

Міністерство охорони здоров'я України
Буковинська державна медична академія

БУКОВИНСЬКИЙ
МЕДИЧНИЙ
ВІСНИК

Український науково-практичний журнал
Заснований у лютому 1997р.

ТОМ 7

№ 3

Редакційна колегія:

головний редактор В.П.Пішак

Ю.Т. Ахтемійчук, Л.О. Безруков, Т.М. Бойчук, О.І. Волошин, А.Г. Іфтодій, В.О. Калугін, М.Ю. Коломоець (заступник редактора), Р.Б. Косуба, І.Ф. Мещишен, В.Ф. Мислицький, Р.В. Сенютович, І.Й. Сидорчук (перший заступник редактора), В.К. Тащук (відповідальний секретар), О.І. Федів (відповідальний секретар), Г.І. Ходоровський, О.М. Юзько

Наукові рецензенти: проф. Р.Б. Косуба, проф. І.Ф. Мещишен,
проф. О.М. Юзько

Одеський
медичний інститут
БІБЛІОТЕКА

Чернівці: БДМА, 2003

<i>Пішак В.П., Ярмольчук С.Г.</i> Відстрочене визначення сечовини в цільній крові та її компонентах	128
<i>Самура И.Б.</i> Сравнительная оценка поведенческих реакций замещенных 7-ацилалкил-8-галоген-3-метилксантина	131
<i>Халатурник Г.М.</i> Анатомічні особливості IV шлуночка головного мозку та окремих його структур у плодів та новонароджених людини	135

НАУКОВІ ОГЛЯДИ

<i>Николаевский В.В., Бажора Ю.И.</i> Выявление лекарственной устойчивости микобактерий молекулярно-генетическими методами	137
<i>Сидорчук Л.П., Казанцева Т.В., Хомко О.Й., Горук І.В., Кеца В.І.</i> Дисметаболический постменопаузальный синдром	144
<i>Юзько О.М., Філюк-Аджімі О.Й., Лантєва Т.А.</i> Генітальний герпес: особливості перебігу вагітності, стан плода та новонародженого	

ДИСКУСІЙНІ СТАТТІ

<i>Таралло В.Л., Горський П.В.</i> До визначення умов реалізації в Україні політики ВООЗ для Європейського регіону “Здоров’я-21”: бажані цілі та орієнтири	155
<i>Чебан В.І.</i> Євгенічна профілактика порушень спадкового здоров’я та популяційного репродуктивного розвитку	160

ЛЕКЦІЇ

<i>Іващук С.І.</i> Лікування та профілактика синдрому діабетичної стопи у практиці сімейного лікаря	164
<i>Ляшук П.М.</i> Актуальні проблеми діабетології	168

ОБМІН ДОСВІДОМ

<i>Биць Ю.В., Мілерян В.С.</i> Психолого-педагогічна післядипломна освіта професорсько-викладацького складу медичних ВНЗів України: системний підхід	172
<i>Іфтодій А.Г., Білик О.В., Мороз О.М.</i> Хірургічне лікування порушень серцевого ритму в Чернівецькій області	175
<i>Тучкина И.А.</i> Опыт работы организационно-медицинской системы выбора метода подростковой контрацепции	

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

<i>Ковешников В.Г., Маврич В.В., Каценко С.А.</i> Алгоритм остеометрического исследования	180
---	-----

СТОРІНКИ ІСТОРІЇ

<i>Власик Л.І., Фундюр Н.М., Жуковський О.М., Прунчак І.Ф., Грачова Т.І.</i> Історія становлення та розвитку кафедри гігієни та екології	187
<i>Плеш І.А., Гайдуков В.А., Хомко О.Й., Каленюк В.І.</i> Історія становлення та розвитку кафедри догляду за хворими та вищої медсестринської освіти	192
Зміст	195

УДК 578.81:575.113:615.03:616-07

В.В. Николаевский, Ю.И. Бажора

ВЫЯВЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Одесский государственный медицинский университет

Резюме. В работе проанализированы современные данные мировой литературы о молекулярно-генетических основах возникновения лекарственной устойчивости микобактерий к антитуберкулезным препаратам, а также генетические методы определения их лекарственной чувствительности.

Ключевые слова: микобактерии, резистентность, гены, генетические методы.

Введение. В настоящее время в Украине, как и большинстве стран мира, наблюдается значительный рост заболеваемости туберкулезом и другими заболеваниями, вызванными микобактериями. Эпидемия туберкулеза в Украине зарегистрирована с 1995 г. Согласно последним данным литературы [1], заболеваемость всеми формами туберкулеза в Украине за последние 10 лет увеличилась в 2,1 раза и в 2001 году составила 68,6 случая на 100 000 населения. Особенно высокие показатели заболеваемости наблюдались в южных и юго-восточных областях страны. Заболеваемость туберкулезом в России в 1999 г. составила 85,2 случая на 100000 населения и продолжает увеличиваться [2].

Следует отметить, что рост заболеваемости туберкулезом вызывает растущую обеспокоенность здравоохранения и в развитых странах мира, еще недавно считавшихся благополучными в этом отношении. Так, например, рост заболеваемости отмечен в таких странах, как США, Нидерланды и Япония, несмотря на сохраняющиеся сравнительно низкие уровни заболеваемости (6,4 на 100000; 9,5 на 100000; 34,8 на 100000 соответственно в 1999 году) [3]. В Великобритании в 1995-2002 гг. отмечен значительный рост туберкулеза, причем в ряде районов Лондона заболеваемость превышает таковую в Индии, составляя около 200,0 на 100000 населения. Во всем мире ежегодно от туберкулеза умирает около 3 млн. человек. К сожалению, даже достаточно оптимистические прогнозы предполагают рост заболеваемости в большинстве стран мира по меньшей мере в течение последующих 10-15 лет, за это время от туберкулеза может умереть более 30 млн. человек [4].

Одной из важнейших причин значительного роста заболеваемости туберкулезом в последнее время является широкое распространение лекарственно-устойчивых форм микобактерий [5, 6]. Основным недостатком используемых в настоящее время бактериологических методов выявления устойчивости является их длительность, малая надежность и эффективность, а также отсутствие унифицированных подходов, что нередко не позволяет сравнивать данные, полученные в различных лабораториях.

По мнению многих авторов [7-10], молекулярно-генетические методы являются весьма эффективными и достаточно универсальными в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний, в том числе туберкулеза и микобактериозов. При этом на их выполнение тратится, как правило, в несколько раз меньше времени, чем на рутинные исследования, а чувствительность может превышать последние на несколько порядков. Использование молекулярно-генетических методов для выявления лекарственной чувствительности возбудителей туберкулеза является одним из наиболее перспективных подходов в общей стратегии лабораторной диагностики туберкулеза.

В течение примерно 20-30-летнего периода, начиная с открытия противотуберкулезного действия стрептомицина (1944), изониазида и пипразинамида

(1952), в большинстве развитых стран мира, включая бывший Советский Союз, наблюдалось значительное снижение заболеваемости туберкулезом и развития устойчивости практически не отмечалось [11]. Однако, с середины восьмидесятых годов отмечен рост количества резистентных и мультирезистентных штаммов, доля которых к настоящему времени достигла пугающих показателей. К сожалению, развитие устойчивости к антибактериальным препаратам является неизбежной платой за их использование. Как было очень точно отмечено S.B.Levy [12], вопросом при этом является не “как” и “при каких условиях”, а “когда – раньше или позднее” разовьется устойчивость.

Именно развитие устойчивости к препаратам является одной из основных причин роста заболеваемости и снижения эффективности лечения, т.к. эффективными в отношении микобактерий являются достаточно ограниченное число химических соединений. По данным многих авторов, доля штаммов с первичной мультирезистентностью составляет 14-20%, а вторично мультирезистентных штаммов – 50% и более [13, 14]! К сожалению, достаточно высокие показатели устойчивости характерны в том числе для России и большинства бывших республик Советского Союза [15-18]. В Украине распространенность резистентных и полирезистентных штаммов *M.tuberculosis* изучена слабо. По немногочисленным оценкам, первичная резистентность колеблется от 14 до 40%, вторичная – до 75% и более, причем в последние годы отмечается быстрый рост количества полирезистентных штаммов [19, 20]. Во многих работах отмечается необходимость крупномасштабных исследований этой проблемы [1, 19, 20].

Молекулярно-генетические основы возникновения лекарственной устойчивости микобактерий

Молекулярные механизмы развития устойчивости микобактерий к анти-туберкулезным препаратам к настоящему времени изучены недостаточно. Установлено, однако, что в формирование устойчивости к основным препаратам вовлечены не менее 11 генов микроорганизма, ответственных либо за активацию препаратов *in vivo*, либо являющихся мишенями последних [21].

К первой группе принадлежат, в частности, изониазид и этионамид, являющиеся ингибиторами синтеза компонентов клеточной стенки микобактерий, прежде всего миколовых кислот. Указанные препараты представляют собой пролекарства, активизирующиеся *in vivo* с помощью фермента каталаз-пероксидазы – продукта экспрессии гена *katG*. Одной из мишеней активированного соединения является ген *inhA* ответственный за синтез еноил-редуктазы, участвующей в синтезе компонентов клеточной стенки. Многочисленными исследованиями показано, что возникновение мутаций в обоих указанных генах может вести к развитию устойчивости к изониазиду за счет экспрессии мутантных белков. При этом не происходит активации препарата либо он не связывается с мишенью [11]. Мутациями в гене *katG* обладают не менее 70%, а мутациями в гене *inhA* – около 10% фенотипически устойчивых к изониазиду штаммов микобактерий [21]. Рядом исследований доказано участие еще одного гена – *ahpC* в развитии устойчивости к изониазиду.

Установлено, что развитие устойчивости микобактерий к следующему препарату этой же группы – пипразинамиду – также обусловлено тем, что последний, являясь пролекарством, нуждается в активации при попадании в организм человека путем гидролиза с участием специфической амидазы. Однако лишь в последнее время было показано, что у 72-97% устойчивых к пипразинамиду штаммов наблюдаются мутации в гене *pncA*, при этом наиболее часто встречаются одиночные замены нуклеотидов в кодонах 138, 141, 162 и 288, а также, гораздо более редко – вставки и делеции нуклеотидов [22, 23].

Ко второй группе препаратов относится стрептомицин и рифампицин. Природа возникновения резистентности к стрептомицину у микобактерий отличается от таковой у большинства бактерий и по меньшей мере в 60% случаев обусловлена мутациями в генах *rpsL* и *rrs*, кодирующих рибосомальные белки и 16SPHK, являющиеся мишенью препарата.

Особенно важным в клиническом отношении является выявление устойчивости к рифампицину – одному из наиболее эффективных противотуберкулезных препаратов, активно применяемому в современных краткосрочных курсах химиотерапии согласно стратегии DOTS. Широкое и нередко бесконтрольное применение этого препарата привело к значительному росту устойчивости, которая более чем в 70% случаев сочетается с устойчивостью к изониазиду и другим препаратам, что дает возможность использовать ее в качестве маркера полирезистентности.

К настоящему времени исследованиями Levin и Hatfull установлено, что специфической мишенью рифампицина является β -субъединица РНК-полимеразы микобактерий. Таким образом, при действии рифампицина на бактериальную клетку нарушаются процессы транскрипции, а именно – элонгации РНК, что прерывает процесс биосинтеза белка. Мутации в гене *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы, ведут к изменениям конформации фермента, что вызывает невозможность присоединения препарата и, таким образом, к резистентности.

Подавляющее большинство мутаций, обуславливающих устойчивость к рифампицину, сосредоточено в относительно коротком высококонсервативном участке гена *rpoB* длиной 81 п.н., кодирующем аминокислоты 511-533. Наиболее частыми типами мутаций (93% от общего количества) являются одиночные замены нуклеотидов, ведущие к заменам аминокислот, гораздо более редко встречаются вставки (3%) и делеции (4%). Чаще всего замены нуклеотидов наблюдались в позициях 526 (гистидин) и 531 (серин) аминокислот. Таким образом, более 95% фенотипически устойчивых к рифампицину штаммов *M.tuberculosis* являются мутантами по гену *rpoB*. Следует указать, однако, что географическая распространенность и частота мутаций в различных регионах мира отличается. Так, российские исследователи указывают, что по результатам исследования 52 резистентных к рифампицину штаммов в 98% случаев были обнаружены мутации гена *rpoB*, причем наряду с широко распространенными мутациями триплетов 526 и 531 была установлена высокая частота мутации 516-го триплета, а в одном из устойчивых штаммов мутаций не обнаружено [24]. В целом следует отметить, что в этом отношении штаммы микобактерий туберкулеза на территории стран СНГ, и, в частности, Украины, остаются мало, либо совершенно неизученными.

Генетические основы механизмов развития устойчивости к этамбутолу остаются малоизвестными. Как было показано в 1989 г. исследованиями Takayama et al., механизм действия этамбутола основан на его способности ингибировать синтез арабиногалактанов, что нарушает образование клеточной стенки микобактерий. Последними исследованиями установлено, что в развитии устойчивости к этамбутолу причастны гены комплекса *emb*, принимающие участие в синтезе ферментов – арабинозилтрансфераз. По данным Ramaswamy et al., более 68% устойчивых к этамбутолу штаммов обладают единичными заменами нуклеотидов в гене *embB* [25], однако, по-видимому, существуют и иные механизмы развития устойчивости.

С 1984 г. в качестве противотуберкулезных препаратов ограниченно применяются фторхинолоны (в частности, норфлоксацин и ципрофлоксацин). При попадании в бактериальную клетку они вызывают нарушения суперспирализации ДНК, однако до сих пор точно не установлено, действуют ли они на саму молекулу ДНК либо на ферменты ДНК-гиразы (топоизомеразы ДНК II типа). В развитии устойчивости к фторхинолонам большую роль играют мутации в гене *gyrA*, продуктом которого и является ДНК-гираза. У большинства (более 90%) устойчивых штаммов наблюдаются в 88, 94 и 122 кодонах данного гена.

Механизмы развития устойчивости к препаратам 2-3 ряда, к которым относятся, в частности, ряд аминогликозидов, и другим, к настоящему времени не выяснены.

Таким образом, можно считать установленным, что важнейшим механизмом возникновения устойчивости к противотуберкулезным препаратам у микобактерий является наличие мутаций в различных генах бактериальной хромосомы. В этом проявляются значительные отличия микобактерий от многих других микроорганизмов, у которых развитие устойчивости связано с плазмидами и другими внехромосомными элементами.

Выявление устойчивости к антимикробным препаратам играет огромную роль в клинической микробиологии, в первую очередь для назначения оптимальной терапии, а также для выявления распространенности устойчивых штаммов микроорганизмов. В связи с медленным ростом микобактерий традиционные бактериологические методы выявления их чувствительности требуют не менее 10-12 недель. Вот почему в последние 8-10 лет именно микобактерии стали основным объектом разработки и применения молекулярно-генетических методов, основанных на изучении их нуклеиновых кислот.

Молекулярно-генетические методы определения лекарственной чувствительности микобактерий

Для выявления мутаций, обуславливающих резистентность микобактерий, разработаны молекулярно-генетические методы, основанные на нескольких различных подходах [26]:

1. Методы, основанные на секвенировании участков генов;
2. Методы, основанные на амплификации специфичных участков генов (различные модификации ПЦР);
3. Методы, основанные на гибридизации;
4. ДНК-чипы;
5. Методы, основанные на выявлении полиморфизма ДНК-последовательностей;
6. Молекулярные биконы;
7. Иные подходы.

Следует отметить, что данное деление весьма условно, так как на практике очень часто несколько методов сочетаются и дополняют друг друга. Кроме того, практически во всех подходах в качестве первого этапа исследования выступает амплификация фрагмента гена, в котором могут быть найдены мутации, обуславливающие развитие резистентности.

1. Секвенирование участков генов, ответственных за развитие устойчивости

Одним из наиболее универсальных подходов к выявлению мутаций, ответственных за развитие лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, является секвенирование, т.е. определение нуклеотидной последовательности участка гена. Как правило, в клинической микробиологии применяется дидеокси-метод секвенирования по Сангеру. Исследованиями Kierpiela P. et al [27] показана высокая чувствительность метода при выявлении мутаций в гене *rpoB*, обуславливающих устойчивость к рифампицину [27]. В комплексных работах Nachamkin I. et al [28] и Bifani P. et al [29] посвященных молекулярно-генетическим методам выявления полирезистентности, установлена практически стопроцентная чувствительность и специфичность секвенирования при исследовании гена *rpoB*, и достаточно высокая (99% и 67,7% соответственно) при выявлении устойчивости к стрептомицину путем секвенирования гена *rpsL*.

В работах российских исследователей [24, 30] отмечается преимущество прямого секвенирования участков гена *rpoB* перед остальными методами, в частности, гибридизационными. В данных работах впервые приводятся данные о распространенности различных типов мутаций в гене *rpoB* в России. Несколько дискуссионными, однако, представляются утверждения авторов о возможности широкого применения секвенирования в лабораториях лечебных учреждений.

В целом, по-видимому, следует сделать вывод о том, что секвенирование является наиболее универсальным и чувствительным методом молекулярно-генетической диагностики лекарственной устойчивости микобактерий, так как позволяет выявить практически все, даже наиболее редкие мутации. С другой стороны, высокая стоимость и необходимость строжайшего соблюдения технологии ограничивают широкое, в том числе клиническое применение секвенирования.

2. Амплификационные методы выявления резистентности

Обширная и достаточно широко используемая в клинической лабораторной диагностике группа методов выявления устойчивости основана на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР давно и прочно завоевала одно из ведущих мест в экспресс-диагностике туберкулеза и видоидентификации возбудителя в различном клиническом материале. Сравнительно недавно разработаны и внедряются специальные разновидности ПЦР для детекции мутаций в генах, ответственных за развитие резистентности.

Наиболее часто для выявления мутаций, ответственных за развитие резистентности, применяется PCR-SSCP (PCR-single strand conformation polymorfism), при этом амплифицированный фрагмент предварительно подвергается денатурации, а затем исследуется в неденатурирующем полиакриламидном геле. В этих условиях подвижность получившихся одноцепочечных участков ДНК зависит не только от молекулярной массы, но и от их нуклеотидной последовательности, что позволяет детектировать мутации. Как показано в работах K. Hayashi, данный метод позволяет выявить более 90% однонуклеотидных замен в исследуемом участке. Позднее рядом исследователей были проведены работы по детекции мутаций в генах *rpoB* и *katG*, которые убедительно показали высокую чувствительность данного метода и возможность идентификации практически всех известных мутаций. Более того, в исследовании Whelen et al. показана возможность одновременной идентификации возбудителя туберкулеза и определения его чувствительности к рифампицину в клиническом материале, что открывает путь к экспресс-выявлению мутаций.

Существенными недостатками метода PCR-SSCP являются особо высокие технологические требования, предъявляемые к лабораторному оборудованию и условиям электрофореза. В связи с этим рядом исследователей были предложены видоизменения и дополнения к данному методу, например, использование специфических нуклеаз [31] либо дополнительных циклов ПЦР со специальными праймерами, повышающие надежность данного метода.

Оригинальным методом выявления мутаций, обуславливающих лекарственную устойчивость, является использование для амплификации фрагментов генов *groV* либо *katG* пар перекрывающих друг друга праймеров. При этом 5'-конец одного из них может быть помечен флуоресцентной меткой. При обнаружении нуклеотидной замены в гене специально подобранная экзонуклеаза (Cleavage VIII из *Archaeoglobus fulgidus*) обеспечивает отрыв участка праймера со стороны 5'-конца, что может быть обнаружено при электрофорезе в денатурирующем полиакриламидном геле, либо хемилюминесцентными методами [32]. Особенностью данного подхода является возможность обнаружения устойчивых микроорганизмов в популяции чувствительных штаммов, что особенно важно в клинике.

3. Гибридизационные методы выявления лекарственной чувствительности

Методы этой группы относительно немногочисленны, однако важно отметить, что благодаря высокой надежности и относительной простоте технологии именно они реализованы в настоящее время в ряде коммерческих наборов и достаточно широко применяются в практической диагностике и очень активно совершенствуются. Основой всех гибридизационных методов, как правило, является комплементарное связывание двух одноцепочечных участков ДНК – фрагмента ДНК исследуемого организма и искусственно синтезированного зонда, идентифицирующего искомую последовательность. Однако, в последнее время наиболее широкое применение нашли так называемые assays – т.е. наборы из нескольких проб, сорбированных на мембране. Именно на таком принципе основан коммерческий набор для выявления устойчивости к рифампицину “InnoLiPA” (“Innogenetics”, Бельгия). При этом вначале выполняется амплификация участка гена *groV* с помощью биотин-меченых праймеров, а затем продукты амплификации гибридизируются с олигонуклеотидными зондами, сорбированными на мембране (dot hybridization). Результат гибридизации фиксируется визуально благодаря применению системы стрептавидин-щелочная фосфатаза для выявления биотин-меченых продуктов на мембране. Набор, таким образом, позволяет идентифицировать *M.tuberculosis* в культуре или непосредственно в клиническом материале и определить устойчивость к рифампицину в течении нескольких часов.

В многочисленных публикациях [27, 33, 34], посвященных применению указанных наборов, и сравнению эффективности метода гибридизации с молекулярно-генетическими и бактериологическими методами, показано, что применение наборов “Inno-LiPA” позволяет выявить до 90-95% и более резистентных по данным бактериологических методов штаммов микобактерий. Принимая во внимание относительную простоту, экспрессность и эффективность метода, можно сделать вывод о значительных перспективах его использования в клинической микробиологии. В настоящее время в ряде лабораторий разрабатываются гибридизационные методы для выявления полирезистентных штаммов.

4. Применение молекулярных чипов

Одними из новейших достижений техники гибридизации являются ДНК-чипы. Фактически они представляют собой наборы из огромного количества ДНК-проб (олигонуклеотидов), размещенных на твердых носителях – стекле, силиконе или нейлоне. Разновидностями ДНК-чипов являются DNA arrays, в которых в качестве проб используются фрагменты кДНК. Исследуемый фрагмент ДНК-мишени, как и в других методах гибридизации, метится флуоресцентной меткой. Детекция результатов гибридизации производится с помощью люминесцентных микроскопов [35]. ДНК-чипы обладают огромными возможностями в скрининге многих ДНК-последовательностей большого количества образцов, при этом одновременно можно проводить идентификацию видов и штаммов микроорганизмов, их устойчивости к препаратам и других клинически важных признаков. Уже имеются сообщения об успешном применении биочипов в анализе резистентности к рифампицину [36]. В настоящее время в Институте фтизиопульмонологии ММА им. И.Сеченова (Москва, Россия) ведется активная разработка технологии биочипов для диагностики туберкулеза и получены обнадеживающие результаты [37].

Однако, применение многообещающей технологии ДНК-чипов пока что сдерживается очень высокой стоимостью и технологическими трудностями.

5. Выявление полиморфизма в генах, ответственных за развитие устойчивости

Для детектирования ряда мутаций в генах *katG*, *rsIP* и *rpoB* могут использоваться методы выявления полиморфизма ДНК, в частности, ПДРФ (полиморфизма длин рестрикционных фрагментов). Они основаны на предварительной рестрикции ДНК микобактерий рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами), например, *MspI* с последующим переносом фрагментов ДНК на мембрану и гибридизацией с определенным ДНК-зондом. Наилучшими и наиболее широко применяемыми зондами для изучения микобактерий являются фрагменты повторяющихся (многокопийных) последовательностей, например IS6110, случайно распределенных по геному микобактерий в количестве от 1 до 15-20 и более. Наиболее часто ПДРФ применяется для эпидемиологической характеристики штаммов возбудителей туберкулеза [38, 39]. Однако ряд мутаций в указанных генах могут вести к изменению сайтов рестрикции, что ведет к изменению количества либо длины фрагментов. Как отмечается в ряде работ [28, 40], чувствительность метода является достаточно низкой (от 28,1 до 40%), в связи с невозможностью регистрации многих типов мутаций. Таким образом, ПДРФ лишь ограниченно может применяться для определения химиорезистентности микобактерий.

6. Использование молекулярных биконов

Одним из наиболее интересных и перспективных направлений является использование молекулярных биконов, позволяющих оценить результат анализа в реальном времени по возникновению флюоресценции, без проведения электрофореза [41, 42]. Молекулярные биконы представляют собой ДНК-зонды особой структуры в виде шарика со шпилькой, на конце которой имеется флюорофор и молекула-гаситель флюоресценции. При нахождении соответствующего участка ДНК происходит гибридизация зонда с мишенью, шпилечная структура разрушается, гаситель физически отделяется от флюорофора, который инициирует флюоресценцию [43]. Разновидностью бикона является "Scorpion" праймер, в котором праймер, ДНК-зонд и флюорофор представляют собой единое целое [44]. Применение "разноцветных" биконов с флюорофорами различных цветов позволяет выявлять различия в ДНК-мишенях, что и может быть использовано в дифференцировке различных ДНК-последовательностей, в частности, для выявления мутаций в генах устойчивости.

Из иных подходов к выявлению резистентности микобактерий следует отметить метод, основанный на детекции мутаций путем регистрации несовпадений (*mismatches*) при ренатурации фрагментов РНК-зонда и исследуемой РНК микобактерий, реализованный в коммерческом наборе "MisMatch" [45], а также методы определения устойчивости с помощью микобактериофагов [46], демонстрирующие достаточно высокую чувствительность и эффективность.

Таким образом, следует отметить, что предложено достаточно большое разнообразие методов молекулярно-генетической диагностики устойчивости микобактерий к лекарственным препаратам. Многие из них в настоящее время активно применяются не только в исследовательских целях, но и для практической лабораторной диагностики. При этом несомненными преимуществами молекулярно-генетической диагностики является недостижимая для традиционных методов скорость и эффективность, возможность быстрого выявления полирезистентных штаммов. С другой стороны, эффективность применения таких подходов во многом зависит от преобладания тех или иных мутаций в конкретных географических и эпидемиологических условиях [27, 30]. В связи с этим, как отмечает ряд авторов, необходимо углубленное молекулярно-генетическое исследование штаммов микобактерий, преобладающих в данной местности, регионе и т.д. В этом смысле штаммы, циркулирующие на территории СНГ, и, в частности Украины, остаются совершенно неисследованными. Одной из немаловажных причин этого является достаточно высокая стоимость ДНК-диагностики, отсутствие необходимого оборудования и квалифицированного персонала. Нет сомнения, тем не менее, что существует острая необходимость скорейшего внедрения современных молекулярно-генетических методов диагностики лекарственной устойчивости микобактерий в практику здравоохранения.

Литература. 1. Феценко Ю.І. Мельник В.М., Кобилянська А.В. Основні тенденції динаміки статистичних показників з туберкульозу в Україні за останні 10 років // Укр. пульмонолог. ж. – 2000. – №4. – С.5–9. 2. Perelman M.I. Tuberculosis in Russia // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2000. – V.4. – 12. – P.1097–

1103. 3. Mori T. Recent trends in Tuberculosis, Japan // *Emerging Infectious Diseases*. – 2000. – V.6, №6. – P.566–568. 4. Small P.M. Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 1999. – V.3, №11. – P.949–955. 5. Мельник В.М., Дорошенко П.М. Основні епідеміологічні аспекти легеневого та позалегового туберкульозу в Україні // *Ж. практ. лікаря*. – 1999. – №2. – С.2–5. 6. Frieden T.R., Lemer B.H., Rutherford B.R. Lessons from the 1800s: tuberculosis control in the new millennium // *The Lancet*. – 2000. – V.355. – P.1088–1092. 7. Watterson S.A., Drobniowski F.A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections // *J. Clin. Pathol.* – 2000. – V.53. – P.727–732. 8. Значення молекулярно-біологічних методів в діагностиці мочеполового туберкульозу / Муқанбаев К., Владимирский М.В., Шипина Л.К., Александров А.А. // *Пробл. туберкульоза*. – 2001. – №4. – С.40–42. 9. Выявление микобактерий туберкулеза различными методами / Скрыгина Е.М., Залушкая О.М., Рот А.И. и др. // *Пробл. туберкулеза*. – 2001. – №3. – С.56–58. 10. Малюта С.С. Молекулярно-генетичні дослідження в діагностиці хвороб людини // *Лікування та діагностика*. – 2001. – №3. – С.9–13. 11. Blanchard J.S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mtb* // *Annu. Rev. Biochem.* – 1996. – V.65. – P.215–239. 12. Levy S.B. The challenge of antibiotic resistance // *Sci. Am.* – 1998. – V.275. – P.46–53. 13. *Global Trends in Resistance to Antituberculous Drugs* / Espinal M.A., Laszlo A., Simonsen L. et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2001. – V.6, №6. – P.1294–1300. 14. Rusch-Gerdes S. Epidemiology of Resistant Tuberculosis in Europe // *Infection*. – 1999. – V.27. – Suppl.2. – P.S17–S18. 15. Drobniowski F., Hutchison D.C.S. Multiple-drug-resistant tuberculosis // *Baliere's Clinical Infectious Diseases*. – 1999. – V.5, №2. – P.243–268. 16. *The Dilemma of MDRTB in the Global Era* / Farmer P., Bayona J., Becerra M. et al. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 1998. – V.2. – P.869–876. 17. Степанішин Ю.Г., Степанішина В.Н., Шемякин И.Г. Лекарственно-устойчивые штаммы Mycobacterium tuberculosis и их эпидемиологическая значимость // *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол.* – 1999. – №3. – С.84–89. 18. Дорожкова И.Р., Попов С.А., Медведова И.М. Мониторинг лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в России за 1979–1998 гг. // *Пробл. туберкулеза*. – 2000. – №5. – С.19–22. 19. Пухлик Б.М. Проблема химиорезистентного туберкулеза и пути ее решения // *Укр. хіміотерапевт. ж.* – 1999. – №2. – С.37–42. 20. Ситуация з полірезистентного та мультирезистентного туберкульозу в м. Києві / Журило О.А., Турченко Л.В., Клименко М.Т. та ін. // *Укр. пульмонол. ж.* – 2002. – №3. – С.36–39. 21. Kattan A., Kalia A., Ahmad N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives // *Emerging Infectious Diseases*. – 1998. – V.4, №2. – P.846–848. 22. Characterisation of pncA mutations in pyrazinamide resistant Mycobacterium tuberculosis / Scorpio A., Lindholm-Levy P., Hefets L. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1997. – V.41. – P.540–542. 23. Phenotypic Characterization of pncA mutants of *Mtb* / Morlock G.P., Crawford J.T., Butler W.R. et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – V.44, №9. – P.2291–2295. 24. Молекулярные механизмы устойчивости к рифампицину и изониазиду клинических штаммов Mycobacterium tuberculosis / Степанішина В.Н., Панферцев Е.А., Митрофанова Г.Н. и др. // *Пробл. туберкулеза*. – 2000. – №1. – С.32–36. 25. Molecular Genetic Analysis of Nucleotide Polymorphisms Associated with Ethambutol Resistance in Human Isolates of *Mtb* / Ramaswamy S.V., Amin A.G., Goksel S. et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – V.44, №2. – P.326–336. 26. Fluit A.C., Visser M.R., Schmitz F.J. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2001. – V.14, №4. – P.836–871. 27. Comparison of PCR-heteroduplex characterization by automated DNA sequencing and line probe assay for the detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Kwa-Zulu Natal, South Africa / Kiepiela P., Bishop E., Kormuth L. et al. // *Microb. Drug Resistance*. – 1998. – V.4. – P.263–269. 28. Nachamkin J., Kang C., Weinstein M.P. Detection of resistance to isoniazid, rifampin and streptomycin in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis by molecular methods // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – V.24. – P.894–900. 29. Molecular identification of Streptomycin Monoresistant Mycobacterium tuberculosis related to Multidrug-Resistant W strain / Bifani P., Mathema B., Campo M et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2001. – V.7. – P.842–848. 30. Прямой генетический анализ резистентности к рифампицину изолятов M. Tuberculosis в образцах мокроты / Генерозов Э.В., Аюпхан Т.А., Владимирский М.А. и др. // *Матер. 3-ей Всерос. конф. "Генодиагностика в современной медицине"*. – М., 2000. – С.274–276. 31. Drobniowski F.A., Wilson S.M. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis – a molecular story // *J. Med. Microbiol.* – 1998. – V.47. – P.189–196. 32. Evaluation of the invader Assay, a linear signal Amplification method for identification of mutations associated with resistance to rifampin and isoniazid in Mycobacterium tuberculosis // Cooksey R.C., Holloway B.P., Oldenburg M.C. et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – V.44, №5. – P.1296–1301. 33. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and its resistance to rifampin / Rossau R., Traore H., De Beenhouwer H. et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1997. – V.41. – P.2093–2098. 34. Line probe assay in the rapid detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis directly from clinical specimens / Marttila H.J., Soini H., Vyshevskiy B.I. et al. // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1999. – V.31. – P.269–273. 35. Granjeaud S., Bertucci F., Jordan B.R. Expression profiling: DNA arrays in many guises // *Bioessays*. – 1999. – V.21. – P.781–790. 36. Solid-phase sequence scanning for drug resistance detection in tuberculosis / Head S.R., Parikh K., Rogers Y. et al. // *Mol. Cell Probes*. – 1999. – V.13. – P.81–87. 37. Молекулярно-генетические методы для выявления рифампицин-устойчивых штаммов Mycobacterium tuberculosis / Скотников О.И., Соболева А.И., Михайлович В.М. и др. // *Вестн. РАМН*. – 2002. – №2. – С.36–39. 38. Genetic Diversity of Mycobacterium africanum Clinical Isolates Based on IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, Spoligotyping and Variable Number of Tandem DNA Repeats / Viana-Niero C., Gutierrez C., Sola C. et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V.39, №1. – P.57–65. 39. Evolution of the IS6110-Based RFLP Pattern during the Transmission of *Mtb* / Warren R.M., van der Spuy G.D., Richardson M. et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – V.40, №4. – P.1277–1282. 40. Use of polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis to detect a point mutation in the catalase-peroxydase gene (*katG*) in Mycobacterium tuberculosis / Temesgen Z., Satoh K., Uhl J.R. et al. // *Mol. Cell. Probes*. – 1997. – V.11. – P.59–63. 41. Detection of Rifampin Resistance in *Mtb* in a Single Tube with Molecular Beacons / El-Hajj H., Marras S., Tyagi S. et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V.39, №11. – P.4131–4137. 42. Genotypic analysis of *Mtb* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing / Piatek A.S., Telenti A. et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – V.44, №1. – P.103–110. 43. Tyagi S., Bratu D., Russel-Kramer F. Multicolor molecular beacons for allele discrimination // *Nat. Biotechnol.* – 1998. – V.16. – P.49–53. 44. Detection of PCR-products using self-probing amplicons and fluorescence / Whitcombe D., Theaker J., Guy S. et al. // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – V.17. – P.804–807. 45. Nash K., Gaytan A., Interlied C. Detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis by means of a rapid, simple and specific RNA-RNA-mismatch assay // *J. Infect. Dis.* – 1997. – V.176. – P.533–536. 46. Eltringham J.J., Wilson S.M., Drobniowski F.A. Evaluation of a Bacteriophage-Based Assay as a rapid Screen for Resistance to Isoniazid, Ethambutol, Streptomycin, Pyrazinamide and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – V.37, №11. – P.3528–3532.