

На правах рукописи

Поляков Андрей Евгеньевич

**ПРЯМОЙ УСКОРЕННЫЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ**

Mycobacterium tuberculosis

03.00.07 - Микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2007

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки «Московском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора.

Научный руководитель

доктор медицинских наук

Мазурова Изабелла Константиновна

Официальные оппоненты

доктор медицинских наук, профессор

Меньшиков Дмитрий Дмитриевич

кандидат медицинских наук

Мартынова Людмила Павловна

Ведущая организация

ГОУ ВПО Нижегородская
государственная медицинская
академия Росздрава

Защита состоится 8 ноября 2007 года в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при ФГУН Московском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, г. Москва

Автореферат разослан 6 октября 2007 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат биологических наук

С. Ю. Комбарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В настоящее время регистрируются высокие показатели заболеваемости и смертности от туберкулезной инфекции. За последние 15 лет заболеваемость туберкулезом в стране увеличилась почти в 2,5 раза и в 2005 году составила 83,8 на 100 тыс. населения, смертность от туберкулеза за этот период увеличилась в 2,7 раза и в 2005 году составила 22,1 на 100 тыс. населения. Показатель смертности от туберкулеза в России занимает второе место после показателя смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (В.В. Ерохин, В.В. Пунга 2002, А.Г. Хоменко 1996). Заболеваемость туберкулезом лиц, содержащихся в местах лишения свободы, в десятки раз превышает уровень заболеваемости населения страны (А.С. Кононец 2003, F. Portaels, L. Rigouts 1999).

Одной из причин роста заболеваемости туберкулезом в стране является широкое распространение устойчивых к противотуберкулезным препаратам форм возбудителя (Я.М. Балабанова 2005, М.Ю. Липин 2003, О.В. Нарвская 1999, А.Г. Хоменко 1997 и др), что снижает эффективность лечения туберкулеза и повышают степень его эпидемической опасности. В последние годы все более широкое распространение получают штаммы, устойчивые сразу к нескольким противотуберкулезным препаратам. Особую тревогу вызывает случаи заболевания туберкулезом с устойчивостью *M.tuberculosis* к ключевым противотуберкулезным препаратам изониазиду и рифампицину. В этих случаях заболевание сопровождается не только тяжелым течением, но и низкой эффективностью и значительным удорожанием лечения, что ставит под угрозу выполнение национальных программ борьбы с туберкулезной инфекцией. Вместе с тем, традиционные методы определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* по продолжительности занимают от 45 до 90 дней, в течение которых больному не может быть обоснованно назначена адекватная химиотерапия. Из-за низкой эффективности лечения, больной в этот период сохраняет контагиозность. Изоляция подобных больных может быть единственным

практическим способом ограничить трансмиссию штаммов *M.tuberculosis* с МЛУ (Г.Л.Ридер 2001). Учитывая вышеизложенное, исключительную важность приобретает внедрение в лабораторную практику быстрого метода выявления множественной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* у больных-бактериовыделителей.

Цель настоящего исследования

Целью данной работы является разработка прямого ускоренного микробиологического метода определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду.

Задачи исследования

1. Изучение возможности применения биохимического нитратредуктазного теста в качестве детектора роста микобактерий туберкулеза в прямом ускоренном микробиологическом методе определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду.
2. Определение оптимального режима деконтаминации мокроты для сохранения жизнеспособности *M.tuberculosis* при определении их лекарственной чувствительности в прямом ускоренном микробиологическом методе.
3. Оценка эффективности, чувствительности и специфичности нового разрабатываемого метода при сопоставлении с результатами определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* непрямого метода абсолютных концентраций и молекулярно-генетического метода «ТБ-БИОЧИП».
4. Выявление мутационных изменений в генах, ответственных за множественную лекарственную устойчивость *M.tuberculosis*, выделенных у больных туберкулезом в исправительных учреждениях Нижегородской области.

Научная новизна

Впервые разработан прямой ускоренный микробиологический метод определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду (решение о выдаче патента в Федеральном институте промышленной собственности Роспатента от 18 мая 2007 года по заявке на изобретение № 2005119756/13), по своей чувствительности, специфичности и эффективности позволяющий выявлять *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью в ранние сроки исследования, что способствует снижению трансмиссии подобных штаммов.

В прямом определении лекарственной чувствительности для выявления ранних признаков роста *M.tuberculosis* впервые применен нитратредуктазный тест, который позволил сократить продолжительность исследования лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* до 10-14 дней в 44,2% случаев.

При изучении молекулярно-генетических механизмов формирования множественной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом в исправительных учреждениях Нижегородской области, обнаружены новые сочетания мутаций в кодоне 531 гена *rpoB* и двойные мутации в кодонах 315 и 335 гена *katG* у 24,4% штаммов.

Практическая значимость

Разработанный прямой ускоренный микробиологический метод позволяет выявлять *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью в течение 10-21 дня, что в 4-5 раз быстрее, чем при традиционном методе абсолютных концентраций. Более раннее выявление резистентных форм возбудителя туберкулеза ускоряет коррекцию лечения и изоляцию больных туберкулезом легких, выделяющих микобактерии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

Модифицированный способ деконтаминации мокроты позволяет эффективнее определять лекарственную чувствительность *M.tuberculosis* в образцах мокроты с незначительным их содержанием.

Выявленные двойные мутации в одном гене (*katG*) могут быть использованы в качестве маркера *M.tuberculosis* при установлении источника инфекции.

Внедрение результатов работы

Метод внедрен в практику в Центральной лаборатории по диагностике туберкулеза ГУФСИН России (Москва) и межрегиональной бактериологической лаборатории по диагностике туберкулеза ГУФСИН России по Нижегородской области, что подтверждено актами о внедрении. По материалам диссертации разработаны и утверждены Методические рекомендации «Прямой ускоренный микробиологический метод определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*» в Федеральной службе исполнения наказаний Минюста России 22.06.07.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан новый ускоренный метод микробиологического определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду.
2. При сопоставлении результатов определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*, полученных тремя методами, показана чувствительность, специфичность и эффективность нового метода.
3. Идентифицированы мутации в генах и выявлено новое доминирующее сочетание мутаций, приводящие к множественной лекарственной устойчивости у 24,4% штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом пенитенциарных учреждений Нижегородской области.

Апробация материалов диссертации

Апробация диссертации проведена на заседании секции Ученого совета «Эпидемиология, микробиология и клиника инфекционных болезней» ФГУН Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского 12 апреля 2007 года. Результаты исследований доложены на международной конференции «32nd World Conference on lung health of the international union against tuberculosis and lung disease» (г. Париж, Франция 1-4 ноября 2001).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 работ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, трех глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, состоящего из 104 источников отечественных и 107 иностранных авторов. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 5 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы исследования

Образцы мокроты и клинические штаммы выделяли от больных туберкулезом легких (155 человек), находящихся в учреждениях уголовно-исполнительной системы Нижегородской области. Основным критерием отбора больных являлось наличие в мокроте кислотоустойчивых микобактерий, обнаруживаемых при микроскопии. Всего в ходе работы исследовано 367 образцов мокроты и 155 клинических штаммов *M.tuberculosis*.

Питательные среды: для культивирования штаммов *M.tuberculosis* готовили в лаборатории питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финна-2 (Приказ № 109 Минздрава России от 2003г., Приложение 11).

Реактивы, использованные при деконтаминации мокроты, описаны в Приказе № 109 Минздрава России от 2003г., Приложение 11, и G.P. Kubica, 1963. Реактив Грисса (АО «Химреактив», Россия). Противотуберкулезные препараты: рифампицин 10г, Изониазид 10г (фирма Sigma, Германия).

Методы исследования

Бактериологические методы: выделение и идентификация *M.tuberculosis*, световая и люминесцентная микроскопия осадка мокроты

проведены в соответствии с Приказом № 109 Минздрава России от 2003г., Приложение 11.

Метод абсолютных концентраций определения лекарственной чувствительности клинических штаммов *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам проводили в соответствии с Приказом № 109 Минздрава России от 21.03.2003г, Приложение 11.

Молекулярно-генетический метод «ТБ-БИОЧИП» (В.М. Михайлович, С.А. Лапа, О.И. Скотникова, 2001г.) проводили совместно с д.б.н. О.И. Скотниковой, и д.м.н., профессором Морозом в молекулярно-генетической лаборатории Московского научно-практического центра борьбы с туберкулезом. ДНК *M.tuberculosis* выделяли по методическим рекомендациям «Выявление ДНК микобактерий туберкулезного комплекса (*M.tuberculosis*, *M.bovis*) методом полимеразной цепной реакции («НЕСТЕД»-ПЦР) в различных биологических пробах», Москва.-2001г.

Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с рекомендациями И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева «Статистические методы в микробиологических исследованиях». Bayesian анализ для оценки эффективности, чувствительности и специфичности различных методов исследования проведено по Г.Л. Ридеру (2001) и В.И. Голышевой (2003).

Результаты исследования и их обсуждение

Разработка прямого ускоренного микробиологического метода определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к изониазиду и рифампицину.

*Нитратредуктазная активность, как детектор роста *M.tuberculosis*.*

Выбор прямого метода определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам значительно сокращает продолжительность исследования за счет исключения этапа выделения

чистой культуры *M.tuberculosis*. Впервые в прямом определении лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* для выявления ранних признаков их роста применен биохимический нитратредуктазный тест, что позволило сократить продолжительность исследования и регистрировать результаты уже на 10-14 день после посева мокроты при появлении окрашивания поверхности питательной среды (табл. 1).

Таблица 1.

Выявление ранних признаков роста *M.tuberculosis* нитратредуктазным тестом при прямом определении лекарственной чувствительности.

Количество образцов мокроты	Сроки определения ЛЧ МБТ (в днях)		
	10 дней	14 дней	21 день
174	19 (10,9%)	58 (33,3%)	97 (55,7%)

Использование нитратредуктазного теста позволило уже к 10 и 14 дням определить ЛЧ МБТ в 44,2% образцов мокроты. В 55,7% образцов мокроты результаты получены на 21 день исследования.

Зависимость продолжительности прямого определения лекарственной чувствительности M.tuberculosis от количества микобактерий в мокроте.

Известно, что прямое изучение ЛЧ МБТ в мокроте возможно только при массивном бактериовыделении у больного (Б. Блум, 2002), которое определяют при микроскопии. Выявлена зависимость продолжительности исследования лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* прямым ускоренным микробиологическим методом от количества микобактерий в образцах мокроты (табл. 2).

Зависимость продолжительности исследования ЛЧ МБТ
прямым ускоренным микробиологическим методом
от количества микобактерий в мокроте.

Содержание МБ в мокроте	Кол-во образцов	Результаты исследований		
		10 дней	14 дней	21 день
Значительное содержание МБ в мокроте (более или ровно 100 МБ в 100 полях зрения)	97	22 (22,7%)	42 (43,3%)	33 (34,0%)
Незначительное содержание МБ в мокроте (3-99 МБ в 100 полях зрения)	103	3 (2,9%)	25 (24,3%)	75 (72,8%)

При значительном содержании МБ в мокроте на 10 день исследования ЛЧ МБТ определили в 22 образцах мокроты (22,7%), в то время как при незначительном содержании МБ в мокроте, результаты ЛЧ МБТ получены только в 3 случаях (2,9%). Суммарно к 14 дню исследования в группе образцов мокроты со значительным содержанием МБ получено 66,0% результатов ЛЧ МБТ, против 27,2% результатов ЛЧ МБТ при незначительном содержании МБ в мокроте. При незначительном содержании МБ в материале, 72,8% результатов ЛЧ МБТ получены только на 21 день исследования. Таким образом, при прямом определении ЛЧ МБТ важной задачей является сохранение жизнеспособности *M.tuberculosis* в мокроте.

Выбор оптимального способа деконтаминации мокроты при определении лекарственной чувствительности M.tuberculosis прямым ускоренным микробиологическим методом.

Микобактерии туберкулеза устойчивы к действию многих химических веществ, которые в свою очередь убивают другие микроорганизмы. Однако большинство химических детергентов снижают количество жизнеспособных микобактерий до 50% (С.Г. Сафонова 1991). Нами подобраны условия и реактивы для щадящей деконтаминации образцов мокроты в прямом ускоренном микробиологическом методе (табл. 3). В основу первых трех способов деконтаминации мокроты взят общепринятый 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия, меняется только

реактив для разведения осадка мокроты. В четвертом способе использовали NALC-NaOH с разведением осадка мокроты фосфатным буфером pH 6,8.

Таблица 3.

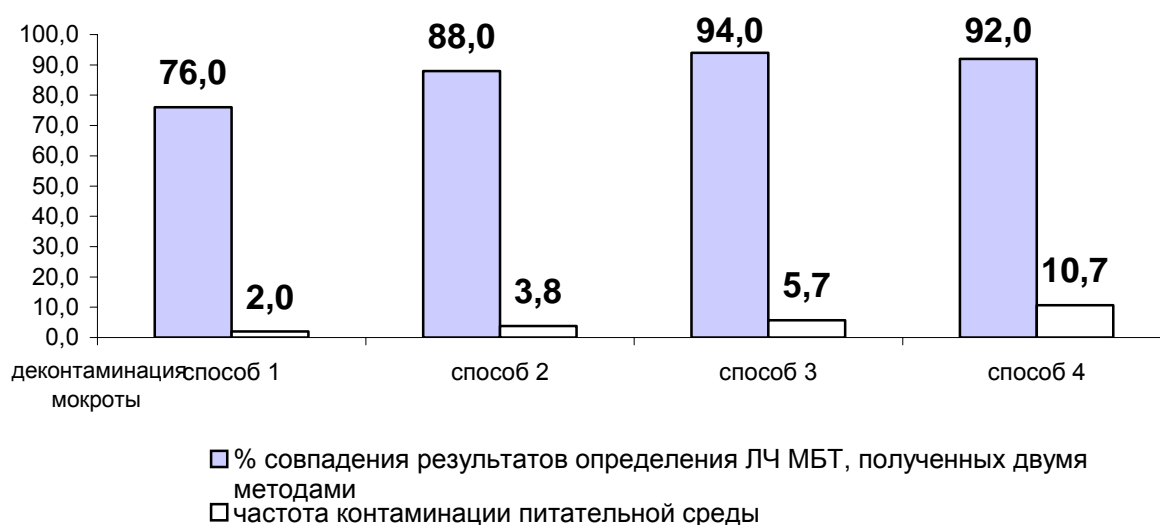
Способы деконтаминации мокроты
с использованием различных реактивов.

№ №	Наименование реактивов для деконтаминации
1	10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия (Na_3PO_4) с разведением осадка мокроты дистиллированной водой
2	10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия с разведением осадка мокроты фосфатным буфером pH 6,8
3	10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия с разведением осадка мокроты 1% раствором лимонной кислоты
4	NALC-NaOH с разведением осадка мокроты фосфатным буфером pH 6,8

Каждый способ деконтаминации мокроты изучен не менее чем, на 50 образцах мокроты при определении ЛЧ МБТ разрабатываемым методом в сравнении с методом абсолютных концентраций, используемом в практическом здравоохранении (рис. 1, 2 и 3)

Рисунок 1.

Совпадение результатов определения ЛЧ МБТ (в %), полученных прямым ускоренным микробиологическим методом при различных способах деконтаминации мокроты, в сопоставлении с методом абсолютных концентраций.

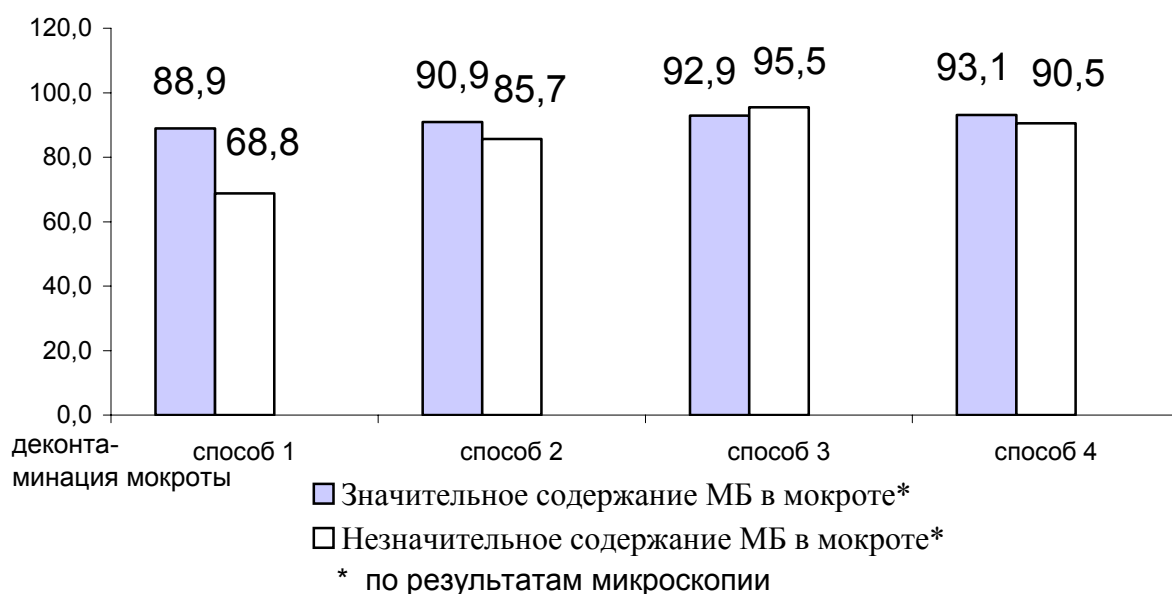


Показано, что наибольшее совпадение результатов (94%) зафиксировано при использовании способа деконтаминации мокроты № 3

(10% раствор Na_3PO_4 с разведением осадка мокроты 1% раствором лимонной кислоты). При испытании способа деконтаминации мокроты № 4, совпадение результатов определения ЛЧ МБТ, полученных двумя методами, составило 92%. Наименьшее совпадение результатов оказалось при применении способов деконтаминации мокроты № 1 и № 2 – 76% и 88% соответственно. Частота контаминации питательной среды показывает, что способы № 1 и 2 являются более жесткими, по сравнению со способами № 3 и 4, то есть, жизнеспособность *M.tuberculosis* лучше сохраняется при деконтаминации мокроты последними двумя способами.

Рисунок 2.

Совпадение результатов определения ЛЧ МБТ (в %), полученных прямым ускоренным микробиологическим методом, в зависимости от количественного содержания микобактерий в мокроте, при сопоставлении с методом абсолютных концентраций.

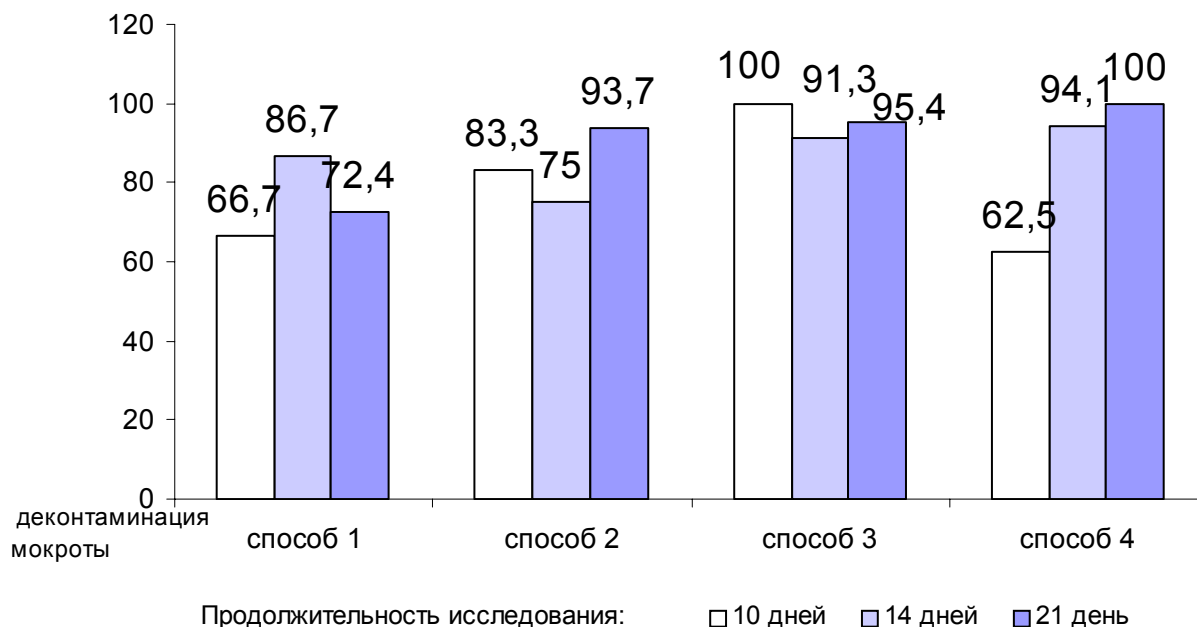


На рисунок 2 показано, что при способе деконтаминации мокроты № 3, примененного в образцах мокроты с незначительным содержанием микобактерий, результаты определения ЛЧ МБТ составили 95,5%

совпадений, что достоверно выше ($p < 0,05$), чем при использовании других способов деконтаминации мокроты. В образцах мокроты со значительным содержанием микобактерий совпадение результатов определения ЛЧ МБТ двумя методами было в пределах 88,9-93,1%.

Рисунок 3.

Совпадение результатов определения ЛЧ МБТ (в %), полученных прямым ускоренным микробиологическим методом, в зависимости от продолжительности исследования, при сопоставлении с методом абсолютных концентраций.



На рисунке 3 показано, метод абсолютных концентраций полностью подтверждает показания прямого ускоренного микробиологического метода при использовании способа деконтаминации мокроты № 3 (результаты, полученные на 10 день) и способа № 4 (результаты получены на 21 день исследования). В целом, наиболее стабильные и высокие показатели совпадения результатов определения ЛЧ МБТ, полученных двумя методами, были при использовании в разрабатываемом методе способа деконтаминации мокроты № 3 – 91,3-100%.

Статистическим методом Bayesian-анализ проведена оценка чувствительности, специфичности и эффективности прямого ускоренного микробиологического метода определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* по каждому из противотуберкулезных препаратов в зависимости от способа деконтаминации мокроты в сравнении с методом абсолютных концентраций (табл. 4).

Таблица 4.

Основные параметры оценки прямого ускоренного микробиологического метода определения ЛЧ *M.tuberculosis* к изониазиду и рифампицину при различных способах деконтаминации мокроты в сравнении с методом абсолютных концентраций.

№	Способ деконтаминации	Противотуберкулезный препарат	Чувствительность, (%)	Специфичность, (%)	Эффективность
1	Na ₃ PO ₄ + дист. вода	изониазид	78,8	77,4	0,78
		рифампицин	83,9	82,8	0,83
2	Na ₃ PO ₄ + фосфат.буф рН=6,8	изониазид	88,6	68,8	0,83
		рифампицин	92,7	80,0	0,89
3	Na ₃ PO ₄ + лим.кис-та	изониазид	97,4	92,9	0,96
		рифампицин	93,9	90,5	0,93
4	NALC+ фосфат.буф рН=6,8	изониазид	94,6	88,2	0,93
		рифампицин	96,9	95,0	0,96

Чувствительность прямого ускоренного микробиологического метода (способность выявлять истинную лекарственную устойчивость) при способе № 3 составила 97,4% для изониазида и 93,9% для рифампицина, специфичность (способность выявлять истинную лекарственную чувствительность) - 92,9% для изониазида и 90,5% для рифампицина; эффективность (соотношение между количеством корректных результатов и общим количеством результатов) была 0,96 для изониазида и 0,93 для рифампицина. При деконтаминации мокроты способом № 4 показатели чувствительности, специфичности и эффективности нового метода выше при

определении ЛЧ МБТ к рифампицину, однако показатель специфичности определения резистентности *M.tuberculosis* к изониазиду оказался низким - 88,2%. Кроме того, способ деконтаминации мокроты № 4 более трудоемкий и дорогостоящий по сравнению со способом деконтаминации мокроты № 3.

Таким образом, способ деконтаминации мокроты 10% раствором Na_3PO_4 с разведением осадка мокроты 1% раствором лимонной кислоты позволяет в новом разрабатываемом методе эффективно определять лекарственную чувствительность *M.tuberculosis*, в образцах мокроты, как со значительным, так и с незначительным содержанием микобактерий в сроки от 10 до 21 дня.

*Прямой ускоренный микробиологический метод определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к изониазиду и рифампицину.*

Основное преимущество прямого ускоренного микробиологического метода перед методом абсолютных концентраций заключается в продолжительности исследования лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к ПТП (табл. 5). Исследована лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза, выделенных от 155 больных туберкулезом легких с бактериовыделением, определенным микроскопическим методом. Больные сдавали мокроту дважды в течение двух дней. Образец мокроты, полученный от больного в первый день, исследовали обычными, принятыми в практическом здравоохранении, методами с выделением чистой культуры *M.tuberculosis* и определением ЛЧ МБТ к ПТП методом абсолютных концентраций, а второй образец мокроты, полученный на следующий день, исследовали новым прямым ускоренным микробиологическим методом определения ЛЧ МБТ к изониазиду и рифампицину.

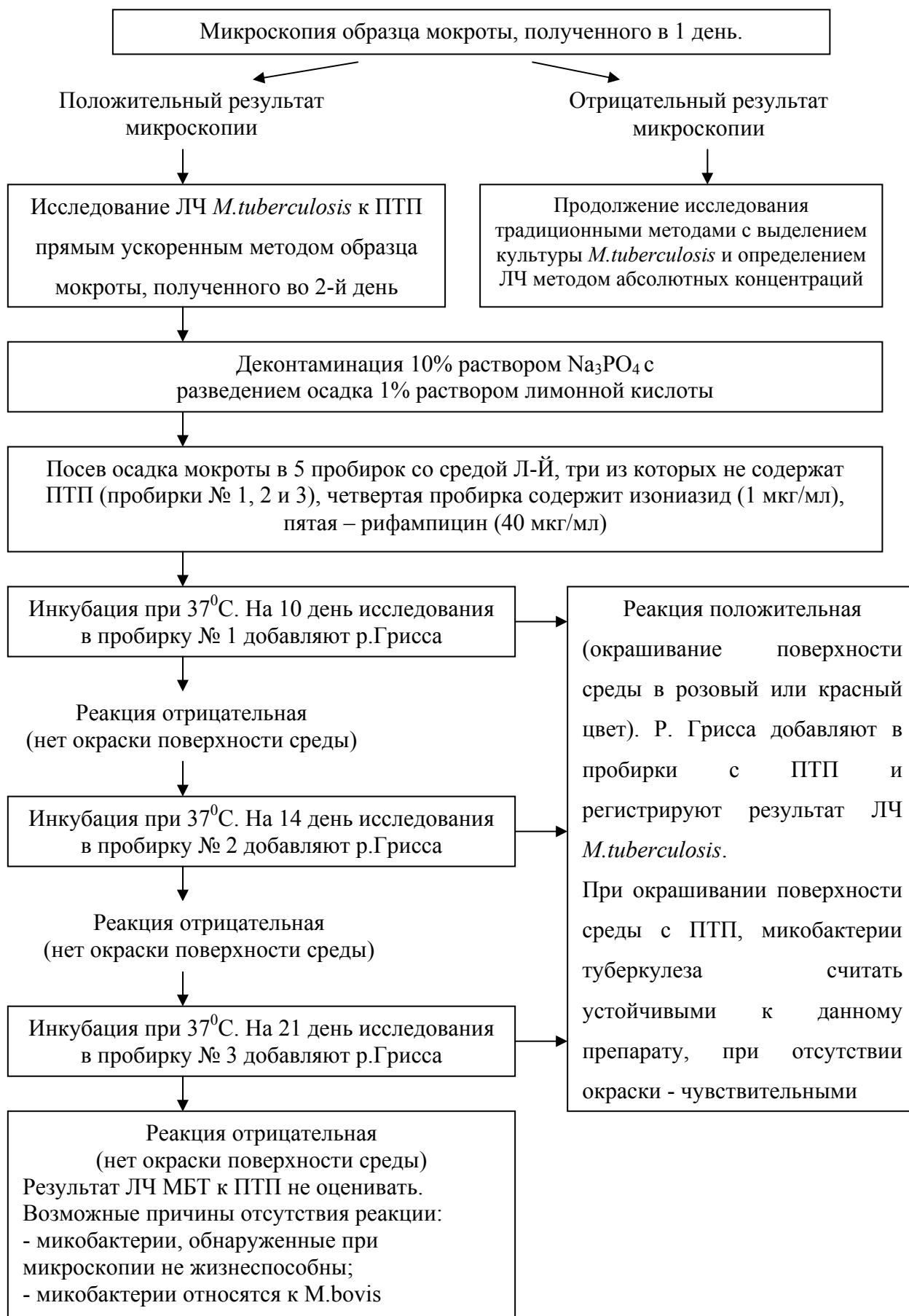
Продолжительность исследования лекарственной чувствительности
M.tuberculosis двумя методами.

Продолжительность исследования ЛЧ МБТ	Прямой ускоренный микробиологический метод			Метод абсолютных концентраций	
	10 дней	14 дней	21 день	45-60 дней	61-90 дней
Обследовано больных туберкулезом [n=155]	19 (12,2%)	50 (32,2%)	86 (55,5%)	108 (69,7%)	47 (30,3%)
Из них кол-во больных с МЛУ возбудителя [n=105]	11 (10,5%)	34 (32,4%)	60 (57,1%)	69 (65,7%)	36 (34,3%)

Из таблицы 5 видно, что продолжительность исследования лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду прямым ускоренным микробиологическим методом составляет от 10 до 21 дня, вместо 45-90 дней при методе абсолютных концентраций. Использование нового метода позволило выявить *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью у 105 больных туберкулезом в 4-5 раз быстрее, чем методом абсолютных концентраций. У 45 (42,9%) больных туберкулезом, множественная лекарственная устойчивость возбудителя выявлена к 14 дню исследования.

Схема определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* прямым ускоренным микробиологическим методом представлена на рис. 4.

Рисунок 4. Схема постановки прямого ускоренного микробиологического метода определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду



Таким образом, разработан новый прямой ускоренный микробиологический метод определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*. Чувствительность нового метода - 93,9-97,4%, специфичность - 90,5-92,9%, эффективность - 0,93-0,96 к рифампицину и изониазиду соответственно. Сокращая сроки исследования в 4-5 раз, по сравнению с методом абсолютных концентраций, новый метод способствует более раннему выявлению *M.tuberculosis* с МЛУ. Изоляция больных, зараженных микобактериями туберкулеза с МЛУ и своевременная коррекция химиотерапии приведет к снижению риска распространения *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью.

Изучение мутаций в генах rpoB, katG, inhA, oxyR/ahpC M.tuberculosis с помощью метода «ТБ-БИОЧИП»

Известно, что устойчивость к рифампицину обусловлена мутациями в гене *rpoB M.tuberculosis*. Мутации в генах *katG, inhA, ahpC* и *kasA* ответственны за устойчивость *M.tuberculosis* к изониазиду (S. Ramaswamy, J.M. Musser 1999, О.И. Скотникова 2005, И.Г. Шемякин 2005). Выявление мутаций, обуславливающих молекулярно-генетические механизмы формирования множественной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* подтвердит правильность определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* в прямом ускоренном микробиологическом методе. Для исследования молекулярно-генетическим методом «ТБ-БИОЧИП», подобрали 52 штамма *M.tuberculosis*, в которых результаты определения ЛЧ МБТ, полученные разрабатываемым методом совпадали с результатами метода абсолютных концентраций.

Выявление мутаций в генах M.tuberculosis, вызывающих устойчивость к рифампицину и изониазиду.

В гене *rpoB* 30 из изученных штаммов (57,7%) имели замены в кодоне 531: у 28 штаммов (53,8%) - Ser531>Ieu и у 2 штаммов (3,8%) - Ser531>Thr. Мутации в других кодонах определяли у единичных штаммов. В кодоне 526 обнаружены замены аминокислот у 5 штаммов (9,6%), в кодоне 511 - у 3 штаммов (5,8%), в 516 кодоне - в одном штамме *M.tuberculosis*. Таким образом, выявлена доминирующая мутация в кодоне 531 гена *rpoB*. Эти данные согласуются с более ранними научными работами (R.C. Cooksey 1993, Э.В. Генерозов 1999, Е.А. Желткова 2001, М.Ю. Липин 2004) по определению ведущей роли мутаций в кодоне 531 гена *rpoB* в механизме формирования устойчивости *M.tuberculosis* к рифампицину. 13 штаммов, в гене *rpoB* которых не обнаружены мутации методом "ТБ-БИОЧИП", определены как чувствительные к рифампицину.

Мутации, определяющие резистентность к изониазиду, изучали в трех генах: *katG*, *inhA* и *oxyR/ahpC*. Мутаций в последнем гене не обнаружено. Среди 52 штаммов *M.tuberculosis* у 40 штаммов (76,9%) выявлены мутации в 315 кодоне гена *katG*: у 19 штаммов (36,5%) замена Ser315>Thr, у 11 штаммов (21,2%) обнаружена двойная замена Ser315>Thr и Ile335>Val, у 5 штаммов (9,6%) - Ser315>Arg, у 4 штаммов (7,7%) - Ser315>Gly и в одном штамме - Ser315>Ile. В кодоне 328 гена *katG* выявлена мутация у одного штамма *M.tuberculosis* с заменой Thr328>Gly. Выявление мутаций в 315-ом кодоне гена *katG* является характерным для резистентных к изониазиду штаммов *M.tuberculosis* (Л.Н. Черноусова 2001, И.Г. Шемякин 2005)

Особый интерес представляет группа из 11 штаммов (21,1%), в которых обнаружены двойные мутации, то есть в двух кодонах гена *katG* – 315 и 335, что определило их устойчивость к изониазиду. Двойные мутации редко встречаются (J.M.Musser 1996, P.Dobner 1997, H.J.Marttila 1998, М.Ю.Липин 2004), поэтому изучение и накопление данных о них в одном гене позволит использовать их в качестве эпидемиологического маркера для

установления источника инфекции. Кроме мутационных изменений в гене *katG*, эти 11 штаммов имели мутацию в кодоне Ser531>Leu гена *rpoB*, что определило их устойчивость к рифампицину. Только один штамм обладал дополнительной мутацией в гене *inhA* (G6).

Мутации в гене *inhA* *M.tuberculosis* выявлены в двух кодонах – у 8 штаммов (15,4%) в кодоне T(15) и у одного штамма - в кодоне G(6). У 43 штаммов *M.tuberculosis* (82,7%) мутационных изменений в гене *inhA* не обнаружили, что подтверждает данные мировой литературы о редкой встречаемости мутаций в этом гене - 12-30% (S. Ramaswamy, J.M. Musser 1999 г).

Генетическая характеристика штаммов M.tuberculosis с множественной лекарственной устойчивостью.

Изучены некоторые механизмы формирования множественной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких, находящихся в пенитенциарных учреждениях Нижегородской области, при проведении анализа сочетания мутаций, выявленных в генах *rpoB*, *katG* и *inhA* у 41 штамма, устойчивых к изониазиду и рифампицину (табл. 6).

Наиболее часто (24,4%) наблюдали сочетание мутаций в кодоне 531 гена *rpoB* и двойных мутаций в кодонах 315 и 335 гена *katG*. Подобные редкие сочетания мутаций при формировании множественной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* в других исследованиях выявлялись у единичных штаммов (Е.А.Желткова 2004, М.Ю. Липин. 2004). Чаще всего, как наиболее распространенное сочетание мутаций в генах *M.tuberculosis* МЛУ описывают мутации в кодоне Ser531>Leu гена *rpoB* и Ser315>Thr в гене *katG* (О.И. Скотникова 2005, И.Г. Шемякин 2005), которое в нашем исследовании занимает второе место по частоте встречаемости – 21,9% (9 штаммов). Другие сочетания мутаций в исследуемых штаммах выявлены в единичных случаях с частотой встречаемости от 2,4 до 7,3%.

Сочетания мутаций в кодонах генов *rpoB*, *katG* и *inhA*
M.tuberculosis с МЛУ.

Номера кодонов			Количество штаммов (n=41)	
в гене <i>rpoB</i>	в гене <i>katG</i>	в гене <i>inhA</i>	Абс	%
			Ser531>Leu	Ser315>Thr Ile335>Val
Ser315>Thr	Мутации не обнаружены	9		21,9
Ser315>Arg	Мутации не обнаружены	3		7,3
Ser315>Thr	T(15)	2		4,9
Ser315>Gly	Мутации не обнаружены	2		4,9
Ser315>Thr Ile335>Val	G(6)	1		2,4
Thr328>Gly	Мутации не обнаружены	1		2,4
Ser531>Thr	Ser315>Thr	Мутации не обнаружены	2	4,9
His526>Asp	Ser315>Thr	T(15)	2	4,9
	Ser315>Thr	Мутации не обнаружены	1	2,4
His526>Tyr	Ser315>Gly	T(15)	1	2,4
	Ser315>Ile	Мутации не обнаружены	1	2,4
Leu511>Pro	Ser315>Arg	T(15)	1	2,4
	Ser315>Arg	Мутации не обнаружены	1	2,4
	Ser315>Thr	Мутации не обнаружены	1	2,4
Asp516>Val	Ser315>Gly	T(15)	1	2,4
Мутации не обнаружены	Ser315>Thr	Мутации не обнаружены	1	2,4
	Мутации не обнаружены	T(15)	1	2,4

Таким образом, при формировании МЛУ *M.tuberculosis*, наиболее распространенным (73,2%) является сочетание мутаций в 531 кодоне гена *rpoB* и 315 кодоне гена *katG*, устойчивость к рифампицину обусловлена мутациями в гене *rpoB* в 95,1% случаев, устойчивость к изониазиду в гене *katG* - в 97,6% случаев. Выявлены новые доминирующие сочетания мутаций в кодоне 531 гена *rpoB* и двойные мутации в кодонах 315 и 335 гена *katG* *M.tuberculosis*, приводящие к множественной лекарственной устойчивости у 24,4% штаммов. Выявление доминирования штаммов *M.tuberculosis* с подобными мутациями, возможно, указывает на их селективные преимущества перед другими штаммами *M.tuberculosis* с МЛУ.

Определение лекарственной чувствительности M.tuberculosis к ПТП разными методами.

Изучена лекарственная чувствительность *M.tuberculosis*, выделенных от 52 больных туберкулезом легких. Образцы мокроты исследовали прямым ускоренным микробиологическим методом, штаммы *M.tuberculosis* – методом абсолютных концентраций и молекулярно-генетическим методом «ТБ-БИОЧИП» (табл. 7).

Таблица 7.

Результаты определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к ПТП разными методами.

Образцы мокроты или штаммы	Методы определения ЛЧ МБТ		
	Прямой ускоренный микробиологический метод	Метод абсолютных концентраций	Метод «ТБ-БИОЧИП»
Чувствительные к изониазиду и рифампицину	10	10	10
Устойчивые только к рифампицину	0	0	0
Устойчивые только к изониазиду	1	1	3
С МЛУ (устойчивы к изониазиду и рифампицину одновременно)	41	41	39
Всего	52	52	52

Из таблицы 7 видно, что по результатам трех методов *M.tuberculosis*, выделенные у 52 больных, имели одинаковую характеристику по лекарственной чувствительности: у 10 больных (19,2%) *M.tuberculosis* определены как чувствительные к изониазиду и рифампицину. Прямым ускоренным микробиологическим методом и методом абсолютных концентраций у 1 больного выявлены микобактерии туберкулеза, устойчивые только к изониазиду и у 41 больного (78,8%) *M.tuberculosis* обладали множественной лекарственной устойчивостью. Однако в методе «ТБ-БИОЧИП» выявлено только 39 штаммов *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью. Два штамма *M.tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (3,8%) определены методом «ТБ-БИОЧИП» как устойчивые только к изониазиду, мутации в гене *rpoB*, ответственного за устойчивость *M.tuberculosis* к рифампицину, в этих двух штаммах не обнаружены. Вполне возможно, что в данной ситуации мутации были в других кодонах гена, так как с помощью метода "ТБ-БИОЧИП" исследуется только фрагмент гена *rpoB*, так называемый - Rifampicin Resistant Determining Region, в котором мутации, ответственные за резистентность к рифампицину встречаются у 95% штаммов *M.tuberculosis*. Однако, сам ген состоит из более 3000 пар нуклеотидов.

Таким образом, получены не только новые данные по механизму формирования множественной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, но и подтверждена при сопоставительной оценке высокая чувствительность нового прямого ускоренного микробиологического метода в определении лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к изониазиду и рифампицину.

ВЫВОДЫ

1. Разработан новый прямой ускоренный микробиологический метод определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду. Чувствительность нового метода - 93,9-97,4%, специфичность - 90,5-92,9%, эффективность - 0,93-0,96.
2. Показано, что определение лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* прямым ускоренным микробиологическим методом происходит в течение 10-21 дня, что в 4-5 раз быстрее, чем методом абсолютных концентраций.
3. Применение нитратредуктазного теста в качестве детектора роста микобактерий впервые позволило в 44,2% образцов мокроты получить результаты определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* на 10 и 14 день исследования.
4. Модифицирован способ деконтаминации мокроты, что повысило эффективность определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* до 95,5% в образцах мокроты с незначительным содержанием микобактерий.
5. Изучение мутаций в генах *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких пенитенциарных учреждений Нижегородской области, показало, что резистентность к рифампицину обусловлена (95,1%) мутациями в гене *rpoB*, резистентность к изониазиду (97,6%) мутациями в гене *katG*, наиболее распространенным является сочетание мутаций в 531 кодоне гена *rpoB* и 315 кодоне гена *katG* в 73,2% случаев. Выявление характерных мутационных изменений в генах *M.tuberculosis* подтверждает эффективность, чувствительность и специфичность прямого ускоренного микробиологического метода и соответствует данным мировой литературы.
6. Выявлены новые доминирующие сочетания мутаций (в кодоне 531 гена *rpoB* и двойные мутации в кодонах 315 и 335 гена *katG*), приводящие к множественной лекарственной устойчивости у 24,4% штаммов *M.tuberculosis*.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Safonova S.G., Blinova L.N., Golyshevskaya V.I., Kononets A.S., Mishouk G.A., Polotsky V.I., Polykov A.E., Yakimova N.I., Sloutsky A. Griess' method for *M.tuberculosis* drug susceptibility testing implementation, validation and programmatic value // The international journal of tuberculosis and lung disease.-France.- Paris.- 2001.-p.12.
2. Safonova S.G., Blinova L.N., Golyshevskaya V.I., Kononets A.S., Mishouk G.A., Polotsky V.I., Polykov A.E., Yakimova N.I., Sloutsky A. Evaluation of the Griess method for *M.tuberculosis* DST in the penitentiary system in Russia // The international journal of tuberculosis and lung disease.-France.-Paris.- 2001.-p.156.
3. Поляков А.Е., Якимова Н.И. Применение реактива Грисса в эпидемиологическом решении проблемы распространения полирезистентного туберкулеза в тюрьмах // Сборник статей «Профилактика социально-значимых заболеваний в УИС».-Нижний Новгород.-2001.
4. Поляков А.Е., Сафонова С.Г., Скотникова О.И. Определение множественной лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* различными методами // Пробл. туб. - 2006. - №6. - с.40-42.
5. Поляков А.Е., Мазурова И.К. Прямой нитратредуктазный метод определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2007.-№5-с.35-36.
6. Заявке на изобретение № 2005119756/13 выдана 24 июня 2005 года в Федеральном институте промышленной собственности Роспатента.

Список использованных сокращений

NALC	N-ацетил-L-цистеина
ЛЧ -	Лекарственная чувствительность
ЛЧ МБТ -	Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза
МБ -	Микобактерии
МБТ -	Микобактерии туберкулеза
МЛУ -	Множественная лекарственная устойчивость
ПТП -	Противотуберкулезные препараты
Среда Л-Й	Среда Левенштейна-Йенсена