Применение метода ПЦР в реальном времени для определения контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза

25 января, 2013

М. А. ВЛАДИМИРСКИЙ, Ю. С. АЛЯПКИНА, Д. А. ВАРЛАМОВ, Я. И. АЛЕКСЕЕВ, Л. К. ШИПИНА, М. В. ШУЛЬГИНА, Л. В. ДОМОТЕНКО, К. Р. БЫКАДОРОВА, Н. Н. ГАЩЕНКО, Б. ЕНДОУРОВА, Б.. В. ИВАНОВА, Е. А. ИЛЬИНА, О. А. ЛЕВКОВА, . В. МАРКОВА, В. П. НАЗЕМЦЕВА, Е. П. ПАВЛОВА,4А. И. ПОЛОЗОВ, Н. В. ШИШКИНА

НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И. М. Сеченова, ЗАО "Синтол", Москва, НП Центр внешнего контроля качества лабораторных исследований, Москва, 4НИИ прикладной микробиологии, Оболенск, ОПТД, Ростов-на-Дону, КПТД Краснодар, ОПТД Мурманск, ОПТД, Кемерово, 9ОПТД, Нижний Новгород, ОПТД, Воронеж, ПТД № 4, Москва, 2ОПТД, Калининград, 3ОГТТД, Псков, ОПТД,Брянск, ОПТД, Саратов

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

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

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

Возможности практического применения этих методов активно обсуждаются в научной литературе [16, 18, 19, 21]. В клинической практике эти методы могут использоваться для быстрого (2 дня) определения лекарственной устойчивости к соответствующим препаратам и своевременной коррекции лечения, а также служить средством контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов, своевременного эпидемиологического расследования их трансмиссии.

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

Мы разработали на основе технологии ПЦР-РВ эффективный и технически доступный с использованием одностадийного анализа метод быстрого определения лекарственной

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

Материалы и методы.

Штаммы МБТ. 22 референтных клинических штамма с известной характеристикой в отношении их устойчивости к рифампицину (12 штаммов были устойчивы к рифампицину при исследовании в жидкой культуре с помощью Bactec MGIT 960) любезно предоставлены ведущим научным сотрудником лаборатории микробиологии Центрального НИИ туберкулеза РАМН О. А. Иртугановой. 20 штаммов МБТ были получены из супранациональной референс-лаборатории в Швеции от проф. С. Хоффнера в рамках реализации программы внешней оценки качества лабораторных исследований.
С целью изучения распространенности лекарственной устойчивости МБТ в регионах Российской Федерации были изучены 2002 клинических штамма, полученных из 24 областных и краевых противотуберкулезных диспансеров, расположенных в основных географических регионах РФ. Культуры МБТ были собраны по мере их получения в региональной лаборатории по случайной выборке в объеме 60—100 штаммов в зависимости от размеров обслуживаемого региона, исходя из принципа 1 пациент — 1 культура. При этом 70% или основная часть культур МБТ принадлежали пациентам, впервые выявленным, леченным не более 1 мес.
В исследовании были отражены все основные федеральные округа РФ: Северо-Восток (Мурманск, Псков, Калининград) — 281 культура; Центральный федеральный округ (Москва, Брянск, Калуга, Владимир, Рязань, Смоленск, Воронеж, Ярославль) — 534 культуры; Поволжье (Нижний Новгород, Саратов, Самара, Волгоград) — 354 культуры; Южный федеральный округ (Ростов, Ставропольский и Краснодарский края) — 339 штаммов: Урал, Сибирь и Дальний Восток (Екатеринбург, Кемерово, Новосибирск, Иркутск, Красноярск, Якутск) — 494 культуры.
Основная часть культур клинических штаммов МБТ была получена при культивировании на среде Левенштейна-Йенсепа, и лекарственная чувствительность к рифампицину и изониазиду изучена стандартным методом абсолютных концентраций с определением роста микобактерий при критической концентрации 40 и 1 мкг/мл соответственно.
Определение лекарственной чувствительности 100 случайно выбранных культур МБТ методом пропорций проводили на агаре Миддлбрука 7H10 ("Difco") с критическими концентрациями рифампицина (3 мкг/мл) и изониазида (0,2 и 1 мкг/мл). Культуру считали устойчивой к препарату, если число МБТ, выросших на среде с препаратом, было выше 1%.
Пробоподготовка образцов и экстракция ДНК. Образцы ДНК выделяли из культур МБТ и образцов мокроты с помощью модифицированного метода R. Boom и соавт. [8] с использованием кремниевых частиц с магнитным ядром.

К полученному объему осадков (образцы мокроты) или суспензии клеток МБТ добавляли 2 объема 6 М раствора гуанидина тиоцианата и инкубировали при встряхивании 10 мин. Затем центрифугировали на микроцентрифуге при 12 000 об/мин в течение 3 мин. В супернатапт вносили 50 мкл магнитных кремниевых микрочастиц в концентрации 10 мг/мл. Инкубировали с микрочастицами при легком встряхивании в течение 15—20 мин. Частицы осаждали и отмывали дважды в 2,5 М растворе гуанидина тиоцианата с использованием специального магнитного штатива. Затем микрочастицы дважды отмывали в 70% растворе этанола и подсушивали при 60°С.
Элюировали ДНК с поверхности частиц 80 мкл дистиллированной воды при 60°С в течение 10 мин. Собирали водные растворы образцов ДНК и хранили при -20°С до использования.

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

Принцип метода состоит в использовании наряду с линейным флюорогенным ДНК-зондом (TaqMan) [17], детектирующим наличие ДНК МБТ, системы из 3 специальным образом сконструированных аллель-специфичных праймеров, меченных различными флюоресцентными метками на 5'-конце, комплементарных олигонуклеотиду, содержащему гаситель флюоресценции на 3'- конце. При отсутствии мутации в реакции срабатывают немеченные праймеры и линейный флюо- рогенный TaqMan-зонд. При наличии одной из мутаций в анализируемом фрагменте соответствующего гена встраивается аллель-специфичный праймер с освобождением гасителя, в результате чего фиксируется рост флюоресценции соответствующей метки, что регистрируется в соответствующем окне измерения флюоресценции. Таким образом, в одной пробирке наблюдается до 3 точек мутации.

Амплификацию проводили по программе: 10 мин — 94°С; 50 циклов:20 с — 94°С, 50 с — 58°С (rpoB) или 62°С (katG, inhA) с помощью прибора АНК-32 (Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург), обладающего возможностью измерения флюоресценции в 4 различных каналах.

Результаты и обсуждение.

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

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

Исследование панели из 20 штаммов МБТ с неизвестными характеристиками по лекарственной чувствительности, полученными из супранацио- нальной лаборатории проф. С. Хоффнера, проводили с помощью метода ПЦР-РВ по гену rpoB, а также по гену katG (устойчивость к изониазиду) и гену Emb306 (устойчивость к этамбутолу). При определении устойчивости к рифампицину были точно установлены 10 мутантных культур (8 мутаций в кодоне 526 и 2 мутации в кодоне 516), что означало выявление устойчивости с 100%

чувствительностью и 100% специфичностью. При определении устойчивости к изониазиду только по гену katG выявлено 12 мутантных культур из 16, что означало 75% уровень чувствительности при 100% специфичности. В дальнейшем устойчивость к изониазиду изучали не только по гену katG, но и по гену inhA. Определение устойчивости к этамбутолу позволило выявить 10 мутантных культур из 12 устойчивых (чувствительность 83%) при 100% специфичности. При исследовании 21 образца мокроты больных туберкулезом легких с массивным бактериовыделением были получены предварительные данные, совпадавшие с результатами культурального исследования, показавшие возможность применения этой технологии для анализа непосредственно клинических образцов. Однако чувствительность этого метода и методические особенности применения ПЦР-РВ для анализа образцов мокроты являются предметом дальнейших исследований.

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

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

В Северо-Западном федеральном округе выделяется Мурманск с наиболее высоким уровнем МЛУ — 27,1%. В среднем по Северо-Западу уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов составил 19,7%. В Центральном федеральном округе (8 областей) средний уровень МЛУ среди больных этой группы составил 20,4%, в Поволжском федеральном округе (4 региона) — 16,3%. В Южном федеральном округе ситуация наиболее неблагоприятная, поскольку средний уровень МЛУ для впервые заболевших составил 31,06%. При этом наибольший уровень МЛУ был в Краснодарском крае — 36%. Следует отметить, что этот регион мы изучали с наибольшим объемом выборки (150 штаммов), а собственные результаты хорошо оснащенной и квалифицированной региональной лаборатории совпадают с нашими данными в 91,6% случаев. Уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов по данным региональной лаборатории составляет 34% при исследовании той же группы штаммов. При исследовании 6 регионов Урала, Сибири и Дальнего Востока уровень МЛУ среди впервые диагностированных больных туберкулезом составил 24,4%. Среди этих субъектов РФ наиболее высокий уровень МЛУ отмечен по Свердловской области — 33,3%.

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

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

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

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

Таким образом, мы проанализировав 202 штамма МБТ, среди которых 1406 (70,2%) штаммов, полученных от впервые выявленных больных туберкулезом, и 596 штаммов, полученных от ранее леченных пациентов. Среди штаммов МБТ от впервые выявленных пациентов было обнаружено 308 штаммов с устойчивостью одновременно к рифампицину и изониазиду, т. е. МЛУ-штаммов, что составило 21,9%. Кроме того, еще 13% штаммов МБТ от впервые выявленных пациентов были устойчивыми к изониазиду. Среди штаммов МБТ от ранее

леченных пациентов (596) уровень МЛУ составил 58,5%, устойчивость к изониазиду была равна 19,8%. Из общего числа штаммов с устойчивостью к рифампицину всего у 3,5% штаммов эта устойчивость не сопровождалась устойчивостью и к изониазиду. Эти результаты в основном подтверждают сведения об устойчивости к рифампицину как суррогатному маркеру МЛУ.

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

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

J. Caoili и соавт. |9], используя модифицированный метод биочип-анализа, описывают при 100% специфичности 80% уровень чувствительности обнаружения лекарственной устойчивости. Объем исследований, проведенный методом микробиочипов, составил около 50—100 анализов. Более 1000 наших исследований с помощью ПЦР-РВ с использованием аллель-специфических флюорогенных зондов при сопоставлении с традиционным в России методом абсолютных концентраций демонстрировали в среднем 94% совпадений определе- ния устойчивости к изониазиду и рифампицину. Результаты анализа 100 штаммов, изученных методом пропорций и ПЦР-РВ, совпадали в 100% случаев с данными анализа устойчивости к рифампицину и в 99% — анализа устойчивости к изониазиду. Специфичность ПЦР-РВ составила 100%. Метод ПЦР-РВ отличается использованием закрытой системы анализа, предотвращающей внутрилабо- раторную контаминацию ампликонами ДНК [15]. Различные технологии ПЦР-РВ с флюорогенными ДНК-зондами (молекулярные биконы, зонды типа TaqMan и флюоресцентные зонды на основе резонансного переноса энергии) были использованы для определения единичных мутаций нуклеотидных последовательностей генов гроВ и katG, ответственных за чувствительность к рифампицину и изониазиду [12]. Результаты анализа определяли по смещению пиков температуры плавления 2-цепо- чечных ампликонов. При этом была изучена чувствительность обнаружения мутаций при исследо- вании смешанных аллелей ДНК (мутантной и чувствительной), которая была достаточной для определения мутаций при соотношении аллелей 1:14. В нашей работе при исследовании различных соотношений устойчивых и чувствительных клеток МБТ была показана возможность детекции 1% устойчивых МБТ в смешанной популяции.

Espasa и соавт. [11] при использовании в ПЦР- РВ 6 пар флюорогенных ДНК-зондов для анализа мутаций в 4 кодонах гена гроВ (513, 516, 526 и 531), 2 мишеней в кодоне 315 гена katG и замены С209Т регуляторного гена inhA была установлена чувствительность определения лекарственной устойчивости при концентрации суспензии МБТ 1,5 • 103 клеток в 1 мл, а при исследовании образцов мокроты — 30—35% образцов при отрицательном результате мазка и 95—99% при положительном результате мазка. Общая чувствительность определения имеющихся мутаций в анализируемых образцах составила 74,3%. Секвенирование 138 изолятов по генам katG и inhA в работе Van Doom и соавт. [20] обеспечивало обнаружение 89,5% устойчивых к изониазиду штаммов.

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

По данным А. Е. Полякова и соавт. [3], при определении мутаций методом микробиочипов в 74,3% штаммов МБТ с МЛУ обнаруживались мутации в Ser531—Leu, а в 97,4% штаммов — katG315. Однако при изучении устойчивых к изониазиду штаммов МБТ в Нидерландах [12] лишь у 55% таких изолятов была обнаружена мутация katG315. По данным Van Solingen и соавт. [21], мутации katG315 обнаруживались в штаммах с высоким уровнем устойчивости к изониазиду. В наших исследованиях мутации katG315 обнаруживались при устойчивости к 1 мкг/мл и зониазида на среде Левенштейна-Йенсена, тогда как при концентрации 10 мкг/мл штаммы (20 изученных культур) с мутацией katG315 были чувствительными. По материалам M. Ruiz и соавт. 119[, штаммы, устойчивые только к 0,1 мкг/мл изониазида, были чувствительными при исследовании методом ПЦР-РВ. Мы полагаем, что в клинической практике критерий устойчивости к критической концентрации 1 мкг/мл является достаточным для принятия решения о замене препарата, назначаемого пациенту.

Выводы.

1. Разработан новый молекулярно-генетический метод быстрого определения лекарственной устойчивости МБТ в клинических штаммах и образцах мокроты на основе мультиплексной аллельспеци- фической ПЦР-РВ; метод отличается относительной технологической простотой и по предварительным расчетам не превышает стоимость традиционного определения лекарственной чувствительности МБТ.
2. Совпадаемость результатов ПЦР-анализа и культурального микробиологического исследования 1092 клинических штаммов, анализированных в 11 региональных лабораториях, в среднем составила 94%; совпадаемость результатов повторного тестирования в независимой лаборатории случайно избранных 100 штаммов МБТ культуральным методом пропорций составила 99% для изониазида и 100% для рифампицина.
3.При анализе распространения лекарственной устойчивости к рифампицину и изониазиду в 24 субъектах различных географических зон РФ установлен в среднем очень высокий уровень распространения штаммов МБТ с МЛУ среди впервые выявленных больных туберкулезом — 21,9%. Кроме того, у 13% больных этой группы установлены также лекарственная устойчивость к изониазиду. Моноустойчивость к рифампицину обнаружена лишь у 3,5% штаммов МБТ с лекарственной устойчивостью. В штаммах, полученных от больных, ранее леченных, либо от пациентов с хроническим течением туберкулеза, МЛУ установлена в 58,5% случаев, устойчивость только к изониазиду — в 19,8% случаев. Лишь в 2 территориях (Москва и Волгоград) уровень МЛУ среди вновь выявленных пациентов был относительно невысоким — 6,6 и 7,7% соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балабанова Я. М., Рэдди М., Грэмм К. и др. Анализ факторов риска возникновения лекарственной устойчивости у больных туберкулезом гражданского и пенитенциарного секторов в Самарской области // Пробл. туб. — 2005. — № 5. —С. 25-3!...
2. Михайлович В- М., Лапа С. А., Грядупов Д. А. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТБ-микробиочипе для обнаружения рифампицин- резистентных штаммов Mycobacterium tuberculosis // Бюл. экспер. биол. — 2001. — Т. 131, № 1. — С. 112—117.

3.Поляков А. Е., Сафонова С. Г., Скотпикова О. И. Определение множественной лекарственной устойчивости M. tuber culosis различными методами jl Пробл. туб. — 2006. — № 6.- С. 40-42.
4. Скотникова О. И., Носова Е. Ю., Галкина К. Ю. Определение множественной лекарственной устойчивости M. tuberculosis молекулярно-биологическими методами: Метод, рекомендации // Пробл. туб. — 2006. — № 7. — С. 57—60.
5. Фирсова В. А., Полуэктова Ф. Г., Кузьмин А. В., Черноусова Л. Н. Роль метода биологических микрочипов в определении устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину у подростков с активным туберкулезом легких // Пробл. туб. - 2006. - № 8. - С. 28-30.
6. Bang D., Bengard Andersen A., Thomsen V. O. Rapid genotypic detection of rifampin- and izoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis directly in clinical specimens // J. Clin. Microbiol.- 2006. - Vol. 44, N 7. - P. 2605-2608.
7. Boom R., Sol C. A., Salimans M. M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids j I J. Clin. Microbiol. — 1990. - Vol. 28. - P. 495-503.
8. Brossier P., Veziris N., Truffot-Pernot C. et al. Perfomance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of Mycobacterium tuberculosis with low- and high-level resistance // J. Clin. Microbiol. — 2006. - Vol. 44, N 10. - P. 3659-3664.
9. Caoili J. C., Mayorova A., Sikes D. et al. Evaluation of the TB- Biochip oligonucleotide microarray system for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. - 2006. - Vol. 44, N 7. - P. 2378-2381.
10. Espasa, Gonzalez-Martin Julian, Alcaide Fernando et al. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and ri-fampicin using fluorogenic probes // J. Antimicrob. Chemother.- 2005. - Vol. 55, N 6. - P. 860-865.
11. Garcia de Viedma D., del Sol Diaz Inf antes M., Lasala F. et al. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol.- 2002. - Vol. 40. - P. 988-995.
12. Herrera-Leon Laura, Molina Tamara, Saiz Pilar et al. New Multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates // Antimicrob. Agents Chemother. - 2005. - Vol. 49, N 1. - P. 144-147.
13. Jureen P., Engstrand L., Eriksson S. et al. Rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis by Pyrose- quencing technology // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44, N 6. - P. 1925-1929.
14. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A. et al. PCR-bascd methodology for detecting multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis Beijing family circulating in Russia // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2003. — Vol. 22. — P. 342—348.
15. Parashar D., Chauhan D. S., Sharma V. D., Katoch V. M. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research I I Indian J. Med. Res. — 2006. — Vol. 124. — P. 385— 398.
16. Ramaswamy S., MusserJ. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update //Tuberc. Lung Dis. — 1998. — Vol. 79, N 1. — P. 23—29.
17. Ruiz M., Torres M. J., Llanos A. C. et al. Direct detection of rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tiberculosis in auramine-rhodamine-positive sputum specimens by real-time PCR // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — N 4. — P. 1585-1589
18. Augustynowicz-Kope Ewa, Sekiguchi Jun-ichiro, Miyoshi-Akiyama Tohru et al. Detection of multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. — 2007. — Vol. 45, N 1. — P. 179-192.
19. Torres M. J., Criado A., Palomares J. C., Aznar J. Use of realtime PCR and fluorimetry for rapid

detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis//J. Clin. Microbiol. — 2000. — Vol. 38. — P. 3194— 3199.
20. van Doom H. R., de Haas P. E., Kremer K. et al. Public health impact of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains with a mutation at amino-acid position 315 of katG: a decade of experience in The Netherlands // Clin. Microbiol. Infect. — 2006, - Vol. 12, N 8. - P. 769-775.
21. Mycobacterium tuberculosis // J. Clin. Microbiol. — 2007. — Vol. 45, N 1. - P. 179-192.
22. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report N 3. (WHO/CTS/TB/2004). — Geneva, 2004.
23. Yesilkaya Hasan, Meaca Francesca, Niemann Stefan et al. Eval- H uation of molecular-beacon, TaqMan, and fluorescence resonance energy transfer probes for detection of antibiotic resistance-conferring single nucleotide polymorphisms in mixed Mycobacterium tuberculosis DNA extracts //J. Clin. Microbiol. — 2006. - Vol. 44, N 10. - P. 3826-3829.

РЕЗЮМЕ.

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

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