

УДК: 616.98:578.828.6]-078:575

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ КАК МЕТОД ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ

Высотин С.А., Боталов Н.С.

ФГБОУ ВО Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

(614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26), e-mail: dr.vysotin2009@yandex.ru)

Высотин С.А. (Vysotin S.A.) – студент медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России;

Боталов Н.С. (Botalov N.S.) – студент медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России

Для корреспонденции: Высотин Сергей Александрович, 614000, г. Пермь, ул. Петропавловская 26, e-mail: dr.vysotin2009@yandex.ru, тел: 89194787742.

Специальность 03.00.07 – Микробиология

Риск заражения туберкулезом у ВИЧ – инфицированных в 200 раз выше, чем в других группах населения. В настоящее время туберкулез занимает первое место в структуре оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных. Принципиальное преимущество перед культуральными методами диагностики имеет полимеразная цепная реакция. Метод полимеразной цепной реакции обладает высокой чувствительностью, дающей возможность обнаруживать единичные бактериальные клетки или вирусные частицы, а так же их генетический материал. Возрастающее число мультирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* представляет собой серьезную проблему для современного здравоохранения. Лечение пациентов, инфицированных мультирезистентными штаммами, требует применения более токсичных и дорогостоящих химиопрепаратов, длительной госпитализации и, тем не менее, часто остается неэффективным, обуславливая высокий удельный вес инвалидизации и смертности. Данные собранные из различных литературных

источников позволили раскрыть возможности применения метода полимеразной цепной реакции для диагностики туберкулеза, определения резистентности возбудителя к антибиотикам у больных с ВИЧ инфекцией.

Ключевые слова: туберкулез, ВИЧ-инфекция, полимеразная цепная реакция, диагностика, антибиотикочувствительность.

POLYMERASE CHAIN REACTION AS THE METHOD OF LABORATORY DIAGNOSTICS OF TUBERCULOSIS AT HIV-POSITIVE PEOPLE

Vysotin S.A., Botalov N.S.

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Risk of infection with tuberculosis at HIV – infected 200 times above than in other groups of the population. Now tuberculosis stands at the first place in structure of opportunistic infections of HIV-positive people. The polymerase chain reaction has the basic advantage than cultural diagnostic methods. The method of a polymerase chain reaction has the high sensitivity giving the chance to find single bacterial cells or virus particles, and also their genetic material. The increasing number of multidrug strains of M. tuberculosis represents a serious problem for modern health care. Treatment of the patients infected with multirefractory strains demands to use more toxiferous and expensive chemotherapy drugs, long hospitalization and nevertheless, often remains noneffective, causing high specific gravity of invalidisation and a mortality. The information collected from many literature sources gives us a big possibility to disclose of using polymerase chain reaction in diagnostics of tuberculosis, definition of resistance of the exciter to antibiotics at patients with HIV infection.

Keywords: tuberculosis, HIV infection, polymerase chain reaction, diagnostics, antibiotic sensitivity.

На сегодняшний день проблема ВИЧ - инфекции представляет собой сложный социально-экономический, общественно-культурный, медицинский феномен, справедливо названный «чумой XX века». Начавшаяся в конце 70-годов XX столетия как болезнь определенных групп населения, пандемия ВИЧ/СПИДа охватила все регионы мира. Без специфической высокоактивной антиретровирусной терапии у всех инфицированных больных неизбежно развитие стадий ВИЧ 4-б, 4-в, 5 (по классификации В.В. Покровского, 2001 г.), которые представляют собой развернутую картину синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) с прогрессирующими оппортунистическими заболеваниями, септическими состояниями, пневмонией и туберкулёзом [5]. Туберкулез – это инфекционное

и социально-зависимое заболевание. На сегодняшний день он остается одной из наиболее актуальных проблем практического здравоохранения. В первую очередь это связано с тем, что с конца прошлого века эпидемиологическая обстановка по туберкулезу во всем мире вновь стала стремительно ухудшаться [6]. По данным ВОЗ на 2015 год микобактериями туберкулеза инфицировано 33% населения планеты. В тоже время ежегодно в мире регистрируют до 8 млн новых случаев туберкулеза и до 2 млн смертей от него. Наибольший риск заражения туберкулезом у ВИЧ - инфицированных. У этих пациентов заболеваемость туберкулезной инфекцией в 200 раз выше, чем в других группах населения [2, 3]. В настоящее время туберкулез занимает первое место в структуре оппортунистических инфекций у ВИЧ-инфицированных. Имеются сложности при назначении рациональной терапии микст-инфекций. ВИЧ-инфицированные больные нуждаются в динамичном наблюдении фтизиатра, в проведении профилактических мероприятий, в бактериологическом обследовании и в расширении спектра обязательных препаратов при определении антибиотикорезистентности микобактерий туберкулёза [1]. Тесная взаимосвязь между туберкулезом и ВИЧ-инфекцией раньше всего обнаружилась в странах Африки, а также среди лиц, употребляющих внутривенные наркотики, в США. В РФ процент умерших от туберкулеза в ассоциации с вирусом иммунодефицита составляет 66,5%.

За последние годы возросло количество иммунодефицитных синдромов, связанных с хроническими заболеваниями, при которых встречаются ВИЧ - ассоциированные заболевания при отсутствии антител к ВИЧ. У лиц, инфицированных одновременно ВИЧ и возбудителем туберкулеза ежегодная вероятность развития туберкулеза составляет 5-10%, в то время как у неинфицированного населения подобная вероятность не превышает 10% на протяжении всей жизни. По прогнозам ВОЗ, заболеваемость туберкулезом может увеличиться в 3 раза, если 10% взрослого населения страны будет инфицировано ВИЧ. Только в 2015 году произошло 10,4 млн новых случаев туберкулезом, из которых 0,4 млн случаев произошли среди людей с ВИЧ. Это объясняется синергическими взаимодействиями возбудителей туберкулеза и ВИЧ-инфекции. В этой ситуации совершенствование и внедрение новых методов диагностики является важной задачей. Прогресс медицины в настоящее время обеспечивается фундаментальными разработками, среди которых на одном из первых мест находятся генетические исследования. Генодиагностика - относительно новый раздел диагностики, который позволяет обнаруживать гены или последовательности нуклеиновой кислоты, специфичные для определенного вида возбудителя инфекционного заболевания. В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик опубликовали работу, посвященную структуре ДНК, в которой указывалось, что основной принцип, лежащий в основе живой материи - принцип комплементарности [7]. Этот принцип широко и успешно используется для

решения различных научных проблем, в том числе для идентификации патогенных микроорганизмов. Однако метод генодиагностики, основанный на реакции гибридизации ДНК с ДНК, не отличается высокой чувствительностью и малоинформативен при диагностике инфекционных состояний.

Следующим шагом молекулярной биологии было создание способа исследования, получившего название «полимеразной цепной реакции» (ПЦР) [9]. Принцип ПЦР был описан в 1983 г. К. Мюллисом - американским биохимиком фирмы «Cetus», за что ему в 1993 году была присуждена Нобелевская премия в области химии. В основе метода лежит многократное копирование (амплификация) с помощью фермента ДНК-полимеразы определенного фрагмента ДНК по принципу комплементарности, который является маркерным для заболевания или данного вида инфекционного возбудителя и позволяет обнаружить несколько специфических молекул ДНК в присутствии миллионов других молекул [4].

В настоящее время предложены различные модификации ПЦР, показана возможность создания тест-систем для обнаружения микроорганизмов, выявления точечных мутаций. Существуют качественный и количественный варианты ПЦР. Качественную ПЦР можно использовать для диагностики инфекционных заболеваний, вызванных безусловными патогенами и выявления инфекционных агентов перед проведением количественной ПЦР. В настоящее время наиболее перспективным представляется метод ПЦР в реальном времени. Сущность метода заключается в исследовании накопления продуктов амплификации с помощью специального прибора без последующего электрофореза. Так как кинетика накопления продуктов амплификации связана с исходным количеством матрицы, это дает возможность точно оценить ее количество. Отличительными чертами данного метода является возможность количественного определения ДНК/РНК инфекционных агентов в исследуемом материале, отсутствие стадии электрофореза, менее строгие требования к организации ПЦР - лаборатории, автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Отсутствие стадии электрофореза позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом уменьшить число ложноположительных результатов. При детекции различных вариантов мутаций при анализе структуры ДНК расшифровка ее последовательности остается методом золотого стандарта в области ДНК-анализа. ПЦР имеет принципиальное преимущество перед культуральными методами. Диагностические возможности ПЦР не ограничиваются способностью микроорганизма расти на искусственных средах или в культуре клеток, поэтому основное преимущество ПЦР перед культуральными методами состоит не только в чувствительности ПЦР, а в способности идентифицировать, определять свойства и работать с большим количеством

различных микроорганизмов, которые не удастся по тем или иным причинам определять культуральными методами.

Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, дающей возможность обнаруживать единичные бактериальные клетки или вирусные частицы. Преимущество диагностики, основанной на использовании ПЦР, перед золотым стандартом, которым считается культивирование микроорганизмов, состоит в следующем: более высокая частота обнаружения микроба, время обнаружения возбудителя составляет 4–5 часов, определение возбудителей в образцах, взятых неинвазивным путем [4, 9].

В настоящее время актуальным для здравоохранения является клиническая интерпретация результатов ПЦР-исследований для диагностики туберкулеза у ВИЧ-инфицированных. Метод ПЦР основан на ферментативной амплификации выбранных специфических участков генома бактерий рода *Mycobacterium tuberculosis*, их дальнейшей детекции и идентификации. Аналитическая чувствительность метода, определяемая при последовательных разведениях суспензии бактериальных клеток, очень высока и составляет от 1 пг до 5 фг микобактериальной ДНК, что эквивалентно выявлению 1-10 бактериальных клеток. В настоящее время существует ряд разработок по использованию ПЦР в диагностике туберкулеза у ВИЧ-инфицированных.

ДНК микобактерий могут сохраняться в организме клинически излеченного или инфицированного туберкулезом в течение длительного периода времени. Их выявление не может являться единственным подтверждением активности туберкулеза и служит лишь основанием для проведения общепринятых дифференциально-диагностических исследований, дальнейшего наблюдения за больным.

Диагностику ПЦР можно использовать не только для обнаружения генетического материала возбудителя туберкулеза, но и для определения резистентности этого штамма к противотуберкулезным препаратам. Возрастающее число мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* представляет собой серьезную проблему для современного здравоохранения. Лечение пациентов, инфицированных мультирезистентными штаммами, требует применения более токсичных и дорогостоящих химиопрепаратов, длительной госпитализации и, тем не менее, часто остается неэффективным, обуславливая высокий удельный вес инвалидизации и смертности. Основным в решении этой проблемы является своевременная детекция мультирезистентных штаммов на ранних стадиях заболевания, которая позволит контролировать дальнейшее распространение конкретного выявленного штамма и подобрать оптимальную схему химиотерапии. Тем не менее, определение спектра лекарственной резистентности классическими методами на селекционных средах занимает от 3-х недель до 3-х месяцев, что делает полученный результат ретроспективным. [8]

Альтернативным и более перспективным вариантом решения этой проблемы является использование генотипических методов анализа, основанных на выявлении точечных мутаций или других генетических детерминант, обеспечивающих резистентность к антибиотикам. Его отличительной чертой является небольшой срок выполнения анализа, составляющий 2-3 дня.

Заключение. Внедрение молекулярно-биологических методов диагностики, основанных на применении полимеразной цепной реакции, значительно повышает эффективность выявления микобактерий туберкулезного комплекса по сравнению с традиционными микробиологическими методами (бактериоскопия, люминесцентная микроскопия, посев).

Сочетание молекулярных методов типирования микобактерий туберкулеза с методами прямой детекции (секвенирование) резистентности к химиопрепаратам позволит в дальнейшем проводить не только статистические мониторинговые эпидемиологические исследования, но и получать достоверные результаты в клинически значимом масштабе времени.

Приведенные выше данные многочисленных клинико-лабораторных исследований свидетельствуют об успешном внедрении метода полимеразной цепной реакции в практику противотуберкулезной службы. В настоящее время основным является определение показаний к применению ПЦР в определении возбудителя туберкулеза, ее диагностической значимости (в сравнении с микроскопическими и культуральными методами) и клиническая интерпретация получаемых с ее помощью результатов.

Список литературы

1. Баженов И.Л., Канина А.О., Тукачёва О.В., Быкова Л.П., Годовалов А.П. Анализ заболеваемости туберкулезом среди ВИЧ-инфицированных города Краснокамска // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 8. – С. 91-92.
2. Всемирная организация здравоохранения. Оперативный план по борьбе с ВИЧ инфекцией оперативный план / Всемирная организация здравоохранения // Ins Communication. - 2014. - С. 1–33.
3. Всемирная организация здравоохранения. Руководящие принципы для национальных программ и других заинтересованных сторон «Политика ВОЗ в отношении сотрудничества в области ТБ/ВИЧ / Всемирная организация здравоохранения // Creative Lynxd. - 2012. - С. 1-31.
4. Мирлина Е.Д., Ланцов В.А. Диагностические возможности метода ПЦР при генитальном туберкулезе у женщин. // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 1.-с.22-26.
5. Оборин Д.А., Варецкая Т.А., Быкова Л.П., Трапезников Я.П., Годовалов А.П. Встречаемость

грибов рода *Candida* в разных биотопах у ВИЧ-инфицированных // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции». – 2016. – С. 128-129.

6. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2009 году. Государственный доклад. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – С. 456.
7. Саики, Р. Полимеразная цепная реакция. Анализ генома. Методы / Р. Саики, У. Гиленстен, Г. Эрлих. - М.: Мир, 1990. - С. 176-190.
8. Смирнова Т.Г., Савинкова С.Н., Мартынова Л.П. Выявление ДНК микобактерий у животных с экспериментальным туберкулезом. / В сб.: Иммунодиагностика и иммунореабилитация при лепре, туберкулезе и других хронических заболеваниях. Материалы симпозиума. Астрахань, 1998.-с.16-17.
9. Херрингтон, С. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / С. Херрингтон, Дж. Макгли. - М.: Мед. книга, 1999. - 433 с.