исследованных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® не вызывало появление эритем, в отличие от внутрикожного введения туберкулина в стандартной дозе – 2ТЕ, что доказывает наличие в препарате специфичных белков CFP-10 и ESAT-6, присутствующих в вирулентных штаммах микобактерий туберкулёза и отсутствующих в вакцинном штамме BCG.

Заключение

Еще на стадии разработки препарата ДИАСКИНТЕСТ® изучение физико-химических свойств полученного гетеродимера

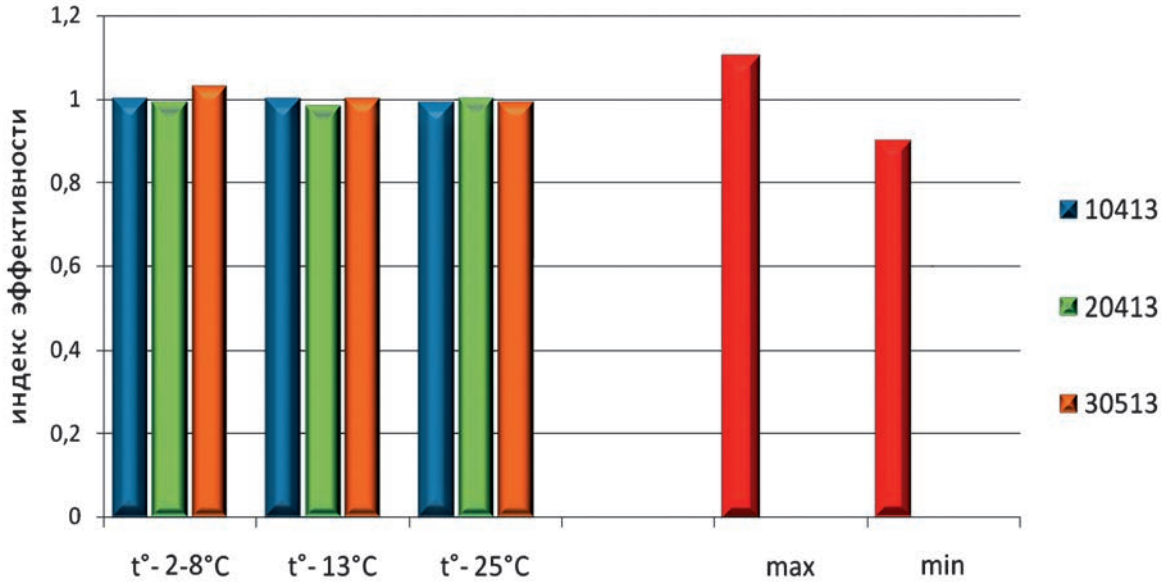


Рис. Значения индекса эффективности специфической активности трех промышленных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® (010413, 020413, 030513) у морских свинок, аэрогенно инфицированных M.tuberculosis штамма $H_{37}Rv$ через 5 недель после инфицирования при различных температурах хранения (p > 0,05). Значения «max» и «min» соответствуют параметрам индекса эффективности, утвержденным Фармакопейной статьей предприятия.

CFP-10 и ESAT-6 свидетельствовало о его высокой термодинамической и биологической стабильности. Проведенная серия экспериментов убедительно показала *in vivo* стабильность специфической активности и специфичности в отношении вирулентных штаммов *M. tuberculosis* ДИАСКИНТЕСТа®, несмотря на изменение условий его хранения. При температуре хранения 13°С в течение 30 дней и 23°С в течение 7 дней его специфическая активность и специфичность были аналогичны показателям специфической активности и специфичности аналогичных серий препарата ДИАСКИНТЕСТ® с условиями хранения, утвержденными в ФСП ЛСР-006435/08-110808, а именно 2-8°С. Во всех тестах значения кожных проб в ответ на введение диагностического препарата ДИАСКИНТЕСТ® соответствовали требованиям утвержденной Фармакопейной Статьи Предприятия.

Литература

1. Кожная проба с препаратом «ДИАСКИИНТЕСТ» – новые возможности идентификации туберкулёзной инфекции / Под ред. М.А. Пальцева. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2010. – 176 с.

2. Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации от 23.08.2010г. № 708-н «Об утверждении правил лабораторной практики».

3. Фармакопейная статья предприятия на «ДИАСКИНТЕСТ®» – аллерген туберкулёзный рекомбинантный в стандартном разведении, ЛСР-006435/08 от 11.08.2008.

4. Arend S., Franken W., Aggerbeck H. et al. Double blind randomized Phase I study comparing rdESAT-6 to tuberculin as skin test reagent in the diagnosis of tuberculosis infection // Tuberculosis (Edinb.). – 2008. – Vol. 88. – P. 249-261.

5. Majlessi L., Brodin P. et al. Influence of ESAT6 secretion system 1 (RD1) of M. tuberculosis on the interaction between Mycobacteria and the host immune system // J. Immunol. – 2005. – Vol. 174. – P. 3570-3579.

6. Mustafa A. Biotechnology in the Development of New Vaccines and Diagnostic Reagents Against Tuberculosis // Current Pharmaceutical Biotechnology – 2001. – Vol. 2. – P. 157-173.

Сведения об авторах

***Бочарова Ирина Владимировна** – старший научный сотрудник отдела иммунологии, заведующая виварием ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Телефон: (499) 780 47 14
e-mail: 3595598@mail.ru

***Демихова Ольга Владимировна** – заместитель директора по научной работе ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, доктор медицинских наук, профессор*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Телефон: (499) 785 91 59
e-mail: demikhova@mail.ru

***Майоров Константин Борисович** – старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2
Телефон: (499) 780 90 91
e-mail majorov@list.ru

***Кудлай Дмитрий Анатолевич** – профессор кафедры экономики и маркетинга ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, г. Москва, доктор медицинских наук*
e-mail: dakudlay@generiumzao.ru

УДК 575.224:57.083.1:616-002.5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И МЕТОДЫ ЕЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ У M. TUBERCULOSIS

Е.Ю. Носова, М.Б. Гикало, А.А. Хахалина, К.Ю.Галкина, С.Г. Сафонова
ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING EXTENSIVELY DRUG–RESISTANT TUBERCULOSIS, AND ASSAYS AVAILABLE FOR ITS DETECTION

E.Yu. Nosova, M.B. Gikalo, A.A. Hahalina, K.Yu. Galkina, S.G. Safonova

В условиях повсеместного распространения лекарственноустойчивых штаммов M. tuberculosis необходимо четкое понимание молекулярных основ развития устойчивости возбудителя к различным группам противотуберкулёзных препаратов. Устойчивость M. tuberculosis к фторхинолонам, как правило, вызвана различными мутациями в генах gyrA и gyrB, преимущественно в QRDR области. Устойчивость M. tuberculosis к аминогликозидам/капреомицину может быть связана с мутациями в гене rrs, промоторной области гена eis, а в редких случаях в гене tlyA. В клинической практике для выявления мутаций, связанных с устойчивостью M. tuberculosis к фторхинолонам и аминогликозидам/капреомицину могут быть использованы тест-системы ТБ-БИОЧИП2 (только для фторхинолонов) и GenoType MTBDRsl.

Ключевые слова: *широкая лекарственная устойчивость, фторхинолоны, аминогликозиды, капреомицин, молекулярные механизмы.*

Considering the growing outspread of drug-resistant strains of M. tuberculosis, a clear understanding of the molecular mechanisms underlying drug-resistance of the pathogen to different groups of antibiotics is crucial. Fluoroquinolone-resistant M. tuberculosis generally harbor various mutations in the gyrA and gyrB genes, mostly in the QRDR region. M. tuberculosis resistance to aminoglycosides/capreomycin is commonly associated with mutations in the rrs, gene, the eis promoter region, and occasionally in the tlyA gene. Two assays are available for the detection of mutations leading to fluoroquinolone and aminoglycoside resistance in clinical practice: the TB-BIOCHIP2 (only for fluoroquinolones) and the GenoType MTBDRsl.

Keywords: *XDR-tuberculosis, fluoroquinolones, aminoglycosides, capreomycin, molecular assays.*

Важной особенностью туберкулёза является тот факт, что, в отличие от многих других инфекционных заболеваний, круг лекарственных препаратов, эффективных в отношении *M. tuberculosis* (МБТ), достаточно ограничен, поэтому своевременное определение профиля лекарственной чувствительности (ЛЧ) является задачей первостепенного значения [12].

Повсеместное распространение туберкулёза с лекарственной устойчивостью (ЛУ) МБТ, особенно с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), т.е. устойчивостью к основным противотуберкулёзным препаратам первого ряда – рифампицину и изониазиду – чрезвычайно обострило проблему раннего выявления о определения спектра ЛУ МБТ.

Сочетание МЛУ с устойчивостью МБТ к фторхинолонам и, по крайней мере, к одному из препаратов группы аминогликозиды / капреомицин обозначается термином «широкая лекарственная устойчивость» (ШЛУ). Туберкулёз с ШЛУ МБТ требует проведения длительной дорогостоящей терапии и имеет неблагоприятный прогноз [17].

Фторхинолоны считаются краеугольным камнем терапии туберкулёза с МЛУ МБТ [5, 12, 29]. Мишенью действия этой группы препаратов в бактериальной клетке являются топоизомеразы II и IV, относящиеся к топоизомеразам II типа, временно разрезающим обе нити ДНК. Топоизомеразы – это ферменты, играющие центральную роль в архитектуре хромосом и непосредственно влияющие на такие фундаментальные процессы как репликация и рекомбинация ДНК. Они влияют на топологию ДНК, изменяя число зацеплений одной нити ДНК за другую. Основной функцией всех топоизомераз является предотвращение запутывания ДНК. У большинства видов бактерий присутствуют топоизомераза II (гираза) и топоизомераза IV. Однако у МБТ нет топоизомеразы IV, а есть только гираза. Гираза преставляет собой тетрамер, состоящий из двух субъединиц А и двух субъединиц В, которые кодируются генами *gyrA* (2517 п.н.) и *gyrB* (2060 п.н.) соответственно [12, 38].

Гираза образует с молекулой ДНК комплекс, внутри которого нить ДНК находится в расщепленном состоянии. Этот комплекс является мишенью для присоединения не только различных белков, но и фторхинолонов. Формирование комплекса фторхинолон+гираза+ДНК приводит к блоку репликации ДНК, остановке РНК-полимеразы и прекращению

клеточного роста. Длительное блокирование синтеза ДНК и РНК в конечном счете приводит к гибели клетки [38].

Второй механизм бактерицидного действия, запускающийся при более высоких концентрациях фторхинолонов – это фрагментация хромосом и последующий выброс активных форм кислорода [20].

Появление мутаций в генах, кодирующих субъединицы гиразы, приводит к изменению ее пространственной структуры, что препятствует связыванию фторхинолонов с ферментом. Это основной механизм развития ЛУ МБТ к фторхинолонам, он наблюдается у 42–100% устойчивых штаммов МБТ, в зависимости от особенностей популяции [21]. В этом случае, как правило, развивается устойчивость ко всем препаратам группы. В настоящее время охарактеризовано значительное количество разнообразных мутаций в генах *gyrA* и *gyrB*, связанных с развитием ЛУ МБТ к фторхинолонам. Подавляющее большинство мутаций сосредоточено в QRDR области (*Quinolone Resistance-Determining Region* – область, ответственная за ЛУ к фторхинолонам) гена *gyrA* (320 п.н.), содержащей полиморфные кодоны 74, 88, 90, 91, 94 и 95. Кодон 95 содержит естественно-обусловленный полиморфизм Ser→Thr, не влияющий на ЛЧ МБТ к фторхинолонам [21].

Давно известны такие нуклеотидные замены в QRDR области гена *gyrA*, как Ala74Ser, Ala90Val, Ser91Pro, Asp94Gly, Asp94Ala, Asp94Tyr, Asp94Asn, Asp94His [84], Gly88Cys [30, 35, 33, 10], а недавно были описаны замены Gly88Ala и His70Arg [23, 25, 36]. Мутации в 90, 91 и 94 кодонах безусловно связаны с ЛУ ко всем препаратам группы фторхинолонов [7]

Кроме того, описаны несколько мутаций вне QRDR *gyrA*, вызывающие ЛУ к фторхинолонам [4, 17, 21, 31, 34, 36].

В литературе, особенно в последние годы, широко обсуждается вопрос о влиянии мутаций в QRDR гена *gyrB* (375 п.н.) на чувствительность МБТ к препаратам фторхинолонового ряда, а также о степени этого влияния. Замены в гене *gyrB* встречаются как самостоятельно, так и в сочетании с мутациями в *gyrA* [21, 34]. Доля таких штаммов среди всех МБТ, устойчивых к этой группе препаратов, составляет около 7% [35], однако, роль некоторых из них в развитии устойчивости остается спорной. Так, замены в кодоне Arg485Cys и Arg485Asn были обнаружены только в устойчивых к офлоксацину штаммах МБТ из разных регионов мира и никогда не встречались в чувствительных штаммах, тогда как Arg485Leu была обнаружена как в устойчивых, так и в чувствительных штаммах [6, 8]. А результаты исследования, проведенного A. Pantel и соавт. [27], поставили под сомнение роль обнаруженных ранее в устойчивых к фторхинолонам клинических изолятах МБТ замен Asp473Asn, Pro478Ala, Arg485His, Ser486Phe, Ala506Gly, Ala547Val, Gly551Arg и Gly559Ala [27].

Кроме того, остается открытым вопрос о перекрестной ЛУ штаммов МБТ с различными мутациями в генах *gyrA* и *gyrB* ко всей группе фторхинолонов. Так, замены Asp500His и Asp500Asn в *gyrB* МБТ приводят к устойчивости только к левофлоксацину и офлоксацину, а Asn538Lys и Tre540Asp – только к моксифлоксацину. Недавно описанная мутация Ala74Ser в гене *gyrA* связана с низким уровнем ЛУ МБТ исключительно к моксифлоксацину, а сочетание этой замены с Asp94Gly в ДНК МБТ обусловливает перекрестную ЛУ ко всем фторхинолонам [21]. Такая избирательная ЛУ, описанная для отдельных мутаций в генах, кодирующих субъединицы гиразы, по всей видимости, связана с тонкими различиями в механизме действия разных препаратов из группы фторхинолонов на молекулярном уровне.

По данным, полученным в лаборатории Московского научно-практического центра борьбы с туберкулёзом (МНПЦБТ), у 95% (36 из 38) офлоксацин-устойчивых изолятов МБТ были обнаружены мутации в гене *gyrA*, в 5% (два из 38) – в гене *gyrB*. Замена Arg485His была выявлена в офлоксацин-чувствительном изоляте МБТ. В четырех устойчивых образцах встречались двойные замены [26].

Можно с уверенностью сказать, что при появлении, по крайней мере, двух мутаций в гене *gyrA* или мутаций в *gyrA* и *gyrB* одновременно всегда развивается высокий уровень устойчивости МБТ к фторхинолонам. [6, 7, 34].

Даже полное секвенирование генов *gyrA* и *gyrB* не всегда дает исчерпывающий ответ о причинах развития ЛУ штамма МБТ к фторхинолонам. Очевидно, в этот процесс вовлечены также другие механизмы. В качестве возможных называют мимикрию ДНК и усиленное выведение препарата из клетки с помощью эффлюксных помп [12, 13]. Однако все исследования, касающиеся этих предполагаемых механизмов развития ЛУ МБТ к фторхинолонам, были проведены на лабораторных штаммах *in vitro*, и нет никаких сведений о том, какова их роль *in vivo*.

Поэтому, исходя из имеющихся на сегодняшний день знаний и технических возможностей, одновременное выявление мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* может дать наиболее полную информацию об исследуемом штамме и повысить корреляцию с фенотипическим определением ЛУ МБТ к данным препаратам.

Вторая широко применяющаяся в клинической практике группа ПТП резервного ряда это – аминогликозиды (канамицин и амикацин) и антибиотик полипептидной структуры капреомицин. Эти разные по химической структуре препараты объединены общим механизмом действия, заключающимся в связывании с 16S-рРНК в составе 30S-рибосомы и блокировании синтеза белка в бактериальной клетке.

Основным механизмом развития ЛУ МБТ к аминогликозидам и капреомицину является возникновение мутаций в гене 16S-рРНК (*rrs*) [32]. Появление в геноме бактерии такой мутации неизбежно вызывает ЛУ к высоким дозам аминогликозидов, поскольку у МБТ, как и у других медленнорастущих микобактерий, имеется только одна копия гена *rrs* [15]. У штаммов с мутациями в гене *rrs*, как правило, наблюдается перекрестная

ЛУ ко всем препаратам данной группы. Чаще всего встречается однонуклеотидные замены A1401G, G1484T, C1402T, C1402A. В отдельных работах упомянуты замены A1196G, T1322C (+A1401G) [3] C516T [19], C514T [16], влияние которых на ЛЧ МБТ к аминогликозидам и капреомицину не вполне ясно.

Устойчивость штаммов МБТ к амикацину и капреомицину, за редкими исключениями, всегда удается объяснить возникновением мутаций в гене *rrs*. Однако примерно у 15–20% фенотипически устойчивых к канамицину штаммов мутации в гене 16S-рРНК не обнаруживаются.

В 2009 году M. Zaunbrecher и соавт. опубликовали работу, в которой показали влияние мутаций, обнаруженных в промоторной области гена *eis*, на развитие ЛУ МБТ к невысоким дозам канамицина. Ген *eis* кодирует ацетилтрансферазу, специфичную в отношении канамицина. Появление мутаций в промоторной области гена приводит к многократному увеличению его экспрессии и, следовательно, к накоплению фермента и нарастанию его эффекта, т.е., в конечном счете, к инактивации антибиотика [37]. В литературе описан целый ряд замен в промоторной области гена *eis*, однако роль некоторых из них в развитии ЛУ МБТ к канамицину дискуссионна. В ДНК МБТ обнаруживают замены G10A, C14T, G37T, C2A (+C14T) и C12T, причем C12T в большинстве случаев не приводит к развитию ЛУ МБТ к канамицину [3, 16, 37]. По данным лаборатории МНПЦБТ, мутации в промоторной области гена *eis* встречаются в 29% (10 из 34) устойчивых к канамицину изолятов МБТ, что позволяет считать эту последовательность ценным молекулярным маркером. Причем все мутации, в том числе замена C12T были найдены в устойчивых к канамицину изолятах [11].

Недавно были опубликованы данные об обнаружении мутаций внутри рамки считывания гена *eis*, которые приводили к развитию полной перекрестной ЛУ к аминогликозидам и капреомицину [3, 16]. Но в этом случае речь пока идет о единичных штаммах, и механизм развития ЛУ неизвестен.

В литературе есть сведения о том, что ЛУ к капреомицину, в абсолютном большинстве случаев связанная с мутациями в гене *rrs*, в отдельных штаммах МБТ бывает вызвана мутациями в гене *tlyA*. Ген *tlyA* кодирует метилтрансферазу TlyA, обеспечивающую метилирование нуклеотидов и связывание субъединиц рибосомы. Показано, что в отсутствие TlyA или в случае ее повреждения капреомицин не способен связываться с рибосомой и оказывать бактерицидное действие. Описано достаточно большое количество разнообразных мутаций в гене *tlyA*, однако в основном они были обнаружены в экспериментах с мутантными штаммами МБТ, отобранными *in vitro* [24]. Что касается мутаций в гене *tlyA* у клинических изолятов МБТ, то не все они изменяют чувствительность МБТ к капреомицину или же встречаются в тех штаммах, у которых ЛУ к капреомицину можно объяснить мутациями в гене *rrs*. В клинических изолятах МБТ описаны однонуклеотидные замены Asp57His, Leu164Ser, Gly195Asp, Gly196Glu, Asn236Lys [3], Ala5Val, Ala29Val, Asn236Lys [9], Leu180Arg, Ser64Trp, Ser265Thr [15] и инсерция GCnt 202 [3]. Следует отметить, что, несмотря на большое разнообразие вариантов мутаций, в целом речь идет об очень малом проценте устойчивых к капреомицину штаммов. Исключением может служить работа J. Perdigao и соавт., в которой при анализе 26 изолятов МБТ с ШЛУ, в основном относящихся к генотипу Lisboa, были обнаружены мутации Ala205Cys, Gly223Tre, Ins521CG и Ins755GT в гене *tlyA*. Примечательно, что Ins755GT являлась непосредственной причиной возникновения ЛУ МБТ к капреомицину почти в половине случаев (11 изолятов) [28]. Противоречивость сведений о связи мутаций в гене *tlyA* с ЛУ МБТ к капреомицину указывает на необходимость продолжения исследований в этом направлении.

На сегодняшний день на российском рынке присутствуют две сертифицированные тест-системы для выявления мутаций в генах, ответственных за ЛУ МБТ к фторхинолонам («ТБ-БИОЧИП-2» и GenoType MTBDRsl), и всего одна тест-система, позволяющая выявлять мутации, приводящие к ЛУ к аминогликозидам и капреомицину (GenoType MTBDRsl).

В основе тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2», разработанной в Институте молекулярной биологии РАН, лежит технология гибридизационного анализа на основе олигонуклеотидных биочипов. Олигонуклеотидные микрочипы, представляют собой подложки с гидрогелевыми элементами и иммобилизованными в них олигонуклеотидными зондами.

Биологический микрочип «ТБ-БИОЧИП-2» содержит 33 иммобилизованных дискриминирующих зонда, три маркерные ячейки для корректного сравнения интенсивности флуоресценции с использованием программного обеспечения и две ячейки, заполненные гелем, но не содержащие олигонуклеотиды, играющие роль отрицательного контроля. На данном чипе также присутствуют ячейки, содержащие зонды к последовательности IS6110.

Гелевые ячейки с иммобилизованными нуклеотидами сгруппированы таким образом, чтобы в каждой группе один элемент соответствовал последовательности ДНК дикого типа, а остальные содержали последовательности, комплементарные известным заменам в QRDR области гена *gyrA*. В зависимости от наличия или отсутствия мутаций в анализируемом образце ДНК, в процессе гибридизации формируются совершенные или несовершенные дуплексы, которые анализируют путем сравнения интенсивности флуоресцентных сигналов в каждой группе ячеек. Захват изображения, измерение интенсивности сигналов и нормализация осуществляются с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего анализатор Чипдетектор и компьютер с установленным программным обеспечением Imageware.

Подготовка образца к гибридизации на микрочипе заключается в проведении двухстадийной асимметричной ПЦР

с использованием флуоресцентно меченного праймера на второй стадии с целью амплификации фрагмента исследуемого гена и получения флуоресцентно меченной одноцепочечной ДНК. В качестве материала для получения ДНК может быть использована как культура МБТ, так и клинический материал, полученный от пациента. Чувствительность метода составляет 300 КОЕ/мл.

Тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» позволяет выявлять 10 мутаций в сегменте QRDR гена *gyrA*, в 80, 88, 90, 91, 94 кодонах, а также естественный полиморфизм Ser95Thr. [1]

GenoType MTBDRsl – это один из примеров использования ДНК-стриповой технологии, которая основана на комплементарном взаимодействии иммобилизованных на бумажном носителе (стрипе, т.е. бумажной полоске) специфичных ДНК-зондов с продуктами ПЦР. Детекция результата происходит за счет оценки сочетания появляющихся на стрипе в результате цветной ферментативной реакции окрашенных полос различной интенсивности. Интерпретацию полученных результатов осуществляют визуально с помощью эталонов, имеющихся в наборе, или с помощью специального оборудования.

GenoType MTBDRsl позволяет выявлять ДНК МБТ и одновременно с этим определять наиболее распространенные мутации в генах, ответственных за ЛУ к фторхинолонам (*gyrA*), аминогликозидам и капреомицину (*rrs*) и препарату первого ряда этамбутолу (*embB*). На стрип MTBDRsl нанесены 22 зонда, в том числе контроли амплификации и гибридизации и видоспецифическая проба на *M. tuberculosis*. Шесть ДНК-зондов обеспечивают обнаружение шести мутаций в 90, 91 и 94 кодонах гена *gyrA*; два зонда позволяют определить две замены в 1401 и 1484 положениях гена *rrs*; два зонда отвечают за выявление двух мутаций в 306 кодоне гена *embB*. Следует подчеркнуть, что GenoType MTBDRsl – это на сегодняшний день единственная сертифицированная молекулярно-генетическая тест-система для определения ЛУ МБТ к аминогликозидам и капреомицину. Недостатком описанной технологии является ее относительно низкая чувствительность, позволяющая работать, согласно рекомендациям производителя, с ДНК, полученной либо из культур клеток, либо из респираторного материала с высоким содержанием микобактерий (при положительном результате микроскопии) [2, 14].

Литература

1. *Сон И.М., Стерликов С.А., Скачкова Е.И. и др. Выявление микобактерий туберкулёза и определение лекарственной чувствительности с использованием биологических чипов.– М.: РИО ЦНИИОИЗ. – 2009. – 52 с.*
2. *Brossier F., Veziris N., Aubry A., et al. Detection by Genotype MTBDRsl test of complex resistance mechanisms to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis complex isolates // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 1683–1689.*
3. *Campbell P., Morlock G., Sikes R. et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2011. – Vol. 55– P. 2032-2041.*
4. *Chan R., Hui M., Chan E. et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Hong Kong // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – Vol. 59. – P. 866–673.*
5. *Conde M., Efron A., Loredo C. et al. Moxifloxacin versus ethambutol in the initial treatment of tuberculosis: a double-blind, randomised, controlled phase II trial // Lancet. – 2009. – Vol. 373. – N. 9670. – P. 1183-1189.*
6. *Cui Z., Wang J., Lu J. et al. Association of mutation patterns in gyrA/B genes and ofloxacin resistance levels in Mycobacterium tuberculosis isolates from East China in 2009 // BMC Infect. Dis. – 2011. – 11:78.*
7. *Duong D., Nguyen T., Nguyen T. et al. Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53. – P. 4835-4839.*
8. *El Sahly H., Teeter L., Jost K. et al. Incidence of moxifloxacin resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in Houston, Texas // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 2942-2945.*
9. *Engström A., Perskvist N., Werngren J. et al. Comparison of clinical isolates and in vitro selected mutants reveals that tlyA is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis // J. Antimicrob. Chemother. – 2011. – Vol. 66. – P. 1247-1254.*
10. *Feuerriegel S., Cox H., Zarkua N. et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53. – P. 3353-3356.*
11. *Gikalo M., Nosova E., Krylova L., Moroz A. The role of eis mutations in the development of kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from the Moscow region // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 2107-2109.*
12. *Ginsburg A., Grosset J., Bishai W. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance // Lancet Infect. Dis. – 2003. – Vol. 3. – P. 432-442.*
13. *Hegde S., Vetting M., Roderick S. et al. A fluoroquinolone resistance protein from Mycobacterium tuberculosis that mimics DNA // Science. – 2005. – Vol. 308. – N. 5727. – P. 1480-1483.*
14. *Hillemann D., Rusch-Gerdes S., Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of Mycobacterium tuberculosis strains and clinical specimens // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – P. 1767-1772.*
15. *Ji Y., Colston M., Cox R. The ribosomal RNA (rrn) operons of fast-growing mycobacteria: primary and secondary structures and their relation to rrn operons of pathogenic slow-growers // Microbiology. – 1994. – Vol. 140. – P. 2829-2840.*
16. *Jnawali H., Yoo H., Ryoo S. et al. Molecular genetics of Mycobacterium tuberculosis resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 29. – P. 975-982.*
17. *Kam K., Yip C., Cheung T. et al. Stepwise decrease in moxifloxacin susceptibility amongst clinical isolates of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: correlation with ofloxacin susceptibility // Microb. Drug Resist. – 2006. – Vol. 12. – P. 7-11.*
18. *Kim D., Kim H., Park S. et al. Treatment outcomes and long-term survival in patients with extensively drug-resistant tuberculosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2008. – Vol.178. – P. 1075-1082.*
19. *Krüüner A., Jureen P., Levina K. et al. Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – Vol. 47. – P. 2971-2973.*
20. *Malik M., Zhao X., Drlica K. Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones // Mol. Microbiol. – 2006. – Vol. 61. – P. 810-825.*

21. Malik S., Willby M., Sikes D. et al. New insights into fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis: functional genetic analysis of gyrA and gyrB mutations // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – e39754.
22. Maruri F., Sterling T., Kaiga A. et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – P. 819-831.
23. Matrat S., Veziris N., Mayer C. et al. Functional analysis of DNA gyrase mutant enzymes carrying mutations at position 88 in the A subunit found in clinical strains of Mycobacterium tuberculosis resistant to fluoroquinolones // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50. – P. 4170-4173.
24. Maus C., Plikaytis B., Shinnick T. Mutation of tlyA confers capreomycin resistance in Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – P. 571-577.
25. Mokrousov I., Otten T., Manicheva O. et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Russia //Antimicrob. Agents Chemother. – 2008. – Vol. 52. – P. 2937-2939.
26. Nosova E., Bukatina A., Isaeva Yu. et al. Analysis of mutations in the gyrA and gyrB genes and their association with the resistance of Mycobacterium tuberculosis to levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin // J. Med. Microbiol. – 2013. – Vol. 62. – P. 108-113.
27. Pantel A., Petrella S., Matrat S. et al. DNA gyrase inhibition assays are necessary to demonstrate fluoroquinolone resistance secondary to gyrB mutations in Mycobacterium tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. – 2011. – Vol. 55. – P.4524-4529.
28. Perdigão J., Macedo R., Malaquias A. et al. Genetic analysis of extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in Lisbon, Portugal // J. Antimicrob. Chemother. – 2010. – Vol. 65. – P. 224-227.
29. Poissy J., Aubry A., Fernandez C. et al. Should moxifloxacin be used for the treatment of extensively drug-resistant tuberculosis? An answer from a murine model // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54. – P. 4765-4771.
30. Shi R., Zhang J., Li C. et al. Emergence of ofloxacin resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from China as determined by gyrA mutation analysis using denaturing high-pressure liquid chromatography and DNA sequencing // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 4566-4568.
31. Sulochana S., Narayanan S., Paramasivan C. et al. Analysis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from India // J. Chemother. – 2007. – Vol. 19. – P. 166–171.
32. Suzuki Y., Katsukawa C., Tamaru A. et al. Detection of kanamycin-resistant Mycobacterium tuberculosis by identifying mutations in the 16S rRNA gene // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 5. – P. 1220-1225.
33. van Doorn H., An D., de Jong M., et al. Fluoroquinolone resistance detection in Mycobacterium tuberculosis with locked nucleic acid probe real-time PCR // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2008. – Vol. 12. – P. 736-742.
34. Von Groll A., Martin A., Jureen P. et al. Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis and mutations in gyrA and gyrB // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53. – P. 4498–4500.
35. Wang J., Lee L., Lai H. et al. Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – Vol. 59. – P. 860-865.
36. Yin, X., Yu, Z. Mutation characterization of gyrA and gyrB genes in levofloxacin-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Guangdong Province in China // J. Infect. – 2010. – Vol. 61. – P. 150–154.
37. Zaunbrecher M., Sikes R., Metchock B. et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in Mycobacterium tuberculosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106. – P. 20004–20009.
38. Zhou J., Dong Y., Zhao X. Et al. Selection of antibiotic-resistant bacterial mutants: allelic diversity among fluoroquinolone-resistant mutations // J. Infect. Dis. – 2000 – Vol. 182. – P. 517-525.

Сведения об авторах

Носова Елена Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат медицинских наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Телефон (496) 603 30 33

Гикало Марина Борисовна *– научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Телефон (496) 603 30 33
e-mail: m-lle-marina@rambler.ru

Хахалина Анастасия Александровна *– научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Телефон (496) 603 30 33

Галкина Ксения Юрьевна *– ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», кандидат биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Телефон (496) 603 30 33

Сафонова Светлана Григорьевна *– заведующая отделом проблем лабораторной диагностики туберкулёза и патоморфологии ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы», доктор биологических наук*
Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10
Телефон (496) 603 30 33
e-mail: safonova.s.g@inbox.ru

УДК 575.17:579.242-871.9:616-022.1-002.5

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Т.К. Кондратьева[1], Т.Л. Ажикина[2], М.О. Шлеева[3], А.С. Капрельянц[3], А.С. Апт[1]

Введение

Mycobacterium tuberculosis вызывает у людей инфекцию с широким спектром клинических проявлений – от бессимптомного носительства до быстро прогрессирующего туберкулеза. По современным оценкам только у 3–10% индивидов, инфицированных *M. tuberculosis* (МБТ) и не имеющих явных нарушений иммунной системы, рано или поздно развивается клинически манифестированный туберкулёз [11]. Если не считать редкие, хотя, по-видимому, реальные, случаи полной бесследной элиминации популяции возбудителя за счет пока не установленных факторов естественной резистентности [16], около 90% инфицированных лиц без клинической картины болезни представляют собой колоссальный резервуар латентного туберкулеза (ЛТБ). Поскольку у части таких лиц инфекция переходит в активное состояние, становится контагиозной и оказывает серьезное влияние на эпидемическую ситуацию [40], проблема выявления, лечения и предотвращения ЛТБ относится к числу важнейших для медицины.

Эволюционная стратегия паразитизма МБТ, по-видимому, сочетает медленно текущий инфекционный процесс (обеспечивает длительную жизнь каждой отдельной бактериальной популяции) с неизбежной реактивацией некоторой небольшой доли латентных популяций (обеспечивает горизонтальную передачу). На сегодняшний момент такое сочетание представляет собой неразрешимую в медицинском аспекте проблему, поскольку требует точного понимания механизмов протективного иммунитета против ЛТБ, его нарушений, а также патогенеза заболевания. Если удастся установить основные механизмы и биологические маркеры защитных реакций, тогда появится возможность прицельно влиять на биохимические пути патогенеза и отслеживать успех применения новых вакцин и лекарств по надежным биологическим показателям [32]. Следует однако признать, что, несмотря на очень серьезное изучение проблемы латентности в последние три десятилетия, мы все еще не имеем точных знаний о том, как устроено это явление и что приводит к переходу от латентной к активной форме инфекции [56].

После попадания МБТ в органы, в первую очередь в лёгкие, большая часть бактерий фагоцитируется макрофагами и нейтрофилами и оказывается под давлением факторов сначала врожденного, а затем и адаптивного иммунитета. Это приводит к угнетению роста и хотя бы частичному уничтожению микобактериальных клеток. Однако чаще всего полного уничтожения популяции МБТ (истинной элиминации инфекции) не происходит. Возбудитель переходит в так называемое покоящееся (дормантное) состояние, при котором бактерии становятся мало восприимчивыми к воздействию внешних угнетающих факторов. В терминах микробиологии дормантное состояние МБТ традиционно определяют как утрату способности расти в культуре [26]. На системном уровне инфекция переходит в так называемое латентное состояние [4, 14], сопровождающееся образованием высоко структурированных и изолированных от легочной ткани гранулем, состоящих преимущественно из клеток иммунной системы [76]. Изолированное положение и сниженный метаболизм МБТ приводят к тому, что латентную инфекцию практически невозможно выявить стандартными биохимическими и микробиологическими методами, а также элиминировать с помощью антибиотиков. В состоянии латентности никаких негативных проявлений инфекции внешне не наблюдается, и, согласно современным представлениям о туберкулёзе, именно ЛТБ – это наиболее распространенный тип течения инфекции [15].

[1] *ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва*
[2] *ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, г. Москва*
[3] *ФГБУН «Институт биохимии им. А.Н. Баха» РАН, г. Москва*

Переход микобактерий в дормантное состояние и реактивация: генетика возбудителя

Данные, касающиеся физиологического состояния МБТ, находящихся в дормантном состоянии, противоречивы [15]. Окончательно не установлено точное место локализации МБТ, пребывающих в дормантном состоянии [22]. До сих пор нет однозначного мнения о том, что из себя конкретно представляет это состояние: является ли оно действительно дормантным, не сопровождающимся клеточными делениями [53], либо же клеточное деление продолжает осуществляться [28]. Недавно было показано, что в клинических изолятах МБТ, циркулирующих в человеческой популяции более 30 лет, отсутствуют существенные изменения генома [83]. Эти данные можно признать весомым свидетельством того, что в дормантном состоянии репликация МБТ либо отсутствует, либо находится на чрезвычайно низком уровне.

Механизмы, за счет которых происходит переход МБТ в дормантное состояние, не вполне ясны. Традиционно считается, что важную роль в обеспечении этого перехода играет регулон dosR [58], в состав которого входит около 50 генов. Экспрессия генов регулона dosR индуцируется при свободном культивировании МБТ в условиях гипоксии [66, 73, 78], а также при инфицировании изолированных макрофагов [69], мышей [31] и морских свинок [71], то есть когда рост МБТ находится под давлением сдерживающих факторов. С вхождением бактерий в дормантное состояние уже давно связывают повышение экспрессии гена *hspX* (Rv2031c), относящегося к регулону dosR и кодирующего белок α-кристаллин [84, 85]. В качестве «доказательства от противного», также было показано, что активность dosR необходима для возобновления роста микобактерий при выходе из дормантного состояния. При этом разнообразные мутации в dosR не приводят к гибели МБТ в условиях гипоксии, что свидетельствует о том, что не только регулон dosR отвечает за переход в дормантность и выживание под давлением внешних факторов [39]. Кроме того, профили экспрессии генов регулона dosR различаются для штаммов с различной вирулентностью, таких как $H_{37}Rv$, $H_{37}Ra$ [42] и W-Beijing [50]. Таким образом, можно согласиться с мнением, что функции dosR в поддержании латентности до конца не понятны [13].

Среди других предполагаемых генетических факторов, участвующих в регуляции переходов МБТ из активного в дормантное состояние и обратно, можно отметить ген *relA* (Rv2583c), продукт которого, по-видимому, предотвращает вхождение в или ускоряет выход из состояния дормантности [54]. Недавно было показано, что транскрипционный регулятор семейства LuxR также участвует в поддержании дормантности МБТ [24]. Помимо выявления генетических регуляторов дормантного состояния, установлены некоторые особенности метаболизма МБТ, находящихся в организме хозяина, например, переход от полного цикла трикарбоновых кислот на глиоксалатный шунт и индукция систем, защищающих патоген от повреждающего действия клеток иммунной системы [47, 69, 82]. Предполагается, что длительное пребывание клеток МБТ в тканях хозяина приводит к снижению уровня метаболизма у возбудителя и даже к его практической полной остановке у покоящихся форм, поскольку такие клетки *in vivo* резистентны к действию антибиотиков [25]. Высказана гипотеза (пока не доказанная) о роли систем токсин-антитоксин в установлении покоящегося состояния у МБТ [6].

Данных об изменениях метаболического состояния МБТ при вхождении в дормантное состояние и в ходе реактивации инфекции, равно как и о сдвигах в экспрессии бактериальных генов, связанных с реорганизацией метаболизма, пока явно недостаточно. Проблема системного изучения дормантного состояния микобактерий и ЛТБ связана, в первую очередь, с несовершенством тест-систем *in vitro* и почти полным отсутствием модельных систем *in vivo* [3]. Тем не менее, в лаборатории А. С. Капрельянца разработана модель *in vitro* перехода МБТ в дормантное состояние за счет создания определенных стрессовых условий, позволяющая аккумулировать покоящиеся клетки *M. tuberculosis*, которые способны к реактивации в определенных условиях; эта модель, по-видимому, на настоящий момент лучше всего имитирует дормантное состояние МБТ в условиях *in vivo* [3, 52]. С целью выявления особенностей биохимических процессов, связанных с переходом бактерий в состояние «некультивируемости», и понимания механизмов данного явления был проведен анализ изменения профиля экспрессии генов МБТ в процессе образования дормантных форм методом гибридизации на ДНК-чипах [67]. Было выяснено, что при переходе в покоящееся состояние регистрируется несколько сотен генов с повышенной экспрессией, продукты которых принимают участие в основных метаболических процессах и дыхании, в регуляции транскрипции и процессах, протекающих в клеточной стенке, а также кодирующих регуляторные белки. Важно, что значительную часть таких генов составляют гены, кодирующие ферменты, участвующие в катаболических реакциях. В другой работе по системному изучению транскриптома исследовались так называемые «персистеры», то есть бактерии, устойчивые к действию антибиотиков, находящиеся в не- (или медленно) делящемся состоянии и способные к восстановлению роста при переводе в среду без антибиотиков. Было показано, что транскрипция большей части генов у таких бактерий подавлена, а повышена экспрессия лишь 15 генов, среди которых ген *acr2*, кодирующий α-кристаллин, и гены σ-факторов [33]. Однако поскольку весьма вероятно, что «персисторы» обладают определенной метаболической активностью, вопрос о том насколько они отражают истинное дормантное состояние бактерий остается открытым.

Другой стороной проблемы понимания того, как именно регулируется экспрессия генов МБТ при изменении физиологического состояния, является переход от дормантности к возобновлению роста, то есть реактивация инфекции. Участие в этом процессе белков семейства Rpf доказано вполне убедительно [12, 21, 27, 30], поэтому обнаруженное повышение экспрессии генов семейства *Rpf* при реактивации МБТ в модели инфекции у кроликов [34] было ожидаемо. Белки Rpf содержат консервативный домен, обладающий активностью близкой к лизоциму, и, скорее всего, принимают участие в гидролизе пептидогликанов клеточной стенки, что является ранним звеном в процессе выхода из дормантности (реактивации) [17].

Поскольку выход из дормантного состояния ассоциирован с изменениями в клеточной стенке МБТ, закономерен интерес к роли гликолипидов клеточной стенки в латентной инфекции. В экспериментальной модели латентного туберкулеза было установлено снижение синтеза МБТ сульфолипидов (SL) и накопление предшественников диацилтрегалезы и полиацилтрегалезы (DAT/PAT), происходившие на фоне резкого понижения транскрипции генов *mmpL8* и *mmpL10*, но увеличения транскрипции генов семейства *pks*, вовлеченных в биосинтез, соответственно, SL и DAT [63]. Кроме того, для выхода из дормантной фазы МБТ требуется энергия, в частности, в форме триацилглицеридов [41]. Было показано, что для группы высоко патогенных и широко распространенных штаммов МБТ Beijing характерен высокий уровень продукции триацилглицеридов [23]. По мнению авторов, это может давать конкурентное преимущество в условиях гипоксии.

Подводя итог этому разделу, следует отметить, что процессы, связанные с переходом в дормантное состояние у МБТ, а также реактивацией латентной инфекции, все еще требуют интенсивного и систематического изучения. Существующие представления достаточно разрознены, подробно исследуются лишь некоторые очевидные метаболические пути (например, вовлеченные в биосинтез компонентов клеточной стенки).

Переход микобактерий в дормантное состояние и реактивация: генетика хозяина

Хотя иммунный ответ при туберкулезной инфекции изучен достаточно подробно [1, 5, 64], немного известно о том, какое именно сочетание показателей противотуберкулезного иммунитета не только сдерживает рост популяции возбудителя, но и обеспечивает высокий уровень защиты от патологических процессов в легких. Еще меньше изучен вопрос о состоянии лимфоидных органов и локального иммунного ответа в легочной ткани при латентной фазе инфекции [55, 81]. Простейшая модель персистенции инфекции получается при заражении аэрогенным путем умеренно резистентных к ТБ мышей линии B6 [48] низкой дозой (100 КОЕ) МБТ. После острой начальной фазы инфекция успешно контролируется иммунной системой хозяина, и количество бактерий в органах не меняется на протяжении нескольких месяцев. Тем не менее, мыши в конце концов погибают от легочной патологии [62]. Эта модель хронического ТБ удобна своей простотой, но не универсальна, поскольку не позволяет понять, что происходит при заражении генетически более чувствительных и более резистентных индивидов.

При использовании широко известной модели реактивации ТБ, разработанной в университете Cornell [44, 45], мышей заражают внутривенно разными дозами МБТ, дают инфекции развиться в течение 2-4 недель, а затем проводят химиотерапию на протяжении 1-2 месяцев до прекращения высевания бактерий из легких и селезенки [18, 19]. После прекращения лечения, через 12-28 недель (в зависимости от схемы заражения и лечения) у части мышей снова развивается активный процесс, с появлением культивируемых МБТ в органах. Несмотря на то, что опыты ставились на генетически идентичных мышах инбредных линий, все группы исследователей зарегистрировали реактивацию ТБ лишь у части животных [68]. Подобная вариабельность значительно затрудняет моделирование и понимание механизмов латентности туберкулезного процесса.

Вместе с тем, совершенно очевидно, что расшифровка молекулярных механизмов переключений в иммунной системе, сопровождающих переход от эффективного сдерживания латентной инфекции к реактивации ТБ, помогут выработать новую стратегию контроля заболевания. В этой связи, прежде всего, необходимы надежные модели на животных для анализа молекулярных механизмов персистенции и реактивации популяции возбудителя в организме-хозяине. Тот факт, что переход к клинической форме заболевания происходит лишь у небольшого числа первично инфицированных индивидов, а также характер образования и распада легочных гранулем, безусловно, указывает на важность генетики хозяина в этом процессе [35, 70]. Этот генетический аспект латентности и реактивации ТБ также требует экспериментального изучения. За исключением наших работ [60, 61], генетический контроль латентности ТБ в экспериментальных моделях изучался мало и только в ранних работах, устаревших с точки зрения качества иммунологических исследований [38], а генетика человека в этом аспекте не исследована вообще.

В обширной литературе, посвященной проблеме хронического и латентного туберкулеза (см. обзор [65]) постоянно подчеркивается, что переход инфекции в латентную фазу, а также поддержание и нарушение латентности, в равной степени зависят от возбудителя и хозяина, т. е. их генетики и физиологии. Тем не менее, попыток связать в единой экспериментальной системе генетическое разнообразие двух взаимодействующих видов почти не делалось, в первую очередь из-за сложности и дороговизны соответствующих экспериментов. Лишь

совсем недавно появилось исследование, в котором использовались как линии мышей, несущие мутации по генам, вовлеченным в иммунный ответ, так и штаммы *M. tuberculosis* с генетическими дефектами по факторам вирулентности [43]. В этом исследовании впервые были получены прямые доказательства того, что продукты секреторной системы МБТ ESX-1 вызывают перфорацию мембраны макрофагальных фагосом, позволяя внеклеточной ДНК МБТ активировать в цитозоле макрофага факторы врожденного иммунитета, но связь этого биохимического пути с поддержанием ЛТБ не исследовалась. Изучение иммунного ответа на разных стадиях активного, латентного и реактивирующегося ТБ у мышей с генетически детерминированными различиями по тяжести течения заболевания, несомненно, даст вполне нетривиальные результаты, учитывая возможность сопоставления сдвинутых по времени фенотипических картин.

Проблема ЛТБ и изучение экспрессии генов методами геномного секвенирования РНК

Исследование экспрессии генов патогенных микроорганизмов является мощным инструментом изучения их физиологии, однако до недавнего времени полные профили транскрипции получали методами гибридизации на ДНК-чипах, имеющими существенные ограничения [72]. Наиболее современным подходом для анализа транскриптома бактериальной клетки является массированное секвенирование всей клеточной РНК (так называемый RNA-seq) с помощью секвенаторов нового поколения, таких как Illumina, SoLID и др. [46, 49, 57]. В последние два года появилось много работ с полным описанием транскриптома *M. tuberculosis*, выполненных методами RNA-seq [7-9, 51, 59, 77], важной особенностью которых стало выявление в транскриптоме *M. tuberculosis* множества малых некодирующих РНК – генетических элементов, регулирующих экспрессию генов. Общим недостатком этих работ было то, что сравнения транскриптомов *M. tuberculosis* проводились исключительно при росте в культуре. Сравнивали транскриптом либо в стационарной и логарифмической фазах роста, либо при различных стрессовых воздействиях. Для исследований транскриптома в условиях, приближенных к реальной инфекции *in vivo* (например, при инфекции культивируемых макрофагов), по-прежнему использовали гибридизацию на ДНК-чипах [36]. Наши работы по исследованию методом полного секвенирования транскриптома МБТ при росте *in vivo* стали первыми в этой области [10, 29, 74]. Был разработан метод анализа транскриптома внутриклеточных патогенов в инфицированных тканях, который является универсальным и может быть применен для исследований любого бактериального инфекционного возбудителя, в том числе, поиска факторов вирулентности, мишеней лекарственной терапии, разработки стратегии эпидемиологического мониторинга заболевания [10]. Этот метод использовали для изучения изменений, происходящих в транскриптомах МБТ (были исследованы патогенная *M. tuberculosis* и условно патогенная *M.avium*) при адаптации к инфекции в мышах с разной чувствительностью к туберкулезу. Выявлены группы генов, экспрессия которых ассоциирована с развитием болезни [74].

В последние годы изучению малых некодирующих РНК бактерий придается большое значение. Установлено, что эти малые РНК модулируют широкий спектр физиологических ответов, играя важную роль в регуляции транскрипции, трансляции и стабильности мРНК [80]. Считается, что малые РНК позволяют бактериям быстро реагировать на изменения окружающей среды, вызывая глобальные изменения в экспрессии генов. Это особенно важно для патогенных бактерий, которым необходимо регулировать экспрессию генов в ответ на быстро меняющиеся условия обитания в хозяине, например, температура, показатели pH и др. [37]. Центральная роль малых РНК в регуляции экспрессии генов вирулентности была показана для *Chlamydia trachomatis, Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Vibrio cholerae* и *Yersinia pestis* (см. обзор [75]). В роде *Mycobacterium* к настоящему времени малые РНК были выявлены у *M. tuberculosis, M. bovis, M. avium, M. smegmatis* и *M. marinum* [2, 8, 20, 29, 79]. Установлено, что гиперэкспрессия этих малых РНК приводит к понижению жизнеспособности *M. tuberculosis*, что свидетельствует об их важной физиологической роли. Учитывая, что регуляция некодирующих коротких РНК контролируется, в частности, регулоном dosR [9], можно сделать вывод о важности их изучения при переходах МБТ между дормантным и активным состояниями. В частности, мы начинаем использовать методы глубокого секвенирования и разработанные нами модели ЛТБ и реактивации инфекции для характеристики некодирующей части транскриптома *M. tuberculosis* в дормантном и реактивном состоянии. Будут выявлены короткие РНК, экспрессия которых повышена в дормантном состоянии, и проведено изучение их влияния на изменения в транскрипции других генов. Такие регуляторные РНК потенциально могут быть использованы в качестве мишеней при поиске новых лекарств для лечения и профилактики туберкулеза.

Благодарности

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (Комплексный проект №13-04-40070-К, включающий гранты №13-04-40070-Н, №13-04-40071-Н и №13-04-40072-Н).

Литература

1. Апт А.С., Кондратьева Т.К. Туберкулёз: патогенез, иммунный ответ и генетика хозяина // Мол. биол. – 2008. – Т. 42. – С. 880-890.
2. Игнатов Д.В., Мефодьева Л.Г., Майоров К.Б. и др. Новые малые РНК Mycobacterium avium // Биоорган. химия. – 2012 – Т. 38. – С. 509-512.
3. Шлеева М.О., Салина Е.Г., апрельянц А.С. Покоящиеся формы микобактерий // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – С. 3-15.
4. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection // Clin. Dev. Immunol. – 2011. – Vol. 2011. – A. 814943.
5. Apt A.S. Are mouse models of human mycobacterial diseases relevant? Genetics says: 'yes!' // Immunology. – 2011. – Vol. 134. – P. 109-115.
6. Arcus V.L., Rainey P.B., Turner S.J. The PIN-domain toxin-antitoxin array in mycobacteria // Trends Microbiol. – 2005. – Vol. 13. – P. 360-365.
7. Arnvig K., Young D. Non-coding RNA and its potential role in Mycobacterium tuberculosis pathogenesis //RNA Biol. – 2012. – Vol. 9. – P. 427-436.
8. Arnvig K.B., Young D.B. Identification of small RNAs in Mycobacterium tuberculosis // Mol. Microbiol. – 2009. – Vol. 73. – P. 397-408.
9. Arnvig K.B., Comas I., Thomson N.R. et al. Sequence-based analysis uncovers an abundance of non-coding RNA in the total transcriptome of Mycobacterium tuberculosis // PLoS Pathog. – 2011. – Vol. 7. – e1002342.
10. Azhikina T., Skvortsov T., Radaeva T. et al. A new technique for obtaining whole pathogen transcriptomes from infected host tissues // Biotechniques. – 2010. – Vol. 48. – P. 139-144.
11. Barry C.E., 3rd, Boshoff H.I., Dartois V. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 7. – P. 845-855.
12. Biketov S., Potapov V., Ganina E., et al. The role of resuscitation promoting factors in pathogenesis and reactivation of Mycobacterium tuberculosis during intra-peritoneal infection in mice // BMC Infect. Dis – 2007. – Vol. 7. – P. 146.
13. Boon C., Dick T. How Mycobacterium tuberculosis goes to sleep: the dormancy survival regulator DosR a decade later // Future Microbiol. – 2012. – Vol. 7. – P. 513-518.
14. Cardona P.J. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection // Infection. – 2009. – Vol. 37. – P. 80-86.
15. Chao M.C., Rubin E.J. Letting sleeping dos lie: does dormancy play a role in tuberculosis? // Annu. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 64. – P. 293-311.
16. Cobat A., Gallant C.J., Simkin L. et al. Two loci control tuberculin skin test reactivity in an area hyperendemic for tuberculosis // J. Exp. Med. – 2009. – Vol. 206. – P. 2583-2591.
17. Cohen-Gonsaud M., Barthe P., Bagneris C. et al. The structure of a resuscitation-promoting factor domain from Mycobacterium tuberculosis shows homology to lysozymes // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2005. – Vol. 12. – P. 270-273.
18. de Wit D., Wootton M., Dhillon J. et al. The bacterial DNA content of mouse organs in the Cornell model of dormant tuberculosis // Tuberc. Lung Dis. – 1995. – Vol. 76. – P. 555-562.
19. Dhillon J., Mitchison D.A. Effect of vaccines in a murine model of dormant tuberculosis // Tuberc. Lung Dis. – 1994. – Vol. 75. – P. 61-64.
20. DiChiara J.M., Contreras-Martinez L.M., Livny J. et al. Multiple small RNAs identified in Mycobacterium bovis BCG are also expressed in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis // Nucleic. Acids Res. – 2010. – Vol. 38. – P. 4067-4078.
21. Downing K.J., Mischenko V.V., Shleeva M.O. et al. Mutants of Mycobacterium tuberculosis lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. – P. 3038-3043.
22. Ehlers S. Lazy, dynamic or minimally recrudescent? On the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis // Infection. – 2009. – Vol. 37. – P. 87-95.
23. Fallow A., Domenech P., Reed M.B. Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of Mycobacterium tuberculosis are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants // J. Bacteriol. – 2010. – Vol. 192. – P. 2228-2238.
24. Fang H., Yu D., Hong Y. et al. The LuxR family regulator Rv0195 modulates Mycobacterium tuberculosis dormancy and virulence // Tuberculosis (Edinb). – 2013. – Vol. 93. – P. 425-431.
25. Flynn J.L., Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation // Infect. Immun. – 2001. – Vol. 69. – P. 4195-4201.
26. Gangadharam P.R. Mycobacterial dormancy // Tuberc. Lung Dis. – 1995. – Vol. 76. – P. 477-479.
27. Gengenbacher M., Kaufmann S.H. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy // FEMS Microbiol. Rev. – 2012. – Vol. 36. – P. 514-532.
28. Gill W.P., Harik N.S., Whiddon M.R. et al. A replication clock for Mycobacterium tuberculosis // Nat. Med. – 2009. – Vol. 15. – P. 211-214.
29. Ignatov D., Malakho S., Majorov K. et al. RNA-Seq analysis of Mycobacterium avium non-coding transcriptome // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – e74209.
30. Kana B.D., Mizrahi V. Resuscitation promoting factors in bacterial population dynamics during TB infection // Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. – 2010. – Vol. 7. – e13-e18.
31. Karakousis P.C., Yoshimatsu T., Lamichhane G. et al. Dormancy phenotype displayed by extracellular Mycobacterium tuberculosis within artificial granulomas in mice // J. Exp. Med. – 2004. – Vol. 200. – P. 647-657.
32. Kaufmann S.H. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box // Immunity. – 2010. – Vol. 33. – P. 567-577.
33. Keren I., Minami S., Rubin E. et al. Characterization and transcriptome analysis of Mycobacterium tuberculosis persisters // MBio. – 2011. – Vol. 2. – e00100-00111.
34. Kesavan A.K., Brooks M., Tufariello J. et al. Tuberculosis genes expressed during persistence and reactivation in the resistant rabbit model // Tuberculosis (Edinb). – 2009. – Vol. 89. – P. 17-21.
35. Kondratieva E., Logunova N., Majorov K. et al. Host genetics in granuloma formation: human-like lung pathology in mice with reciprocal genetic susceptibility to M. tuberculosis and M. avium // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – e10515.
36. Koo M.S., Subbian S., Kaplan G. Strain specific transcriptional response in Mycobacterium tuberculosis infected macrophages // Cell Commun. Signal. – 2012. – Vol. 10. – P. 2.

37. Lease R.A., Smith D., McDonough K. et al. The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in Escherichia coli // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – P. 6179-6185.
38. Lecoeur H.F., Lagrange P.H., Truffot-Pernot C. et al. Relapses after stopping chemotherapy for experimental tuberculosis in genetically resistant and susceptible strains of mice // Clin. Exp. Immunol. – 1989. – Vol. 76. – P. 458-462.
39. Leistikow R.L., Morton R.A., Bartek I.L. et al. The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy // J. Bacteriol. – 2010. – Vol. 192. – P. 1662-1670.
40. Lillebaek T., Andersen A.B., Dirksen A. et al. Persistent high incidence of tuberculosis in immigrants in a low-incidence country // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 8. – P. 679-684.
41. Low K.L., Rao P.S., Shui G. et al. Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating Mycobacterium bovis BCG // J. Bacteriol. – 2009. – Vol. 191. – P. 5037-5043.
42. Malhotra V., Tyagi J.S., Clark-Curtiss J.E. DevR-mediated adaptive response in Mycobacterium tuberculosis $H_{37}Ra$: links to asparagine metabolism // Tuberculosis (Edinb). – 2009. – Vol. 89. – P. 169-174.
43. Manzanillo P.S., Shiloh M.U., Portnoy D.A. et al. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages // Cell Host Microbe. – 2012. – Vol. 11. – P. 469-480.
44. McCune R.M., Feldmann F.M., Lambert H.P. et al. Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues // J. Exp. Med. – 1966. – Vol. 123. – P. 445-468.
45. McCune R.M., Feldmann F.M., McDermott W. Microbial persistence. II. Characteristics of the sterile state of tubercle bacilli // J. Exp. Med. – 1966. – Vol. 123. – P. 469-486.
46. McGinn S., Gut I.G. DNA sequencing - spanning the generations // N. Biotechnol. – 2013. – Vol. 30. – P. 366-372.
47. McKinney J.D., Honer zu Bentrup K., Munoz-Elias E.J. et al. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase // Nature. – 2000. – Vol. 406. – P. 735-738.
48. Medina E., North R.J. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to Mycobacterium tuberculosis and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype // Immunology. – 1998. – Vol. 93. – P. 270-274.
49. Metzker M.L. Sequencing technologies - the next generation // Nat. Rev. Genet. – 2010. – Vol. 11. – P. 31-46.
50. Minch K., Rustad T., Sherman D.R. Mycobacterium tuberculosis growth following aerobic expression of the DosR regulon // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – e35935.
51. Miotto P., Forti F., Ambrosi A. et al. Genome-wide discovery of small RNAs in Mycobacterium tuberculosis // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – e51950.
52. Mukamolova G., Salina E., Kaprelyants A. Mechanisms of latent tuberculosis: dormancy and resuscitation of Mycobacterium tuberculosis // National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Nih, Vol 1: Frontiers in Research. – 2008. – Vol. 1. – P. 83-90.
53. Munoz-Elias E.J., Timm J., Botha T. et al. Replication dynamics of Mycobacterium tuberculosis in chronically infected mice // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. – P. 546-551.
54. Murphy D.J., Brown J.R. Identification of gene targets against dormant phase Mycobacterium tuberculosis infections // BMC Infect. Dis. – 2007. – Vol. 7. – 84.
55. North R.J., Jung Y.J. Immunity to tuberculosis // Annu. Rev. Immunol. – 2004. – Vol. 22. – P. 599-623.
56. Ottenhoff T.H., Kaufmann S.H. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8. – e1002607.
57. Ozsolak F. Third-generation sequencing techniques and applications to drug discovery // Expert. Opin. Drug Discov. – 2012. – Vol. 7. – P. 231-243.
58. Park H.D., Guinn K.M., Harrell M.I. et al. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 48. – P. 833-843.
59. Pellin D., Miotto P., Ambrosi A. et al. A genome-wide identification analysis of small regulatory RNAs in Mycobacterium tuberculosis by RNA-Seq and conservation analysis // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – e32723.
60. Radaeva T.V., Nikonenko B.V., Mischenko V.V. et al. Direct comparison of low-dose and Cornell-like models of chronic and reactivation tuberculosis in genetically susceptible I/St and resistant B6 mice // Tuberculosis (Edinb). – 2005. – Vol. 85. – P. 65-72.
61. Radaeva T.V., Kondratieva E.V., Sosunov V.V. et al. A human-like TB in genetically susceptible mice followed by the true dormancy in a Cornell-like model // Tuberculosis (Edinb). – 2008. – Vol. 88. – P. 576-585.
62. Rhoades E.R., Frank A.A., Orme I.M. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent Mycobacterium tuberculosis // Tuberc. Lung Dis. – 1997. – Vol. 78. – P. 57-66.
63. Rodriguez J.E., Ramirez A.S., Salas L.P. et al. Transcription of genes involved in sulfolipid and polyacyltrehalose biosynthesis of Mycobacterium tuberculosis in experimental latent tuberculosis infection // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – e58378.
64. Russell D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? // Nat. Rev. Microbiol, – 2007. – Vol. 5. – P. 39-47.
65. Russell D.G. Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a chronic infection // Immunol. Rev. – 2011. – Vol. 240. – P. 252-268.
66. Rustad T.R., Harrell M.I., Liao R. et al. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis // PLoS One. – 2008. – Vol. 3. – e1502.
67. Salina E.G., Mollenkopf H.J., Kaufmann S.H. et al. M. tuberculosis gene expression during transition to the «non-culturable» // State. Acta Naturae. – 2009. – Vol. 1. – P. 73-77.
68. Scanga C.A., Mohan V.P., Joseph H. et al. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67. – P. 4531-4538
69. Schnappinger D., Ehrt S., Voskuil M.I. et al. Transcriptional adaptation of Mycobacterium tuberculosis within macrophages: insights into the phagosomal environment // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198. – P. 693-704.
70. Schurr E., Kramnik I. Genetic control of host susceptibility to tuberculosis. Handbook of Tuberculosis. Ed. by S. Kaufmann and W. Britten. – Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2008.

71. Sharma D., Bose A., Shakila H. et al. Expression of mycobacterial cell division protein, FtsZ, and dormancy proteins, DevR and Acr, within lung granulomas throughout guinea pig infection // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 48, – P. 329-336.
72. Shendure J. The beginning of the end for microarrays? // Nat. Methods. – 2008. – Vol. 5. – P. 585-587.
73. Sherman D.R., Voskuil M., Schnappinger D. et al. Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha-crystallin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 7534-7539.
74. Skvortsov T.A., Ignatov D.V., Majorov K.B. et al. Mycobacterium tuberculosis transcriptome profiling in mice with genetically different susceptibility to tuberculosis // Acta Naturae. – 2013. – Vol. 5. – P. 62-69.
75. Toledo-Arana A., Repoila F., Cossart P. Small noncoding RNAs controlling pathogenesis // Curr. Opin. Microbiol. – 2007. – Vol. 10. – P. 182-188.
76. Ulrichs T.,Kaufmann S.H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis // J. Pathol. – 2006. – Vol. 208. – P. 261-269.
77. Uplekar S., Rougemont J., Cole S.T. et al. High-resolution transcriptome and genome-wide dynamics of RNA polymerase and NusA in Mycobacterium tuberculosis // Nucleic Acids Res. – 2013. – Vol. 41. – P. 961-977.
78. Voskuil M.I., Schnappinger D., Visconti K.C. et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 198. – P. 705-713.
79. Wang S., Dong X., Zhu Y. et al. Revealing of Mycobacterium marinum transcriptome by RNA-seq // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – e75828.
80. Waters L.S., Storz G. Regulatory RNAs in bacteria // Cell. – 2009. – Vol. 136. – P. 615-628.
81. Wayne L.G. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1994. – Vol. 13. – P. 908-914.
82. Wayne L.G., Lin K.Y. Glyoxylate metabolism and adaptation of Mycobacterium tuberculosis to survival under anaerobic conditions // Infect. Immun. – 1982. – Vol. 37. – P. 1042-1049.
83. Yang Z., Rosenthal M., Rosenberg N.A. et al. How dormant is Mycobacterium tuberculosis during latency? A study integrating genomics and molecular epidemiology // Infect. Genet. Evol. – 2011. – Vol. 11. – P. 1164-1167.
84. Yuan Y., Crane D.D., Simpson R.M. et al. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of Mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. –Vol. 95. – P. 9578-9583.
85. Zhang Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis // Front. Biosci. – 2004. – Vol. 9. – P. 1136-1156.

Сведения об авторах

Кондратьева Татьяна Константиновна *– ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, доктор биологических наук*
Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.

Ажикина Татьяна Леодоровна *– ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, г. Москва, доктор биологических наук*
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
e-mail: office@ibch.ru

Шлеева Маргарита Олеговна *– старший научный сотрудник лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии им. А.Н. Баха» РАН, г. Москва, кандидат биологических наук*
Адрес: г. Москва, Ленинский пр., д. 33
Телефон (495) 954-40-47

Капрелянц Арсений Сумбатович *– заведующий лабораторией биохимии стрессов микроорганизмов ФГБУН «Институт биохимии им. А.Н. Баха» РАН, г. Москва, доктор биологических наук, профессор*
Адрес: г. Москва, Ленинский пр., д. 33
Телефон (495) 954-40-47
e-mail: arseny@inbi.ras.ru

Апт Александр Соломонович *– заведующий лабораторией иммуногенетики отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН, г. Москва, доктор биологических наук, профессор*
Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.
e-mail: asapt@aha.ru

УДК 575.174.015.3:616-002.5

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА БЕЛКОВ СУРФАКТАНТА В ПАТОБИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

В.В. Еремеев, Л.Е. Поспелов, А.Л. Поспелов, С.Ю. Кордичева
ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва

Легочный сурфактант был выделен и описан J.A. Clements в 1957 году [6]. Установлено, что основная функция сурфактанта заключается в снижении поверхностного натяжения в альвеолах, что препятствует их спаданию и стабилизирует структуру легочной ткани [23]. Кроме того, сурфактант формирует барьер на пути проникновения патогенов [25], улучшает мукоцилиарный транспорт [5] и ингибирует выход компонентов сыворотки в дыхательные пути [23]. Биологическая роль сурфактанта, как интегрального компонента защитной системы хозяина, обладающего, в том числе, иммуномодуляторными свойствами, исследована в целом ряде современных работ с использованием экспериментальных моделей легочной инфекции [3, 19].

Легочный сурфактант представляет собой сложную смесь липидов и белков, формирующих мономолекулярную пленку на границе контакта альвеолярного воздуха с тканью легких [3]. Сурфактант состоит из приблизительно 90% липидов, 80-85% из которых приходится на фосфолипиды, а еще 5-10% – на нейтральные липиды [16], и 10% белков-апопротеинов, получивших название протеины сурфактанта (*surfactant proteins*, SP) [29]. Несмотря на то, что белки составляют лишь незначительную часть сурфактанта, все четыре известные на сегодня SP-A, SP-B, SP-C и SP-D [3] играют важную роль в регуляции его функций.

SP-A и SP-D – довольно большие гидрофильные гликопротеины, которые наряду с другими молекулами, обладающими важными иммунологическими свойствами, относятся к семейству лектинов С-типа (коллектины). Для них характерно наличие доменов, распознающих коллаген-подобные и карбогидратные структуры (CRD, от англ. *collagen-like and carbohydrate recognition domains*). В соответствии с современными представлениями, механизм действия молекул этого семейства основан на присоединении к специфическим углеводным последовательностям бактерий, простейших, грибов и вирусов [17, 10], опсонизации и ускорении защитных иммунных реакций [35].

Белки SP-B и SP-C существенно меньше, резко гидрофобны и являются важным компонентом сурфактантного монослоя, стабилизируя поверхности контакта воздух-жидкость [7]. Крайняя гидрофобность SP-B и SP-C достигается преимущественно за счет посттрансляционных модификаций. Так, например, гидрофобность SP-C повышается за счет присоединения остатка пальмитиновой кислоты [4].

Локусы SP-A и SP-D человека кодируют три гена (*SFTPA1:* SP-A1, *SFTPA2:* SP-A2 и *SFTPD*: SP-D), расположенные в середине длинного плеча 10-й хромосомы (10q21–q23) [18]. Локус SPA человека содержит два функциональных высокогомологичных гена (*SP-A1* и *SP-A2*), находящихся в оппозитной по направлению транскрипции ориентации, и один псевдоген между ними. В одном кластере с ними расположен ген SP-D. Установлено, что все три гена – *SP-A1, SP-A2* и *SP-D* – полиморфны [26]. Локус считается полиморфным если наиболее редкий аллель встречается в популяции с частотой не менее 1%, а количество гетерозигот равно или превосходит 2%. Менее распространенные нуклеотидные замены называют аллельными вариантами, а совсем редкие – мутациями [14]. Гены *SP-A1* и *SP-A2* находятся в неравновесном сцеплении и обладают сходной геномной организацией. Белки SP-A1 и SP-A2 состоят из 248 аминокислот каждый и различаются по следующим аминокислотным остаткам: Met66, Asp73, Ile81 и Cys85 для SP-A1, Thr66, Asn73, Val81 и Arg85 для SP-A2 [12]. Для экзонов гена *SP-A1* известны пять полиморфизмов, соответствующих аминокислотным позициям 19, 50, 62, 133 и 219 кодируемого белка. Два из них молчащие (62 и 133), а остальные приводят к неконсервативным аминокислотным заменам (Ala19→Val, Leu50→Val and Arg219→Trp) [8]. Для экзонов гена *SP-A2* описаны четыре полиморфизма (Thr9→Asn, Pro91→Ala and Lys223→Gln); полиморфизм в позиции 140 – молчащий. Для экзонов гена *SP-D*

известны два полиморфизма, приводящие к заменам: Thr11→Met and Thr160→Ala [8].

Гены, картируемые на хромосомах 2p12-p11.2 и 8p21 человека, детерминируют гидрофобные белки SP-B и SP-C соответственно. Идентифицирован целый ряд относительно часто встречающихся вариаций гена *SP-B*, в том числе ряд аллелей, связанных с вариабельностью тандемных повторов в четвертом интроне [11]. Обнаружены также однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs, от англ. *single-nucleotide polymorphisms*) гена *SP-B*. Четыре из них, расположенные в 5′ фланкирующем регионе, интроне 2, экзоне 4 и 3′ нетранслируемом регионе гена, потенциально способны влиять на функцию белка [20]. Экзонный полиморфизм приводит к замене аминокислоты на позиции 131 (Thr→Ile). Этот полиморфизм может иметь функциональное значение, поскольку изменяется потенциальный сайт гликозилирования. Предположительно ген *SP-C* также имеет несколько SNPs, поскольку существует ряд известных вариаций его последовательностей [15].

Продуцируемый альвеолярными клетками легких тубулярный миелин (ТМ) представляет собой высокоорганизованную структуру сурфактанта, формирование и функциональная активность которой определяются в основном SP-A, SP-D и насыщенными фосфолипидами. В эксперименте, с применением методов электронной микроскопии, было показано, что у крыс (резистентных к туберкулёзной инфекции) по сравнению с морскими свинками (чувствительными к туберкулёзу) значительно сильнее развита сеть ТМ сурфактанта. Помимо этого, морфологическими методами было продемонстрировано неодинаковое развитие ТМ сурфактанта у мышей с разной чувствительностью к туберкулёзу. Так, у чувствительных к туберкулёзу мышей линии I/St обнаружено слабое (как у морских свинок), по сравнению с резистентными к туберкулёзу мышами линии A/Sn, у которых выявлено очень хорошее (как у крыс) развитие структур ТМ сурфактанта [1].

Механизм взаимодействия SP-A и SP-D с микобактериями исследовали в ряде лабораторий. Было показано, что оба эти белка связывают липоарабиноманнаны микобактериальной стенки [32, 31]. Кроме того, SP-A реагирует с Apa – богатым серином и пролином гликопротеином клеточной стенки *M. tuberculosis* [28]. Связывание SP-D способствует формированию фаголизосом в макрофагах, усиливая тем самым инактивацию *M. tuberculosis* [9]. Роль SP-A менее изучена, известно, однако, что SP-A усиливает поглощение и инактивацию *M. bovis* BCG макрофагами, а также усиливает поглощение (но не влияет на инактивацию) *M. avium* [34, 21]. Кроме того, было показано, что опосредованное SP-A взаимодействие *M. tuberculosis* с макрофагами ведет к супрессии продукции оксида азота (NO), что косвенно свидетельствует о супрессивном влиянии SP-A на микобактерицидную функцию макрофагов [27]. Описано также влияние SP-A на адаптивный антимикобактериальный иммунитет. Было показано, что моноклональные антитела к рецептору SP-A SP-R210 подавляют индуцированную антигеном микобактериальной стенки пролиферацию ИФНγ-супрессирующих лимфоцитов через механизм, опосредованный противовоспалительными цитокинами ИЛ-10 и TGFβ [30]. Таким образом, плейотропное действие SP-A и SP-D, в том числе, оказывает влияние на проявление врожденного и адаптивного антимикобактериального иммунного ответа *in vivo*.

Учитывая тот факт, что протеин SP-A участвует в антимикробной защите, были предприняты популяционные исследования по выявлению ассоциаций различных аллелей гена *SP-A* с заболеванием туберкулёзом. Одной из первых работ, посвященных данной проблеме, была публикация группы J. Floros [13]. В мексиканской популяции изучали маркеры SP-A, SP-B, SP-D и SP-B-связанные микросателлитные маркеры. При сравнении больных туберкулёзом (107 пациентов) и здоровых туберкулинположительных лиц из группы контактов (71 чел.), аллель SP-D DA11_C и микросателлитный аллель GATA_3 ассоциировались с повышенным риском, в то время как микросателлитный аллель AAGG_2 – с пониженным риском заболеть туберкулёзом. При сравнении больных туберкулёзом с контрольной группой (101 здоровый донор) выяснилось, что такие маркеры как 1A3, 6A4 и B1013_A ассоциировались с чувствительностью к туберкулёзу, а аллели AAGG_1, and AAGG_7 – с пониженным риском заболеть туберкулёзом [13].

В эфиопской популяции были изучены полиморфизмы (A19V (177C/T), V50L (269G/C), R219W (776G/A), 62P (307G/A), 33T (520G/A) в гене *SP-A1* и N9T (110A/C), P91A (355C/G), K223Q(751A/C) и 140S (504T/C) в гене *SP-A2*) на предмет ассоциации с туберкулёзом. В гене *SP-A1* аллели 307A ($p = 0.00008$) и 776T ($p = 0.019$), а в гене *SP-A2* аллели 751C ($p = 0.042$) и 355C ($p = 0.029$) ассоциировались с туберкулёзом. При этом в зависимости от таких показателей как тяжесть болезни, пол и возраст с туберкулёзом легких ассоциировались различные вариации *SP-A* [24].

При исследовании взаимосвязи между аллельными вариантами в коллагеновом регионе генов *SP-A1* и *SP-A2* и туберкулёзом легких, в индийской популяции была показана значительная ассоциация полиморфизмов SP-A1C1416T, SP-A2C1382G, SP-A2A1660G с этим заболеванием [22]. Следует отметить, что в этом исследовании было обследовано всего 17 больных туберкулёзом и 19 здоровых лиц. В другом исследовании (также в индийской популяции – 30 больных туберкулёзом и 30 здоровых доноров) была продемонстрирована существенная ассоциация полиморфизма G459A в седьмом экзоне *SP-D* с туберкулёзом [33]. В то же время, в индийской популяции не подтвердилась обнаруженная J. Floros [13] в мексиканской популяции ассоциация полиморфизма DA11_C в первом экзоне *SP-D* с заболеванием туберкулёзом.

Многие генетические вариации лектинов С-типа ассоциированы с различными инфекционными заболеваниями, однако механизмы, приводящие к возникновению этих ассоциаций, все еще остаются мало изученными. A. K. Azad и соавт. [2], применив относительно новую технологию определения нарушения баланса экспрессии аллельной mRNA (AEI, от англ. *allelic mRNA expression imbalance*), исследовали экспрессию ряда генов врожденного иммунного ответа, в том числе *SP-A1, SP-A2* и *SP-D* в макрофагах и ткани легких человека. В результате был идентифицирован интронный SNP rs1650232, стабильно ассоциированный с двукратным изменением аллельной экспрессии mRNA и, в результате альтернативного сплайсинга, приводящий к появлению трех дополнительных остатков в стартовом экзоне 3 *SP-A2*. Таким образом, регуляторный элемент rs1650232 находится в неравновесном сцеплении с известным SNP-маркером *SP-A2*, для которого ранее была показана ассоциация с повышенным риском респираторных заболеваний, включая туберкулёз. В перспективе, использование вариантов функциональной ДНК, а не SNP-маркеров, для изучения клинических ассоциаций, способно «продвинуться» на пути понимания механизмов генетической чувствительности к инфекциям.

Литература

1. *Ерохин В.В., Лепеха Л.Н. Сурфактант и инфекция. – 2004; М. «Алла Принт». – 131 с.*
2. *Azad A.K., Curtis A., Papp A. et al. Allelic mRNA expression imbalance in C-type lectins reveals a frequent regulatory SNP in the human surfactant protein A (SP-A) gene // Genes. Immun. – 2013. – Vol. 14. – P. 99-106.*
3. *Barreira E.R., Precioso A.R., Bousso A. Pulmonary surfactant in respiratory syncytial virus bronchiolitis: the role in pathogenesis and clinical implications // Pediatr. Pulmonol. – 2010. –*
4. *Beers M.F., Mulugeta S. Surfactant protein C biosynthesis and its emerging role in conformational lung disease // Annu. Rev. Physiol. – 2005. – Vol. 67. – P. 663–696.*
5. *Blanco O., Perez-Gil J., Biochemical and pharmacological differences between preparations of exogenous natural surfactant used to treat respiratory distress syndrome: role of the different components in an efficient pulmonary surfactant // Eur. J. Pharmacol. – 2007. – Vol. 568. – P. 1-15.*
6. *Clements J.A. Surface tension of lung extracts // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1957. – Vol. 95. – P. 170-172.*
7. *Curstedt T., Johansson J. Different effects of surfactant proteins B and C – implications for development of synthetic surfactants // Neonatology. – 2010. – Vol. 97. – P. 367-372.*
8. *DiAngelo S., Lin Z., Wang G. et al. Novel, non-radioactive, simple and multiplex PCR-cRFLP methods for genotyping human SP-A and SP-D marker alleles // Dis. Markers. – 1999. – Vol. 15. – P. 269-281.*
9. *Ferguson J.S., Martin J.L., Azad A.K. et al. Surfactant protein D increases fusion of Mycobacterium tuberculosis containing phagosomes with lysosomes in human macrophages // Infect. Immun. – 2006. – Vol. 74. – P. 7005–7009.*
10. *Ferguson J.S., Voelker D.R., McCormack F.X., Schlesinger L.S. Surfactant protein D binds to Mycobacterium tuberculosis bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages1 // J. Immunol. – 1999. – Vol. 163. – P. 312–321.*
11. *Floros J., Veletza S.V., Kotikalapudi P. et al. 1995. Dinucleotide repeats in the human surfactant protein-B gene and respiratorydistress syndrome // Biochem. J. – 1995. – Vol. 305. – P. 583–590.*
12. *Floros J., Wang G., Mikerov A. Genetic complexity of the human innate host defense molecules, surfactant protein A1 (SP-A1) and SP-A2--impact on function // Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr. – 2009. – Vol. 19. – P. 125–137.*
13. *Floros J., Lin H-M., Garcıa A. et al. Surfactant protein genetic marker Alleles identify a subgroup of tuberculosis in a Mexican population // J. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 182. – P. 1473–1478.*
14. *Gelehrter T.D., Collins F.S. Population genetics and multifactorial inheritance. In: Principles of Medical Genetics, Intern. Ed.. Baltimore: Williams and Wilkins; 1990. – P. 49-68.*
15. *Glasser S.W., Korfhagen T.R., Perme C.M. et al. Two SP-C genes encoding human pulmonary surfactant proteolipid // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 263. – P. 10326-10331.*
16. *Haagsman H.P., HogenkampA., van Eijk M., Veldhuizen E.J. Surfactant collectins and innate immunity // Neonatology. – 2008. – Vol. 93. – P. 288-294.*
17. *Hartshorn K.L., Crouch E., White M.R. et al. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria // Am. J. Physiol. – 1998. – Vol. 274. – L958–969.*
18. *Katyal S.L., Singh G., Locker J. Characterization of a second pulmonary surfactant-associated protein SP-A gene // Am. J. Cell Mol. Biol. –1992. – Vol. 6. – P. 446-452.*
19. *Ledford J.G., Pastva A.M., Wright J.R. Review: collectins link innate and adaptive immunity in allergic airway disease // Innate Immun. – 2010. – Vol. 16. – P. 183-190.*
20. *Lin Z., deMello D.E., Batanian J.R. et al. Aberrant SP-B mRNA in lung tissue of patients with congenital alveolar proteinosis (CAP) // Clin. Genet. – 2000. – Vol. 57. – P. 359-369.*
21. *Lopez J.P., Clark E., Shepherd V.L. Surfactant protein A enhances Mycobacterium avium ingestion but not killing by rat macrophages // J. Leukoc. Biol. – 2003. – Vol. 74. – P. 523–530.*
22. *Madan T., Saxena S., Murthy K. et al. Association of polymorphisms in the collagen region of human SP-A1 and SP-A2 genes with pulmonary tuberculosis in Indian population // Arch. Immunol. Ther. Exp. – 2005. – Vol. 53. – P. 399-417.*

23. Maina J.N., West J.B., Orgeig S. et al. Recent advances into understanding some aspects of the structure and function of mammalian and avian lungs // Physiol. Biochem. Zool. – 2010. – Vol. 83. – P. 792-807.
24. Malik S., Greenwood C.M.T., Eguale T. et al. Variants of the SFTPA1 and SFTPA2 genes and susceptibility to tuberculosis in Ethiopia // Hum. Genet. – 2006. – Vol. 118. – P. 752–759.
25. Mingarro I., Lukovic D., Vilar M., Perez-Gil J. Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends // Curr. Med. Chem. – 2008. – Vol. 15. – N. 4. – P. 393-403.
26. Pantelidis P., Lagan A.L., Davies J.C. et al. A single round PCR method for genotyping human surfactant protein (SP)-A1, SP-A2 and SP-D gene alleles // Tissue Antigens. –2003. – Vol. 61. – P. 317–321.
27. Pasula R., Wright J.R., Kachel D.L., Martin 2nd W.J. Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Invest. – 1999. – Vol. 103. – P. 483–490.
28. Ragas A., Roussel L., Puzo G., Riviere M. The Mycobacterium tuberculosis cellsurface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A // J. Biol. Chem. – 2007. Vol. 282. – P. 5133–5142.
29. Rooney S.A., Young S.L., Mendelson C.R. Molecular and cellular processing of lung surfactant // FASEB J. –1994. – Vol. 8. – P. 957-967.
30. Samten B., Townsend J.C., Sever-Chroneos Z. et al. An antibody against the surfactant protein A (SP-A)-binding domain of the SP-A receptor inhibits T cell-mediated immune responses to Mycobacterium tuberculosis // J. Leukoc. Biol. – 2008. – Vol. 84. – P. 115-123.
31. Sidobre S., Nigou J., Puzo G., Riviere M. Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin–carbohydrate recognition // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 2415–2422.
32. Torrelles J.B., Azad A.K., Henning L.N. et al. Role of C-type lectins in mycobacterial infections // Curr. Drug Targets. – 2008. – Vol. 9. – P. 102–112.
33. Vaid M., Kaur S., Taruna M. et al. Association of SP-D, MBL and I-NOS genetic variants with pulmonary tuberculosis // Indian J. Human Genetics. – 2006. – Vol. 12. – P. 105–110.
34. Weikert L.F., Lopez J.P., Abdolrasulnia R. et al. Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. – 2000. – Vol. 279. – P. 216-223.
35. Wright J.R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins // Nat. Rev. Immunol. –2005. – Vol. 5. – P. 58–68.

Сведения об авторах

Еремеев Владимир Витальевич *– заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.
Телефон/факс: (499) 785-90-19
e-mail: office_cniit@mail.ru

Поспелов Лев Евгеньевич **[04.03.1951-29.03.2012]** *– заведующий лабораторией клинической иммуногенетики и клеточных технологий отдела иммунологии ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва, до 2012 г., доктор биологических наук*

Поспелов Алексей Львович *– младший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.
Телефон/факс: (499) 785-90-19
e-mail: office_cniit@mail.ru

Кордичева Светлана Юрьевна *– старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики и клеточных технологий ФГБУ «Центральный НИИ туберкулёза» РАМН, г. Москва*
Адрес: Москва 107564, Яузская аллея, д. 2.
Телефон/факс: (499) 785-90-19
e-mail: office_cniit@mail.ru

Департамент здравоохранения г.Москвы
ГКУЗ Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом
Межрегиональная общественная организация “Московское общество фтизиатров”

МАТЕРИАЛЫ ГОРОДСКОЙ НАУЧНО–ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ИТОГИ РЕОРГАНИЗАЦИИ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЁЗНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ В ГОРОДЕ МОСКВЕ»

В соответствии с Распоряжением Департамента здравоохранения города Москвы от 5 сентября 2013 г. № 946-р 14 и 15 ноября 2013 г. состоялась Городская научно-практическая конференция с международным участием «Итоги реорганизации противотуберкулёзных учреждений в городе Москве».

Мы начинаем публикацию материалов конференции. В этом номере представлены поступившие в адрес Оргкомитета конференции тезисы, посвященные проблемам патогенеза, лабораторной и клинической диагностики и дифференциальной диагностики туберкулёза.

При подготовке публикации проведена только техническая редакторская правка; термины и дефиниции сохранены в авторской редакции.

Редакционная коллегия

ХИРУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ МИКОБАКТЕРИОЗОВ ЛЕГКИХ

Л.Д. Гунтупова, С.Е. Борисов, П.А. Древаль, А.А. Воробьев, Ю.Д. Исаева
ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

Сходство клинико-рентгенологических проявлений туберкулёза и микобактериозов легких (МЛ), связанная с природной устойчивостью нетуберкулёзных микобактерий (НТМБ) к противотуберкулёзным препаратам недостаточная эффективность лечения МЛ обусловливают высокую потребность в оперативных вмешательствах, но подходы к хирургии МЛ, как части комплексного решения проблемы, в России практически не разработаны.

Цель: повышение эффективности диагностики и лечения заболеваний легких, вызванных нетуберкулёзными микобактериями, за счет применения хирургических методов.

Материалы и методы

В 2004-2012 гг. В МНПЦ борьбы с туберкулёзом оперативные вмешательства выполнены у 31 больного, диагноз МЛ у которых был установлен на основании критериев Американского торакального общества и Американского общества по инфекционным болезням [Griffith D. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2007.- Vol. 175.- P. 367-416]. У 25 (80,6%) больных выделены медленнорастущие НТМБ (*M. avium-intracellulare complex – MAC, M. kansasii, M. xenopi*), у 6 (19,4%) – быстрорастущие (*M. fortuitum-chelonae complex*). Возраст 9 женщин и 22 мужчин на начало заболевания составлял от 3 до 66 лет, длительность заболевания – от 1 до 17 лет. При заболеваниях, вызванных *M. xenopi*, преобладали мужчины, *M. fortuitum* – женщины (p=0,048). *M. kansasii*-инфекцией страдали пациенты в более молодом возрасте, при МЛ, вызванном *MAC*, больные были старше (p=0,033). Рентгенологически полости деструкции в легких выявлены у 19 больных (61,3%), фокусы – у 11 (35,5%), легочная диссеминация – у одного пациента (3,2%).

Результаты

В случае МЛ, не диагностированного до хирургического вмешательства, операцию выполняли по стандартным показаниям для туберкулёза (наличие клинико-рентгенологических признаков формирования фиброзно-кавернозного туберкулёза или туберкулемы). При наличии округлого образования легкого или легочной диссеминации при неясном диагнозе хирургический метод был единственно верным тактическим мероприятием. Одной пациентке (3,2%) с диссеминацией в легких операция произведена с диагностической целью, остальным 30 больным (96,8%) – после курса противотуберкулёзной химиотерапии. Объем операции определяли распространенностью поражения, аналогично принципам, применяемым в торакальной хирургии туберкулёза. Сегментарных резекций произведено 20 (64,5%), в том числе с раздельной обработкой элементов корня сегмента – 8 (25,8%), лобэктомий – 4 (12,9%), пневмонэктомий – 5 (16,1%), комбинированных резекций – 2 (6,5 %). У одного больного атипичная резекция произведена с обеих сторон из последовательных доступов. Комбинированная резекция в одном случае дополнена корригирующей интраплевральной торакопластикой из-за значительной очаговой диссеминации в оставшихся отделах легкого. Плевропневмонэктомия и пневмонэктомия выполнены при МЛ, вызванном *M. xenopi* и *M. fortuitum*. Более ограниченные объемы поражения легких при МЛ, вызванных *MAC* и *M. kansasii*, позволили выполнять органосохраняющие операции в пределах сегмента и/или доли легкого. У 11 пациентов (35,4%) возбудитель выделен только из операционного материала, ещё у 10 (32,3 %) больных диагноз МЛ подтвержден обнаружением НТМБ в мокроте и/или в бронхиальном смыве наряду с обнаружением возбудителя в резецированной ткани легкого. У остальных 10 (32,3%) больных НТМБ выделены были только из мокроты и/или промывных вод бронхов до проведения хирургического пособия. Отмечен один (3,2%) летальный исход вследствие острого инфаркта миокарда на 7-е сутки после лобэктомии. В послеоперационном периоде у 20 больных с верифицированным ранее МЛ этиотропную терапию проводили по индивидуальному режиму. 11 пациентам после выделения из операционного материала и идентификации НТМБ проводили коррекцию лечения с учетом лекарственной чувствительности возбудителя. Реактиваций, обострений МЛ после операции не отмечено.

Выводы

Хирургические методы являются важным компонентом диагностических мероприятий при установлении МЛ. В 35,4% случаев только оперативное вмешательство позволило установить диагноз. В то же время, оперативное пособие представляет существенный, иногда неотъемлемый, этап комплексного лечения МЛ вследствие недостаточно эффективной этиотропной терапии, особенно при ограниченных деструктивных процессах.

Подходы к хирургическим вмешательствам при туберкулёзе и МЛ одинаковы, как в плане определения показаний к оперативному вмешательству, так и техники выполнения операции.

***Гунтупова Лидия Доржиевна**, тел. +7 (499) 161-23-61, e-mail: kdc@mnpcbt.ru*

ИММУНОГЕННОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ АНТИГЕНОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS У БОЛЬНЫХ АКТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЁЗОМ С ИММУНОСУПРЕССИЕЙ

З.М. Загдын [1], А.А. Луцкий [2], А.А. Жирков [2], О.А. Макаренко [2], Д. Феррара [4,5,6,7], Р. Аксельсон-Робертсон [4], И. Мегелес [5], Н.А. Скрынник [3], В.Н. Шабалин [8], Х.Н. Джумаева [8], М. Мейер [4,5,7]

Диагностика туберкулёза, особенно у иммунокомпрометированных лиц (ВИЧ-инфекция, прием иммунноориентированных средств и пр.) становится сложной. Применяемая туберкулиновая проба часто дает ложноположительные, ложноотрицательные и/или искаженные результаты в связи с БЦЖ-вакцинацией на уровне популяции и у пациентов с тяжелым иммунодефицитом. Относительно новые иммунодиагностические методы, такие как QuantiFERON GOLD in Tubes (Q-GIT), по данным российских исследователей, демонстрируют достаточно низкую эффективность из-за высокой инфицированности населения туберкулёзом и распространенности применения специфической профилактики вакциной БЦЖ. При этом влияние вакцинации и ревакцинации БЦЖ, в сочетании с последующим инфицированием туберкулёзом, на продукцию интерферона–гамма не изучалось. Кроме того, формирование специфического клеточного иммунного ответа на антигены *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) зависит от течения латентного туберкулёза, повторного инфицирования МБТ, особенно лекарственно-устойчивыми штаммами, инфицирования другими патогенами, наличия сопутствующих неинфекционных заболеваний и других причин. Следовательно, существует необходимость в создании новых, эффективных и доступных в широком масштабе иммунологических методов диагностики и специфической профилактики туберкулёза, разработка которых требует знания наиболее иммуногенных эпитопов антигенов МБТ. Ранее проведенный скрининг протеинов МБТ позволил идентифицировать иммуногенные аминокислотные последовательности, которые стали кандидатами для дальнейшего изучения в популяции пациентов с активным туберкулёзом. Исследования продукции интерферон-гамма с целью диагностики туберкулёза успешно проведены в различных европейских странах с низкой заболеваемостью туберкулёзом и отсутствием массовой вакцинации БЦЖ.

Цель исследования – изучение иммуногенности различных антигенов МБТ у российской популяции больных активным туберкулёзом.

Материалы и методы

Использована широкая панель антигенов возбудителя, для сравнительной оценки выраженности антиген стимулируемого специфического иммунного ответа на каждый используемый антиген использовался тест на продукцию интерферон-гамма в цельной крови в соответствии со стандартными операционными процедурами. В исследование вошли 52 человека, с подтвержденным другими методами, диагнозом активного туберкулёза. Результаты обработаны с использованием программных продуктов Tecan Magellan, Statistica 8.0 и Graphpad PRISM 6.0.

Результаты исследования позволили дать оценку иммуногенности ранее изученных белков (Ag85a и ESAT-6) в сравнении с недавно идентифицированными белками (Rv2957, Rv2958c и Rv0447), с одновременным изучением их отношений к туберкулину и антигенам различных вирусов (вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барра, вирус гриппа). Белок Rv2958c, в отличие от белка ESAT-6, показал большую

[1] ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Минздрава России»
[2] ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург
[3] СПб ГУЗ «Противотуберкулёзный диспансер № 12 Адмиралтейского района», г. Санкт-Петербург
[4] Центр трансплантации аллогенных стволовых клеток, Каролинский университетский госпиталь, г. Стокгольм, Швеция
[5] Департамент микробиологии, опухолевой и клеточной биологии, Каролинский университет, г. Стокгольм, Швеция
[6] Университет Перуджи, Италия
[7] Отделение терапевтической иммунологии, департамента лабораторной медицины, Каролинский университет, г. Стокгольм, Швеция
[8] ГКУЗ ЛО «Зеленохолмская туберкулёзная больница»

иммуногенность при сравнении с туберкулином, что может свидетельствовать о возможно большей специфичности иммунного ответа на этот антиген у больных туберкулёзом. Между тем, бактериовыделение было ассоциировано с достоверно низким иммунным ответом на данный белок. Также выявлены статистические различия в иммунореактивности пациентов к различным антигенам *Mycobacterium tuberculosis* в зависимости от наличия или отсутствия лекарственной устойчивости возбудителя. Представляет интерес достоверно низкая иммунореактивность пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулёзом в отношении белка pp65 CMV.

***Загдын Зинаида Моисеевна**, тел./факс +7 (812) 579-24-23, моб. тел. +7 (921) 767-69-47, e-mail: dinmet@mail.ru*

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОРТОСТАТИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЕГКИХ

***Т.И. Иванова*[1], *Т.Д. Тихонова*[2]**

У больных туберкулёзом легких (ТЛ) определяются ортостатические расстройства кровообращения – патологические изменения гемодинамики, обусловленные недостаточностью приспособительных реакций системы кровообращения на гравитационное перераспределение крови в организме. Проявляются они при смене положения тела от горизонтального к вертикальному (ортостатика) или при длительном стоянии (ортостаз) возникновением головокружения, слабости, затемнения сознания и др. Особенности гемодинамических расстройств у больных с ТЛ изучены недостаточно. В частности, мало данных об асимметрии вертикальной позы у данных больных и поддержание ее устойчивости.

Цель исследования – определить состояние респираторной, мышечно-связочной, вегетативной систем и разработать комплекс специальных физических упражнений, направленных на повышение ортостатической устойчивости у больных туберкулёзом легких.

Материалы и методы исследования

Основную группу (ОГ) составили 90 больных, группу сравнения – 30 больных. До и через один месяц (в ОГ в этот период проводили занятия ЛФК) проводили обследование: спирометрию, антропометрию, мануальную диагностику мышечного баланса, кардиоинтервалографию в процессе активной ортостатической пробы. Анализ ортопробы проводили по классификации Г.А. Гальдер (1995). Обработку данных осуществляли с помощью пакета STATGRAFIC, .

Результаты

Выявлено, что мышечные асимметрии между правой и левой половинами грудной клетки, вызванные наличием одностороннего поражения легких вызывают необходимость задействовать более сильные мышечные группы, более сильную половину тела и, наоборот, щадить, избегать, избирательно разгружать слабые мышечные спирали и группы мышц. Это проявлялось изменением и нарушением баланса тела, позных реакций, походки, по данным визуального контроля. При наличии поражения в верхних отделах легких у больных при пальпации выявлялись активные триггерные пункты в грудино-ключично-сосцевидной мышце. По наблюдениям Дж. Г. Тревелл длительно существующий спазм грудино-ключично-сосцевидной мышцы часто сопровождается нарушением координации движений и ориентации в пространстве, нарушением вертикальной позы. Это усугубляет статокинетические изменения и закрепляет его патологический характер. При локализации очагов воспаления в нижних долях легких дисфункция мышц выражалась расслаблением большой ягодичной мышцы и укорочением сгибателей бедра; расслаблением прямой мышцы живота и укорочением мышцы, выпрямляющей позвоночник, что выражалось в нарушении поддержания вертикальной позы.

Показано, что у больных с асимметричным поражением легких гемодинамическую основу патогенеза ортостатических реакций составляют преимущественно три вида нарушений: 1) снижение венозного возврата крови к сердцу (по данным индекса Робинсона, который достоверно ниже по сравнению с нормой, патологический гипосистолический вариант кардиоинтервалометрии у большинства исследованных больных), ведущее к уменьшению объема кровообращения; 2) нарушение общего и регионарного кровообращения при недостаточности компенсаторной тонической реакции резистивных сосудов, обеспечивающей стабильность гидростатического давления, вследствие мышечного

[1] ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»
[2] ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России», г. Москва

дисбаланса (падение диастолического давления у большинства больных) и недостаточном учащении ЧСС; 3) регуляторные нарушения механизмов перераспределения сниженного объема (индекс напряжения регуляторных систем 885,2 у больных по сравнению с нормой 30 усл. ед.), отражающий истощение резервных возможностей организма.

Наиболее часто (в 76% случаев) ортостатические реакции были связаны с дефицитом адреноэргических влияний на сердечно-сосудистую систему, определяющим одновременное участие несколько гемодинамических факторов в патогенезе ортостатических расстройств: исходную функциональную гипотонию системных вен, недостаточность адаптационной тонической реакции вен на ортостатику и уменьшение частоты сердечных сокращений при снижении сердечного выброса. При выполнении определенных физических упражнений, направленных на сокращения мышц нижних конечностей и брюшного пресса клинические проявления ортостатической недостаточности кровообращения у больных значительно уменьшались.

Выводы

Патогенетические механизмы ортостатических расстройств кровообращения у больных ТЛ представляют многофакторный процесс, асимметрия позы и гипокинезия вносят свой вклад посредством нарушения общего и регионарного кровообращения.

Иванова Татьяна Илларионовна, *тел. +7 (915) 140-74-88, e-mail: doctorftizi@yandex.ru*

ПОКАЗАТЕЛИ ЕСТЕСТВЕННОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ: ПОИСК НОВЫХ КРИТЕРИЕВ АКТИВНОСТИ И КОНТРОЛЯ ЛЕЧЕНИЯ

Н.В. Макарова, Н.Н. Плеханова, А.В. Сергеева
ГКУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

Показатели естественной антиоксидантной системы крови, а также выраженность свободнорадикальной продукции в организме больных саркоидозом, в лечении которых традиционно используются антиоксидантные средства, в частности α-токоферола ацетат (витамин Е), требуют более тщательного изучения.

Цель исследования: определить степень свободнорадикальной и антиоксидантной активности периферической крови больных саркоидозом на разных этапах заболевания и на фоне разных схем лечения в сравнении с пациентами с ХОБЛ, а также определить возможную диагностическую значимость данной методики в клинической практике.

Материалы и методы

Использован автоматический портативный тест-анализатор (серия FORM, «Callegari» Италия) для экспресс-диагностики. Исследования проводили до начала терапии и на фоне лечения (через 3 и 6 мес.) Обследовано 60 пациентов с впервые диагностированным саркоидозом: 13 мужчин (21,7%) и 47 женщин (78,3%) в возрасте от 19 до 74 лет (средний возраст 46,6±1,75 лет), проходивших обследование и лечение на базе МНПЦ борьбы с туберкулёзом в 2011-2013 гг. Саркоидоз ВГЛУ установлен у 17 чел. (28,3%), саркоидоз ВГЛУ и легких у 32 (53,3%), саркоидоз легких у 3 (5%), генерализованный саркоидоз у 8 чел. (13,3%). Цитогистологически диагноз подтвержден у 28 (46,7%); у 21 пациента (35%) инвазивные методы диагностики проведены, но информативного гистологического материала не получено. Отсутствие морфологической верификации у 11 чел. (18,3%) компенсировала характерная клинико-рентгенологическая картина, оценённая в динамике. Группу сравнения составили 12 пациентов с ХОБЛ вне обострения в возрасте от 25 до 82 лет (в среднем 56,8±7,5 лет).

Результаты

При первичном исследовании (до лечения) у 51 (85%) больного саркоидозом показатели радикальной активности превышали 2,5 ммоль/л, что соответствует окислительному стрессу. Средние показатели свободнорадикальной активности составили 3,06±1,26 ммоль/л, медиана 3,11 ммоль/л, мода 2,98 ммоль/л, разброс значений – от 1,21 ммоль/л до 4,56 ммоль/л и более. Показатели антиоксидантов крови при первичном исследовании были ниже нормальных значений (критерий дефицитного состояния – менее 1,07 ммоль/л эквивалента трилокса – водорастворимого аналога а-токоферола) у 20 (33,3%) из 60 пациентов, нормальные значения (более 1,53 ммоль/л эквивалента трилокса) имели 10 (16,7%)

пациентов. Разброс значений составил от 0,25 ммоль/л до 1,92 ммоль/л, мода 1,4 ммоль/л.

В отличие от пациентов с саркоидозом, уровень оксидативного стресса у пациентов с ХОБЛ существенно выше: средние показатели свободнорадикальной активности 3,58±1,09 ммоль/л, медиана 3,86 ммоль/л, мода 4,56 ммоль/л, разброс значений от 2 ммоль/л до 4,56 ммоль/л и более. В то же время, антиоксидантные показатели имеют более низкие параметры: около половины пациентов с ХОБЛ имеют дефицитные показатели антиоксидантов (ниже пограничных значений 1,13 ммоль/л), разброс значений – от 0,25 ммоль/л до 1,65 ммоль/л, мода 0,99 ммоль/л.

У пациентов с саркоидозом на этапе регрессии рентгенологических проявлений или вне обострения радикальная активность была достоверно ниже, чем у пациентов с признаками активности саркоидоза: в среднем 2,76±0,11 ммоль/л против 3,25±0,09 ммоль/л ($p = 0,001$).

Средние значения свободнорадикальных показателей были достоверно ниже у пациентов, которым проводилась терапия глюкокортикостероидами (ГКС) (2,78±0,15 ммоль/л), чем у пациентов, в схеме лечения которых глюкокортикостероидные препараты не использовали (3,16±0,09 ммоль/л; $p = 0,032$).

Выводы

Хотя уровень оксидативного стресса у пациентов с ХОБЛ существенно выше, чем при саркоидозе, около 80% пациентов с саркоидозом все же имеют признаки оксидативного стресса, а у трети пациентов снижена естественная антиокислительная защита. При активном саркоидозе показатели свободных радикалов достоверно более высокие. Глюкокортикостероидная терапия позволяет достоверно снизить уровень свободнорадикальной продукции у пациентов с саркоидозом. Однако показатели естественной антиоксидантной активности не претерпевают достоверных изменений в зависимости от активности гранулематоза и факта терапии ГКС.

Таким образом, изученные показатели могут давать дополнительную информацию для расширения схем лечения этих пациентов, контроля эффективности лечения, определения потребности в антиоксидантной терапии, её длительности и интенсивности.

***Макарова Наталья Владимировна**, тел + 7 (905) 762-00-46, e-mail: nmyke@mail.ru*

ТУБЕРКУЛЁЗ ЛЕГКИХ И ПНЕВМОНИИ – ВАЖНЕЙШИЕ АСПЕКТЫ ДИАГНОСТИКИ НА УРОВНЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОГО КОНСУЛЬТАТИВНОГО ПРИЕМА

А.Ф. Московчук, В.Ф. Болотникова, А.В. Давид, Е.В. Бурдух, Н.Н. Наливайко, И.Д. Левченко
Институт фтизиопульмонологии «Кирилл Драганюк», г. Кишинев, Республика Молдова

Туберкулёз и пневмонии остаются серьезной социально-экономической и клинико-эпидемиологической проблемой здравоохранения во многих странах мира. Возросшая их значимость в Республике Молдова обусловлена высоким уровнем заболеваемости, несмотря на успехи, достигнутые в последние годы. Кроме того, в настоящее время, в условиях действия страховой медицины, предъявляются высокие требования к качеству оказания медицинской помощи населению, в частности, к врачебному диагнозу таких социально значимых инфекционных заболеваний, как туберкулёз и пневмонии, которые отличаются большой вариабельностью клинических проявлений.

Цель – изучение особенностей диагностического процесса в условиях внедрения современных технологий и повышение роли специализированного консультативного отделения в верификации диагноза туберкулёза легких и пневмоний.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе консультативного отделения Молдавского Института фтизиопульмонологии «К. Драганюк». В основу положены данные отчета о приеме пациентов в 2012 г. Изучали медицинскую документацию больных, направленных на консультативный прием с инфильтративными процессами в легких.

Результаты и обсуждение

Консультативное отделение Института фтизиопульмонологии выполняет важную роль в национальной системе противотуберкулёзной помощи. И, хотя первичные диагностические исследования для выявления туберкулёза легких и пневмоний проводятся в лечебно-профилактических учреждениях общей сети или районной противотуберкулёзной службой, на догоспитальном этапе в специализированном консультативном отделении Института, в котором диагноз должен быть подтвержден или отвергнут, осуществляются дополнительные исследования.

Из ряда важнейших методов медицинского обследования больных, отвечающих требованиям доказательной медицины, наряду с обязательным диагностическим минимумом использовали такие высокоинформативные, как компьютерная томография легких, бронхоскопия с биопсией, УЗИ плевральной полости, современные микробиологические исследования мокроты, в том числе ускоренные, а также иммунологические и молекулярно-генетические исследования. Обследование проводили при подписании больным информированного согласия. Установлено, что на догоспитальном этапе далеко не всегда удается провести дифференцированный диагноз, обосновывающий природу выявленных инфильтративных изменений в легочной ткани. Нередко имел место пересмотр направительного диагноза. Увеличение доли остропрогрессирующего туберкулёза легких, протекающего под маской пневмонии, значительно затрудняло дифференциальную диагностику. При отсутствии убедительных данных за туберкулёз использовалась ПЦР-диагностика для выявления ДНК МБТ. В результате анализа качества диагностики установлено, что основными причинами диагностических затруднений и ошибок на этапе обследования больных в учреждениях общей лечебной сети и первичной фтизиопульмонологической службы (районные кабинеты) были: недостаточная настороженность в отношении туберкулёза; недоучет данных анамнеза; неиспользование в полном объеме обязательного диагностического минимума; неправильная интерпретация рентгенологических данных, особенно при верхнедолевой локализации воспалительного процесса; неиспользование предшествующих флюорограмм; недооценка клинических особенностей и малой эффективности неспецифического лечения; переоценка затяжного течения пневмоний, недоучет факторов риска. Кроме указанных причин, имели место определенные трудности диагностики, связанные с наличием у больных сопутствующих заболеваний, влияющих на течение инфекционного легочного процесса. Причинно-значимым оказалось и неадекватное назначение антибиотиков на догоспитальном этапе.

Заключение

Обобщенные аналитические данные показывают, что диагностика инфильтративных процессов в легких на примере туберкулёза и пневмоний и сегодня остается довольно сложной. К обязательным условиям ранней и своевременной диагностики этих заболеваний следует отнести целенаправленное комплексное обследование больных с привлечением новых технологий на разных этапах оказания медицинской помощи и конструктивное взаимодействие общей лечебной сети и специализированной противотуберкулёзной службы, повышение санитарной грамотности населения что, в конечном итоге, будет способствовать улучшению эпидемической ситуации в стране.

Московчук Анна Федоровна *– Республика Молдова, 2025, г. Кишинев, ул. К. Вырнав, д. 13, тел. 02 257-2354, e-mail: namoscovciuc@yandex.ru*

ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КОНДЕНСАТАХ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

И.М. Пеленёва [1], А.А. Шурыгин [1], А.И. Мизёв [2], А.И. Трофименко [2], Е.А. Макарова [1], Ю.А. Алексеева [1]

Интерес к методам неинвазивной оценки состояния легочных мембран с годами не ослабевает. Важной характеристикой повреждения являются показатели интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ), определяемые в конденсатах выдыхаемого воздуха.

Цель работы – изучение уровня конечного продукта каскада ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) в конденсатах выдыхаемого воздуха (КВВ) в сравнении с сывороткой крови у практически здоровых людей.

Материалы и методы

Объектом исследования явились 13 практически здоровых лиц, в возрасте от 21 до 27 лет (в среднем 24,5 года), 5 мужчин (38%), 8 женщин (62%). Курящих среди обследованных не было, на момент исследования острых или обострения хронических заболеваний не наблюдалось. У всех забирали сыворотку крови из локтевой вены и КВВ по методу Сидоренко. В обеих средах определяли уровень МДА фотоколориметрическим методом.

[1] ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика. Е.А. Вагнера Минздрава России»
[2] ФГБУН Институт механики сплошных сред Уральского отделения РАН, г. Пермь

Результаты исследования

В сыворотке крови практически здоровых людей содержание МДА находилось на уровне 10,1±0,7 нмоль/мл. В КВВ при отсутствии клинически значимых заболеваний МДА в большинстве случаев не определялся. Но у двух обследованных (15%) его уровень находился выше 0. Интересно, что у этих же лиц наблюдали самый высокий уровень МДА в сыворотке крови: в одном случае МДА в сыворотке – 13,6 нмоль/мл, в КВВ – 0,14 нмоль/мл, в другом – 12,6 нмоль/мл в сыворотке, 0,87 нмоль/мл в КВВ. При меньших значениях МДА в крови, он перестает определяться в КВВ. Эти результаты послужили поводом для более углубленного исследования системы дыхания (рентгенотомография); поскольку патологии найдено не было, полученные показатели расценены как фактор перенапряжения адаптивных механизмов системы дыхания.

Заключение

Сравнительное изучение содержания МДА в сыворотке крови и КВВ показало, что у практически здоровых людей в отсутствии заболеваний бронхолегочной системы МДА в КВВ отсутствует, при интенсификации ПОЛ – уровень МДА в крови находится на верхней границе нормы, а в КВВ – определяется отчетливо. Полученные данные можно использовать для ранней прицельной функциональной диагностики патологии легочных мембран (легочногосурфактанта, эпителиоцитов и т.д.).

Шурыгин Александр Анатольевич, *тел. 8 (902) 835-92-16, e-mail: alex_shurygin@mail.ru*

ЗНАЧЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ К ИНТЕРФЕРОНУ ГАММА У ПАЦИЕНТОВ С РАСПРОСТРАНЁННЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ

Н.С. Правада, А.М. Будрицкий А.М.
УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Одним из значимых цитокинов, участвующих в регуляции иммунного ответа при туберкулёзе (ТБ) является интерферон гамма (ИНФ-γ). Нарушение продукции ИНФ-γ при ТБ может быть связано с действием микобактериальных антигенов, с нарушением в системе рецепторов к ИНФ-γ, со снижением клеточного ответа на действие ИНФ-γ.

Цель – изучить уровень и клиническое значение рецепторов к ИНФ-γ у пациентов с распространёнными формами ТБ лёгких.

Материалы и методы

Проведен анализ количества рецепторов к ИНФ-γ на моноцитах методом проточной цитометрии на аппарате Beckman Coulter FC 500. В качестве реактивов использовали тест-систему фирмы «Инвитроген» CD45CD14CD119. Забор крови осуществляли из периферической вены в стеклянную пробирку с добавлением 20 ед. гепарина на 1,0 мл цельной крови натощак. Исследована кровь 51 пациента с инфильтративным и диссеминированным ТБ легких до начала лечения, с поражением более двух сегментов (основная группа – ОГ). В качестве контроля (КГ) обследованы 18 условно здоровых доноров. Анализ результатов проведен при помощи программы Статистика 6.1. При нормальном распределении оценивали среднее значение, стандартное отклонение показателей и, для проверки нулевой гипотезы, t критерий Стьюдента. При распределении, отличном от нормального, вычисляли медиану, квартили 25% и 75% (данные представлены в соответствующем виде), а также критерий Манна–Уитни.

Результаты исследования. Пациенты ОГ и КГ статистически значимо не отличались по полу и возрасту ($p > 0,05$). ОГ состояла из 44 мужчин и 7 женщин в возрасте от 18 до 62 лет (в среднем 43,6±11 лет). Бактериовыделение выявлено у 49 чел., монорезистентность (к S) установлена у 10 (19,6%) пациентов, полирезистентность – у 6 (11,8%), множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – у 14 (27,5%), широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) – у 2 (3,9%). Из показателей общего анализа крови у пациентов ОГ было достоверно больше (в 1,2 раза, р =0,022) число лейкоцитов ($8,1\times10^9$/л, квартили 25% и 75% – 5,9 и 9,6) по сравнению с КГ (6,45, 5,0 и 8,0 соответственно). У пациентов ОГ отмечен также сдвиг лейкоцитарной формулы влево: относительное количество палочкоядерных лейкоцитов составило 5% (3; 8), в КГ – 2% (1, 4), p= 0,022. Абсолютное количество палочкоядерных лейкоцитов ($\times 10^9$/л) в ОГ – 0,38 (0,22; 0,82), в КГ- 0,13 (0,06, 0,24), p=0,0002. У больных ОГ отмечено относительное увеличение сегментоядерных лейкоцитов и относительное снижение лимфоцитов. У пациентов ОГ СОЭ

в 3 раза выше по сравнению с КГ: 21 мм/ч (6; 46) и 7 мм/ч (5, 10) ($p = 0,007$). Общее количество рецепторов на моноцитах в 1 мкл крови CD14CD119 в ОГ составило 4,29 (0,91; 21,31), в КГ 1,31 (0,24; 1,99) ($p = 0,025$). Количество CD14+CD119+ в ОГ 4,29 (0,86; 17,3), в КГ 0,87 (0,24; 1,90), ($p = 0,015$). Количество CD14+CD119++, CD14++CD119+ и CD14++CD119++ в ОГ и в КГ равно 0. Выявлено достоверно значимое увеличение количества CD14CD119 на моноцитах у пациентов ОГ (в 3,3 раза больше) по сравнению с КГ за счёт CD14+CD119+. У пациентов с диссеминированным ТБ лёгких количество CD14++CD119+ в 1 мкл крови составляет 0 (0; 13,02) в отличие от пациентов с инфильтративным ТБ, у которых количество данных рецепторов статистически значимо меньше – 0 (0; 0) ($p = 0,045$). У пациентов с МЛУ МБТ статистически значимо больше рецепторов CD14+CD119++ в 1 мкл крови (0; 0, 1,07) по сравнению с пациентами без МЛУ (0; 0, 0), $p = 0,015$ и отличается от КГ(0; 0, 0), ($p = 0,037$).

Выводы

1. У пациентов с распространёнными формами ТБ лёгких количество рецепторов к ИНФ-γ на моноцитах в 3,3 раза больше, чем у здоровых доноров.

2. С увеличением объема поражения лёгких при туберкулёзе увеличивается количество CD14++CD119+ в 1 мкл.

3. У пациентов с МЛУ МБТ статистически значимо больше рецепторов CD14+CD119++в 1 мкл крови (0; 0,1,07) по сравнению с пациентами без МЛУ (0; 0, 0), $p = 0,015$ и отличается от КГ ($p = 0,037$).

***Правада Наталия Сергеевна**, тел. +3 753 3 645-59-58, e-mail: provada@mail.by*

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ МБТ ПО ДАННЫМ ПЦР (REALTIME) ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЁГКИХ

В.В. Савельев[1], О.В. Великая[2]

Лабораторное подтверждение туберкулёзной этиологии заболевания является одной из главных составляющих в верификации диагноза туберкулёза. В условиях, когда существенно увеличилось количество случаев заболевания, вызванных *M.tuberculosis* (МБТ), устойчивыми к основным препаратам, в том числе к сочетанию изониазида и рифампицина – множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), решение этой проблемы становится первоочередной задачей. Современные молекулярно-генетические технологии являются наиболее быстрыми, высокочувствительными и специфичными. Молекулярно-генетические методы определения ЛУ устойчивости основаны на выявлении мутаций в геноме МБТ. Использование данных методов в исследовании операционного материала позволяет в течение 2-3 дней определять ЛУ к определённым препаратам и корректировать режим химиотерапии. Особенно это актуально у больных туберкулёзом без бактериовыделения.

Цель исследования – изучить интраоперационные результаты чувствительность МБТ по данным ПЦР к основным противотуберкулёзным препаратам у больных туберкулёзом лёгких без бактериовыделения или при наличии микроросто культуры.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 52 пациента (37 мужчин и 15 женщин работоспособного возраста), которые с 2012 по 2013 гг. проходили курс химиотерапии по стандартным режимам, назначенным эмпирически без определения спектра ЛУ МБТ, в условиях лёгочно-терапевтического и лёгочно-хирургического отделений Воронежского областного ПТД. Все пациенты на определённом этапе лечения были прооперированы. В подавляющем большинстве выполнены сегментарные резекции, лобэктомия произведена у одного пациента. Послеоперационных осложнений не отмечено. Интраоперационно больным проводили молекулярно-генетическое исследование на ДНК МБТ в операционном материале методом ПЦР (realtime).

Результаты

Все наблюдаемые пациенты имели ограниченные формы туберкулёза лёгких. Лечение им назначали впервые, до поступления в стационар химиотерапия никогда не проводилась, контакта с больными туберкулёзом с МЛУ МБТ не зафиксировано. Поэтому мы предположили, что в исследуемой группе пациентов инфицирование МБТ с МЛУ было невозможно.

[1] КУЗ «Воронежский областной клинический противотуберкулёзный диспансер им. Н.С. Похвисневой»
[2] ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Минздрава России»

75% больных получали до операции тот или иной курс лечения противотуберкулёзными препаратами без использования лекарственных средств резервного ряда, из них больше половины (84%) находились в лёгочно-терапевтическом отделении более 60 койко-дней.

До операции у 15% больных наблюдался микроорост культур МБТ. 46 пациентов прошли тестирование системой GeneXpert и только у 4% из них была выявлена ДНК МБТ, у остальных больных результат был отрицательным. Все полученные положительные результаты по GeneXpert показали чувствительность МБТ к рифампицину. 6 больным молекулярно-генетическое исследование мокроты не проводилось по техническим причинам.

Чувствительность метода составила 92,3%. МЛУ МБТ после операции зафиксирована в 36,5% случаев, монорезистентность к изониазиду – в 9,6%. Таким образом, коррекция лечения в послеоперационном периоде потребовалась у 46,1% пациентов, а более чем у трети больных – кардинальная смена режима химиотерапии (назначение IV рехима) с удлинением сроков пребывания в стационаре и соответственным повышением стоимости лечения.

Выводы

1. Анализ интраоперационного материала у больных туберкулёзом лёгких по данным ПЦР (realtime) выявил МЛУ МБТ в 36,5% случаев, монорезистентность к изониазиду – в 9,6%. В 46% случаев в послеоперационном периоде потребовалась коррекция лечения.

2. Проведенный анализ показал более высокую специфичность и чувствительность метода ПЦР realtime для обнаружения ДНК МБТ в операционном материале по сравнению с выявлением данных биоматериалов в мокроте больного любыми известными способами. Чувствительность метода составила 92,3%.

Великая Ольга Викторовна, *тел. 8 (908) 131-73-44, e-mail: alexvel@rambler.ru*

ДИАГНОСТИКА ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИИ У СТУДЕНТОВ

П.В. Сенчихин, Э.В. Бирон, И.В. Богадельникова
ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России»

Впервые инфицированный человек может заболеть туберкулёзом, однако большинство впервые инфицированных возбудителем туберкулёза людей остается здоровыми и переносят латентную туберкулёзную инфекцию (ЛТИ), которая характеризуется неконтагиозным и бессимптомным течением. Однако при ослаблении противотуберкулёзного иммунитета угроза развития туберкулёза сохраняется в течение 2 лет с момента первичного инфицирования. До недавнего времени кожный тест с туберкулином (КТТ) был единственным методом диагностики ЛТИ. Важно отметить, что положительные результаты КТТ также наблюдаются после вакцинации BCG, инфицировании другой микобактериальной инфекцией (отличной от комплекса *M. tuberculosis*) и, возможно, из-за других, пока неустановленных, факторов. У некоторых впервые инфицированных людей с различными нарушениями иммунной системы, как и у неинфицированных здоровых людей, ответ на КТТ отсутствует. Набор QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (IT) предназначен для диагностики туберкулёзной инфекции *in vitro*. Метод основан на количественном определении интерферона ИНФ-γ методом иммуноферментного анализа при стимуляции смесью белков ESAT-6, CFP-10 и TB7.7, специфических для *M. tuberculosis*. Ранее проведенные исследования показали, что ESAT-6, CFP-10 и TB7.7 стимулируют ИНФ-γ Т-клеточный ответ у людей, инфицированных *M. tuberculosis*, но не вызывают такой ответа у неинфицированных людей или людей, прошедших BCG-вакцинацию. QuantiFERON®-TB Gold IT является непрямым методом выявления инфекции *M. tuberculosis* и используется в сочетании с оценкой риска наличия инфекции, рентгенографией и другими клиническими и лабораторными исследованиями.

На кафедре фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова в течение последних 10 лет (с 2003 г.) клинически здоровым студентам предлагали пройти добровольное обследование на туберкулёз. Студентам проводили обзорную цифровую рентгенограмму органов грудной клетки и, при отсутствии противопоказаний, пробу Манту с 2 ТЕ. Обследовано 500 студентов лечебного факультета. При постановке пробы Манту с 2 ТЕ у 64 ±3 % обследованных получена положительная ответная реакция, у 22 ±2 % – сомнительная, у 14 ±2 % – отрицательная. Гиперергические реакции отмечены

у 30 чел., у шести в легких выявлены изменения, подозрительные на туберкулёз. В ходе дообследования (сбор анамнестических данных, клинико-лабораторное и микробиологическое исследование), данных за активный туберкулёз легких не получено.

В 2011 г. в НИИ фтизиопульмонологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова проведен анализ чувствительности и специфичности набора реагентов для лабораторной диагностики туберкулёза in vitro «Квантиферон – ТВ Gold» (QuantiFERON®-TB Gold ELISA) производства «Селлестис Лимитед», Австралия/«Селлестис ГмбХ», Германия. В контрольную группу на добровольной основе включены 30 студентов. В ходе исследования проведено клинико-лабораторное, рентгенологическое (МСКТ органов грудной клетки), бактериоскопическое (микроскопия мокроты при окраске люминесцентными красителями) и бактериологическое (посев мокроты на жидкие питательные среды) обследование. У 29 чел., входящих в контрольную группу, тест оказался отрицательным, у одной студентки – положительным. У нее также отмечен положительный результат пробы Манту с 2 ТЕ, в анамнезе факторы риска в отношении туберкулёза отсутствовали, при МСКТ органов грудной клетки выявлены плотные очаговые тени в S_{1-2} левого легкого. При трехкратном исследовании мокроты методами люминесцентной микроскопии и посева МБТ не выявлены.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости продолжения данного исследования для уточнения преимуществ и целесообразности применения QuantiFERON®-TB Gold IT у молодых взрослых в условиях медицинского вуза.

Сенчихин Павел Владимирович, *тел. 8 (495) 755-28-26, e-mail: pavel.senchikhin@mma.ru*

КЛИНИКО–ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ УРОВНЕЙ ТУБЕРКУЛИНСВЯЗЫВАЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЁЗОМ ЛЕГКИХ

В.А. Серегина, А.М. Будрицкий
УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Своевременная и достоверная диагностика туберкулёза (ТБ) легких актуальна и в настоящее время. Перспективным направлением в диагностике туберкулёза легких может быть определение маркеров туберкулёза в крови.

Цель исследования

Определить уровень туберкулин связывающих (ТС) лимфоцитов и моноцитов в крови у инфицированных микобактериями туберкулёза (МБТ) здоровых лиц (контрольная группа – КГ) и пациентов с туберкулёзом легких (основная группа – ОГ).

Материалы и методы

Уровень ТС лимфоцитов и моноцитов в крови определяли у 18 инфицированных МБТ здоровых пациентов и у 52 пациентов ТБ легких с бактериовыделением. Исследовали свежую гепаринизированную кровь пациентов. Количество ТС лимфоцитов и моноцитов определяли с помощью туберкулина, коньюгированного с FITC при помощи реагентов лота НИМФИТЦ.5х2 ОДО «НИКП РЕСАН» (Беларусь), методом проточной цитометрии на аппарате Beckman Coulter FC500, используя неоново-аргоновый лазер с длинной волны эмиссии 488 нм. Результаты оценивали с помощью программы Статистика 6.1. Использовали непараметрический анализ, данные представлены в виде формулы: Медиана (25% квартиль; 75% квартиль).

Результаты

Уровень ТС лимфоцитов у пациентов КГ составил 134,6 (52,8; 412,2)$\times10^5$/л, а у пациентов ОГ – 176,6 (63,7; 834,1)$\times10^5$/л, что в 1,3 раза больше КГ (p = 0,026). Выявлено значительное различие абсолютного количества ТС лимфоцитов в зависимости от клинической формы ТБ: у пациентов с инфильтративным ТБ уровень ТС лимфоцитов составил 347,2 (100; 1093)$\times10^5$/л, у пациентов с диссеминированным ТБ – 68,04 (16,2; 147,8)$\times10^5$/л. Уровень ТС моноцитов пациентов контрольной группы составил 68,4 (12,4; 833,3)$\times10^5$/л, основной – 428,5 (56,4; 1480,8)$\times10^5$/л, что в 6,3 раза больше контрольной и статистически значимо различается (p = 0,000001). При инфильтративном ТБ уровень ТС моноцитов составил 438,6 (56,6;1492)$\times10^5$/л, у пациентов с диссеминированным ТБ – 252,7 (36;3719,5)$\times10^5$/л.

При оценке флуоресценции моноцитов крови в ОГ и КГ выявлено, что уровень моноцитов с большей способностью связывать туберкулин CD45+CD14+TUB++

у пациентов КГ составил 1071,8 (347,1; 2734,6)×10^3/л, а у ОГ – 2625,0 (460,5; 7058,7)×10^3/л. Уровень моноцитов с меньшей способностью связывать туберкулин CD45+CD14+TUB+ у пациентов КГ составил 364,2 (124,0; 5083,0)×10^3/л, а у ОГ – 2451,24 (625,2; 9624,4)×10^3/л. У пациентов ОГ количество моноцитов с меньшей способностью связывать туберкулин CD45+CD14+TUB+ было 1,8 раза больше, чем в КГ, а моноцитов с большей способностью связывать туберкулин CD45+CD14+TUB++ – в 2,4 раза.

Выводы

1. Уровень ТС лимфоцитов и моноцитов в крови у пациентов с ТБ легких статистически значимо выше, чем у здоровых лиц, инфицированных МБТ.

2. Определение уровня ТС лимфоцитов и моноцитов в крови можно использовать в диагностике и дифференциальной диагностике ТБ легких.

3. Уровни ТС лимфоцитов и моноцитов при различных клинических формах ТБ легких статистически значимо различаются.

Будрицкий Александр Михайлович, *тел. +3 7529-214-56-57, e-mail: Alexsandrbudr@rambler.ru*
Серегина Валентина Александровна*, тел. +3 7529-716-98-22, e-mail: valentina-seregina@mail.ru*

ТРАХЕОБРОНХИАЛЬНАЯ ДИСКИНЕЗИЯ У БОЛЬНЫХ С ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНЬЮ ХОБЛ

В. Скалецкая, Ю. Симионикэ, А. Московчук
Институт фтизиопульмонологии «Кирилл Драганюк», г. Кишинев, Республика Молдова

В литературе периодически обсуждается явление трахеобронхиальной дискинезии (под названиями: экспираторный стеноз, инвагинация, гипотоническая дискинезия, трахеобронхиальный коллапс), в основе которого лежит спадание (коллапс) трахеи и крупных бронхов (за счет растянутой и истонченной мембранозной стенки) при повышении внутригрудного давления во время выдоха, что ведет к прогрессирующей одышке, приступам удушья, сухому кашлю.

Основным диагностическим исследованием, позволяющим выявить дискинезию трахеи и бронхов, является бронхоскопия. Считается, что функциональные методы являются неинформативными, но иъх истинное место в диагностике данного состояния нуждается в уточнении.

Цель. Изучение механизмов развития нарушений бронхиальной проходимости у больных с тяжелой степенью ХОБЛ с использованием общей плетизмографии и фибробронхоскопии.

Материалы и методы

Обследованы 11 больных с тяжелой ХОБЛ, поступивших на стационарное лечение в Институт фтизиопульмонологии «Кирилл Драганюк». Спирометрические и плетизмографические показатели (статические объемы, бронхиальное сопротивление (Rtot) определяли с помощью плетизмографа «Master Screen Body» («Jaeger», Германия, 2011). Фибробронхоскопию выполняли аппаратом «Olimpus» (Япония, 2011) под местной анестезией 2-10% раствором лидокаина.

Результаты

У всех 11 больных с тяжелой ХОБЛ выявлена обструкция, как на уровне крупных, так и мелких бронхов, с резким снижением всех динамических показателей и высокой степенью гиперинфляции легких: FVC = 49,18±1,16%; VEMS1 = 29,34±1,46%; IT = 44,23±1,16%; PEF = 28,65±1,15%; V25-75=26,21±1,48%;V25=21,55±2,18%;V50=19,22±2,34%; V75 = 20,33±1,97%; ERV = 35,44±1,31%; IC = 82,16±4,78%; VR = 308,56±28,45%; FRCpleth = 143,18±6,22%. Бронхиальное сопротивление (Rtot=450,2%) также было резко увеличено. Отмечено резко выраженное снижение диффузии через альвеоло-капиллярную мембрану (DLCOc = 48,24±6,4%). Представленная функциональная картина характерна для ХОБЛ тяжелой степени. Наличие таких функциональных признаков, как гиперинфляция легких, нарушение эластических свойств легочной ткани и нарушении диффузии через альвеоло-капиллярную мембрану подчеркивают развитие эмфиземы легких у этих больных. Фармакологическая проба с бронходилататором у всех 11 пациентов была отрицательной, ее необратимость доказывала отсутствие бронхоспазма в генезе развития нарушений бронхиальной проходимости.

Являясь основным методом диагностики, бронхоскопия позволила выявить степень трахеобронхиальной дискинезии: у 3 пациентов выявлена трахеобронхиальная дискинезия I степени (с умеренным пролабированием на выдохе мембранозной стенки трахеи и главных бронхов при сохранении нормальной их конфигурации или уплощении просветов за счет расширения мембранозной

части), у 8 пациентов – II-Ш степени (с экспираторным смыканием задней мембранозной и переднебоковой трахеобронхиальных стенок с некоторой деформацией и провисанием хрящевых колец, что свидетельствовало о нарушении упругоэластических свойств хрящевого каркаса). Изолированное поражение бронхов было у 3 пациентов.

Результаты проведенных исследований показали, что у всех 11 пациентов с тяжелой степенью ХОБЛ нарушения бронхиальной проходимости обусловлены отечно-воспалительным изменением бронхиального дерева, скоплением в просвете бронхов патологического содержимого, трахеобронхиальной дискинезией, проявляющейся как в виде коллапса мелких бронхов, так и коллапса трахеи и крупных бронхов

Функционально коллапс бронхов диагностировали по наличию «ловушечного газа» (разница между ООЛ до и после приема бронхолитика – сальбутамола). Обязательным условием теста была необходимость максимального вдоха, предшествующего форсированному выдоху. Во время форсированного выдоха, вследствие пролабирования мембранозоной части, просвет трахеи и бронхов суживался в различной степени, вплоть до полного закрытия. У всех пациентов бронхи спадались раньше, чем был достигнут уровень максимального выдоха, то есть на уровне крупных бронхов. При этом особенно заметным было увеличение аэродинамического сопротивления на выдохе при форсировании дыхания. Аэродинамическое сопротивление выдоху у наших пациентов составляло 450,2%, что в 5-10 раз превосходило сопротивление вдоху.

Выводы

1. Ведущим симптомом нарушений бронхиальной проходимости у больных с тяжелой степенью ХОБЛ является коллапс бронхов и трахеи.

2. Лечение больных с тяжелой степенью ХОБЛ с сопутствующей трахеобронхиальной дискинезией целесообразно проводить с применением различных методов санации бронхиального дерева и средств, направленных на укрепление бронхиальной стенки.

Московчук Анна Федоровна *– Республика Молдова, 2025, г. Кишинев, ул. К. Вырнав, д. 13, тел. 02 257-2354, e-mail: namoscovciuc@yandex.ru*

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЁЗНОГО И ПАРАПНЕВМОНИЧЕСКОГО ЭКССУДАТИВНОГО ПЛЕВРИТА

Н.А. Стогова[1], А.И. Печерских[2], Т.И. Масленникова[2], И.Н. Тимошенко[2], Е.Г. Суворова[2]

Дифференциальная диагностика туберкулёзного и парапневмонического экссудативных плевритов (ТБП и ППП соответственно) в учреждениях общей лечебной сети представляет значительные трудности, что приводит к диагностическим ошибкам, в том числе к гипердиагностике пневмонии, в связи с чем каждый второй больной ТБП первоначально лечится с диагнозом «пневмония» или «пневмония, осложнённая плевритом». Основным диагностическим признаком ППП является наличие внутрилёгочного воспалительного процесса, однако при наибольшей частоте локализации пневмонии в средних и нижних отделах лёгких, она оказывается на рентгенограмме скрытой за тенью плеврального экссудата. Вместе с тем, до поступления в ПТД диагностические плевральные пункции с аспирацией экссудата проводят менее чем у 20% больных с плевральными выпотами.

Цель – повышение эффективности диагностического процесса при плевритах различной этиологии.

Материал и методы

Проведён анализ основных клинических признаков пневмонии, осложнённой экссудативным плевритом, и методов её диагностики в условиях специализированного отделения плевральной патологии (ОПП) Воронежского ОКПТД. Изучены данные 80 больных внебольничной пневмонией, осложнённой ППП, в возрасте 19-82 лет, находившихся на обследовании и лечении в ОПП в 2011-2013 гг. Сравнение проведено с данными историй болезни 80 больных ТБП, поступивших в ОПП за тот же период времени.

Результаты

По нашим данным, в этиологической структуре плевральных выпотов доли ТБП и ППП не имеют существенной разницы и составляют 31,4% и 33,6% случаев соответственно. В связи с этим дифференциальная диагностика должна быть основана на тщательной оценке данных анамнеза и результатов клинико-рентгенологического, лабораторного и инструментального

[1] ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Минздрава России»,

[2] КУЗ «Воронежский областной клинический противотуберкулёзный диспансер им. Н.С. Похвисневой»

обследования, имеющих существенные отличия при этих видах плеврита. У 10,0% больных ТБП в анамнезе отмечен семейный контакт с больными туберкулёзом, при ТБП заметно преобладали лиц мужского пола – 77,5%, тогда как при ППП мужчин было 61,3%, а также лица более молодого возраста, чем при ППП. Так, при ТБП в возрасте до 30 лет было 27,5% больных, 31-60 лет – 57,5% и старше 60 лет – 15,0%, а при ППП – 5,0%, 68,8% и 26,3% соответственно.

Из клинических проявлений заболеваний диагностическое значение имеет наличие продромального периода, характерного для ТБП. Нами он отмечен у 22,5% больных ТБП с длительностью от 3 до 12 недель. Пневмония, осложнённая экссудативным плевритом, у всех больных начиналась остро и, в большинстве случаев, после переохлаждения. В лёгких при ТБП катаральные явления отсутствовали, у 13,8% больных выслушивали шум трения плевры. При ППП мелко – и среднепузырчатые хрипы определяли у 47,5%, шум трения плевры – у 2,5% больных. Диагностическое значение имеет лейкоцитоз периферической крови, который больше характерен для ППП (отмечен у 57,5%, при ТБП – у 21,3%, $p < 0,05$). При этом частота повышения СОЭ не имела существенных различий (у 82,5% больных ТЭП и 76,3%) при ППП). Гнойный характер плеврального экссудата чаще наблюдали при ППП (10,0%), чем при ТБП (2,5%).

Рентгенографию проводили после полной аспирации экссудата, при необходимости использовали КТ. При ТБП очагово-инфильтративные изменения в лёгких выявляли значительно реже (42,5%), чем при ППП (когда они были обнаружены у всех больных, $p < 0,05$). При ТБП двусторонняя локализация очагово-инфильтративных изменений в лёгких (20,6%), изменения в верхних долях легких (73,5%) и деструкция лёгочной ткани (32,4%) наблюдались чаще, чем при ППП (15,0%, 7,5% и 2,5% соответственно, $p < 0,05$).

При ТБП специфические иммунологические реакции были более выражены, чем при ППП: положительные результаты пробы Манту с 2 ТЕ PPD-Л отмечены у 78,8%, кожной пробы с препаратом «ДИАСКИНТЕСТ®» – у 61,3% (у больных с ППЭП – у 57,5% и 17,5% соответственно).

При пункционной биопсии плевры эпителиоидно-гигантоклеточные гранулёмы обнаружены у 46,3% больных ТБП. При ППП чаще, чем при ТБП, в биоптате плевры обнаруживали наложения фибрина с лейкоцитарной инфильтрацией (45,0% и 2,5% больных соответственно, $p < 0,05$). Микобактерии туберкулёза (МБТ) методом посева в мокроте обнаружены у 25,0%, в плевральном экссудате – у 7,5% больных ТБП. Ещё у 13,8% больных ТБП в экссудате выявлена ДНК МБТ методом ПЦР. При бронхоскопии у одного больного (1,3%) ТЭП выявлен инфильтративный туберкулёз бронха.

Выводы

Ранняя (без предварительного лечения в учреждениях общей лечебной сети) госпитализация больных с плевральными выпотами неясной этиологии в специализированное отделение ПТД позволяет в короткие сроки квалифицированно верифицировать диагноз, изолировать больных туберкулёзом и назначить адекватную установленному диагнозу терапию.

***Стогова Наталья Аполлоновна**, тел. (473) 2-37-28-53, дом. тел. (473) 2-76-56-64,*
моб. тел. 8-910-284-80-55. e-mail: Stogova.51@mail.ru

МОРОЗ АРКАДИЙ МАКСОВИЧ

1943- 2013

9 сентября 2013 года, на 71–м году жизни, скончался доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации Аркадий Максович Мороз.

Аркадий Максович Мороз родился 26 августа 1943 года в г. Москве. Ещё во время учебы во Втором Московском медицинском институте им. Н.И. Пирогова он определил свой профессиональный путь на всю жизнь. С первых лет свой трудовой деятельности, работая в Центральном НИИ туберкулёза РАМН, он занялся научно-исследовательской работой. Его наставником стал выдающийся ученый-иммунолог профессор М.М. Авербах, что определило основные научные интересы А.М. Мороза – иммуноморфология и иммуногенетика туберкулеза и других легочных заболеваний, вопросы противотуберкулезной вакцинации, где он добился выдающихся успехов. В 1973 году он защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Влияние антилимфоцитарной и антимакрофагальной сыворотки на состояние противотуберкулёзного иммунитета при вакцинации БЦЖ» а в 1979 году – докторскую диссертацию на тему: «Иммуногенетические механизмы наследования резистентности к туберкулёзу».

В 1998 году А.М. Мороз перешел на работу в Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом, где возглавил вновь созданный отдел проблем лабораторной диагностики. В это время как научные, так и практические интересы Аркадия Максовича были посвящены бактериологической, молекулярно-генетической и иммунологической диагностике туберкулеза, анализу механизмов лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Была создана оснащенная самым современным оборудованием Централизованная бактериологическая лаборатория, где были испытаны и внедрены новые методы молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. Научные достижения лаборатории сразу же внедрялись в практику противотуберкулёзной службы Москвы, что позволило значительно сократить сроки диагностики и определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёза.

А.М. Мороз – автор более 200 научных публикаций, в том числе трех титульных монографий и более 10 коллективных, его приоритетные научные исследования подтверждены семью патентами. За достижения в области науки и практики в 2003 году А.М. Мороз награжден Премией Правительства города Москвы.

Много сил и времени А.М. Мороз уделял подготовке молодых специалистов, привлекая их к научной работе. За годы работы в Центре под его руководством подготовлены две докторские и четыре кандидатские диссертации.

Добрая память об Аркадии Максовиче навсегда сохранится в сердцах его коллег, друзей, учеников.

Сотрудники Государственного казенного учреждения здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулёзом Департамента здравоохранения города Москвы»

МОСКОВСКОЕ ОБЩЕСТВО ФТИЗИАТРОВ

Moscow phthisiatricians' society starts out

ДОРОГИЕ КОЛЛЕГИ!

6 сентября 2013 года Главное управление Министерства юстиции Российской Федерации по Москве приняло решение о государственной регистрации ***некоммерческой организации «Межрегиональная общественная организация «Московское общество фтизиатров» (МОО «МОФ»).***

Это – основанное на членстве, добровольное общественное объединение граждан, которое создано и действует в соответствии с Конституцией Российской Федерации, Федеральными законами «Об общественных объединениях», «О некоммерческих организациях», Гражданским кодексом Российской Федерации, другими законодательными актами Российской Федерации, а также общепризнанными принципами и нормами международного права и Уставом (ознакомиться с которым можно на сайте общества по адресу *www.m-o-f.ru*).

Постоянно действующий руководящий орган Московского общества фтизиатров – Правление, располагающееся по адресу: *107014, г. Москва, ул. Стромынка, дом 10, строение 1.*

Основной целью общества является профессиональная консолидация фтизиатров из разных регионов Российской Федерации для совершенствования организационной, теоретической и практической противотуберкулезной работы.

Побудительным мотивом к созданию Московского общества фтизиатров явилась необходимость объединения профессионалов для формирования единой позиции путем открытого обсуждения всех спорных проблем, адаптации достижений отдельных субъектов Российской Федерации к различным социально-экономическим и географическим условиям нашей Родины.

Общество будет стремиться обеспечить:

- развитие междисциплинарных связей;
- взаимопомощь и информационную поддержку врачей различных специальностей, научных сотрудников, среднего медицинского персонала, оказывающих противотуберкулезную помощь населению Российской Федерации;
- условия для наиболее эффективной реализации творческого потенциала членов общества в интересах развития теории и практики медицины;
- пропаганду достижений медицинской науки в области фтизиатрии, содействие скорейшему распространению новейшей научной информации.

К вступлению в общество приглашаются достигшие 18 лет граждане Российской Федерации, иностранные граждане и лица без гражданства (законно находящиеся на территории Российской Федерации), а также общественные объединения и организации, которые заинтересованы в совместной работе по достижению поставленных целей, готовые признавать Устав общества, уплатить вступительный взнос и регулярно уплачивать членские взносы и принимать личное участие в работе общества.

Физические лица принимаются в члены общества на основании личного заявления и уплаты вступительного взноса; общественные объединения – на основании заявления с приложением соответствующего решения своих правомочных руководящих органов и уплаты вступительного взноса.

Руководящими органами общества являются:

- Конференция организации;
- Правление организации;
- Президент организации.

Предусматривается создание в субъектах Российской Федерации региональных отделений общества, филиалов и представительств.

Следите за информацией на сайте: www.m-o-f.ru

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации некоммерческой организации

Межрегиональная общественная организация "Московское общество фтизиатров"

107014, г. Москва, ул. Стромынка, д.10, стр.1

Решение о государственной регистрации некоммерческой организации при создании принято "06" сентября 2013 г. Главным управлением Министерства юстиции Российской Федерации по Москве.

Запись о некоммерческой организации внесена в Единый государственный реестр юридических лиц "16" сентября 2013 г. за основным государственным регистрационным номером:

1 1 3 7 7 9 9 0 1 7 1 9 0

Исполняющий обязанности начальника Главного управления Министерства юстиции Российской Федерации по Москве — В.А.Титов

Учетный N 7 7 1 2 0 1 7 2 4 0

Дата выдачи "19" сентября 2013 г.

Межрегиональная общественная организация
«Московское общество фтизиатров»

Адрес: 107014, г. Москва, ул. Стромынка, д. 10, стр. 1
тел. +7 (916) 972-37-76
e-mail: mof_2013@mail.ru
сайт: www.m-o-f.ru, www.mosphtiziatr.ru

Заявление
для вступающих в члены Общества

1. Фамилия _____ **Имя** _____ **Отчество** _____

Дата рождения _____

2. Название учреждения _____

_____

Подразделение: _____

3. Служебный адрес:

Почтовый индекс [ ] Субъект РФ _____

Город _____

Улица _____ дом _____ корпус _____

Телефон: код города (_____) телефон _____ факс _____

E-mail _____

4. Должность:

Директор [ ] Главный врач [ ] Главный специалист по фтизиатрии [ ]

Зав. кафедрой [ ] Доцент [ ] Научный сотрудник [ ] Зав. отделением [ ]

Врач [ ] Аспирант [ ] Клинический ординатор [ ] Прочее _____ (указать)

5. Ученая степень _____ (указать)

6. Звание:

Академик [ ] Член-корр. [ ] Профессор [ ] Доцент [ ] Другое _____ Нет звания [ ]

7. Домашний адрес:

Почтовый индекс [ ] Субъект РФ _____

Город _____

Улица _____ дом _____ корпус _____ квартира _____

Телефон: код города (_____) телефон _____ мобильный _____

8. Специализация:

Фтизиатрия [ ] Травматология и ортопедия [ ] Офтальмология [ ]

Педиатрия [ ] Организация здравоохранения [ ] Анестезиология [ ]

Хирургия [ ] Функциональная диагностика [ ] Пульмонология [ ]

Акушерство и гинекология [ ] Урология [ ] Экономика [ ] Юриспруденция [ ]

Другое _____ (указать)

9. Область Ваших специальных интересов _____

_____

«_____» _____ 20____ г. Подпись _____