

Туберкулез – инфекционное заболевание.

История вопроса.

Возбудитель туберкулеза.

Полиморфизм МБТ. Характеристика.

Этиологическая диагностика туберкулеза. Методы.

Лекарственная устойчивость МБТ. Теоретическое обоснование.

Журавлев В.Ю.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА

ВЫЯВЛЕНИЕ ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА ИЗМЕНЕНИЙ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

- **КОСВЕННЫЕ МЕТОДЫ:**
 - анамнез и физикальное обследование;
 - биохимические исследования;
 - функциональные исследования



МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА

ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ — ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ:

- в тканях — морфологическая диагностика;
- в органах — лучевая диагностика.



ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА

- **КОСВЕННЫЕ МЕТОДЫ:**
 - туберкулинодиагностика;
 - определение противотуберкулёзных антител;
 - исследование высвобождения γ -интерферона под воздействием специфических антигенов *M. tuberculosis*.



ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА

- **ПРЯМЫЕ МЕТОДЫ:**
- бактериоскопическая диагностика;
- бактериологическая диагностика;
- определение антигенов *M. tuberculosis*;
- молекулярно-биологические методы определения генетических последовательностей специфичных для *M.tuberculosis*.



Richard Morton



**Личный врач Вильгельма III
Ранняя клиническая
диагностика: кашель, потеря
в весе, температура,
сонливость, частый пульс.**

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



- **Morton, Richard (1689) *Phthisiologia seu Exercitationes de phthisi tribus libris comprehensae* (London)** предположил что причиной туберкулеза был некоторый тип **animacula?** микроскопические живые существа, которые в состоянии выжить в новом теле.

Теория была резко отклонена, за 162 года до того, как Роберт Кок продемонстрировал, что Мартен был прав.



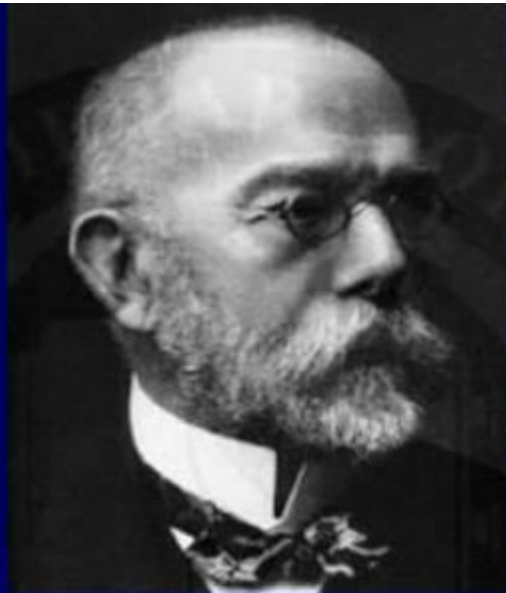
René-Théophile-Hyacinthe Laennec

(February 17, 1781 – August 13, 1826)



- Один из основателей современной клинической медицины и патологической анатомии
- Доказал, что бугорок и казеозный некроз – типичные анатомические проявления туберкулеза
- Термин **туберкулез**
- **стетоскоп**

A handwritten signature of René-Théophile-Hyacinthe Laennec in cursive script.



Mycobacterium
tuberculosis

Генрих Герман Роберт Кох (1843 – 1910)

- метод выделения чистых культур на твердых питательных средах (ввел в практику **чашки Петри**)
- способы окраски бактерий анилиновыми красителями,
- открытие возбудителей сибирской язвы, холеры, туберкулеза –
- совершенствование техники микроскопии.
- экспериментальное обоснование постулатов **(триада) Хенле-Коба**.
 - **возбудитель заболевания должен регулярно обнаруживаться у пациента**
 - **он должен быть выделен в чистую культуру**
 - **выделенный микроорганизм должен вызывать у подопытных животных те же симптомы, что и у больного человека**

Нобелевская премия по физиологии и медицине в 1905 за исследования туберкулёза.

Постулаты Коха, постулаты Коха-Пастера постулаты Коха-Генле — утверждения, которые можно сделать относительно микроорганизма, доказывающие, что он является возбудителем болезни:

- Микроорганизм постоянно встречается в организме больных людей (или животных) и отсутствует у здоровых;
- Микроорганизм должен быть изолирован от больного человека (или животного) и его штамм должен быть выращен в чистой культуре;
- При заражении чистой культурой микроорганизма здоровый человек (или животное) заболевает;



Следует заметить, что Кох полностью изъясил вторую часть **первого постулата**, обнаружив бессимптомных носителей холеры (Koch, 1893) и, позже, тифа.

Второй постулат не всегда удается реализовать для доказательства патогенной природы микроорганизма, так как все вирусы и некоторые бактерии (например, возбудители проказы) не могут быть получены в чистой культуре на искусственной питательной среде.

Третий постулат не всегда имеет место, как это обнаружил сам Кох для туберкулёза и для холеры (Koch, 1884). Нередко у части индивидов подверженного инфекционному заболеванию вида существует врожденная или приобретенная невосприимчивость, связанная с иммунным статусом или особенностями генотипа. Например, люди с делецией части гена CCR5 (гомозиготы по аллелю CCR5 Δ 32) не заражаются ВИЧ-инфекцией, натуральной оспой и чумой.



M. tuberculosis complex

7 видов:

- *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*,
M. pinipedii, *M. caprae*, *M. bovis*,
M. canetti (*M. prototuberculosis*)

Неподвижные, палочковидные бактерии:

- низкая скорость роста, специфическая клеточная стенка

Высокое сходство между видами на уровне ДНК:

- сходство последовательности ДНК между видами >99%

Но: Существенные различия по биохимическим/фенотипическим

- свойствам, географической распространенности и важности для заболеваемости ТБ человека



Систематика микобактерий

1882 г. Р. Кох и его последователи считали, что у человека и у животных заболевание вызывается одним возбудителем

В 1886 г. возбудитель туберкулеза был назван *Mycobacterium tuberculosis*, когда *Lehmann* и *Neumann* выделили род *Mycobacterium* в семействе *Mycobacteriaceae*.

В 1889 г. Rivolta выяснил разницу в свойствах возбудителей туберкулеза птиц и млекопитающих

В 1901 г. на конгрессе фтизиатров в Лондоне Кох высказал мнение, что бугорчатка у человека не тождественна жемчужнице крупного рогатого скота.. к XX веку были определены виды возбудителей туберкулеза человека, крупного рогатого скота и птиц *Mycobacterium tuberculosis humanus*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium*.

Определитель бактерий Bergey: возбудитель туберкулеза относится к группе Микобактерии, содержащей единственный род *Mycobacterium*

• В 1975 году род *Mycobacterium* включал в себя около 30 видов, а к 2011-му году это число уже приблизилось к 130.



Морфология и физиология микобактерий

Отличительным свойством *M.tuberculosis* является кислото-спирто-щелоче устойчивость, что обусловлено высоким содержанием в клеточных стенках МБ липидов и восков.

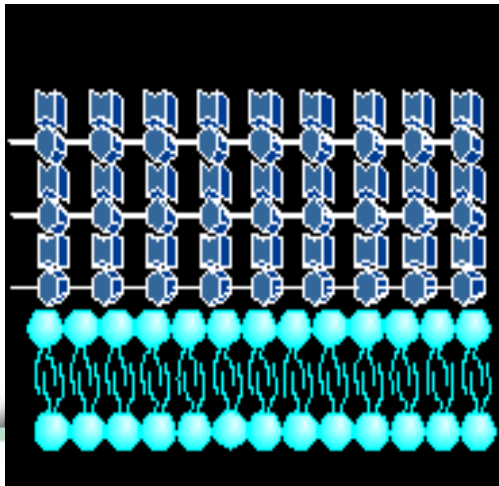
Электронно-микроскопические исследования *M.tuberculosis* позволили дифференцировать микрокапсулу, многослойную клеточную стенку, цитоплазму с органеллами (гранулы, вакуоли, рибосомы) и ядерную субстанцию.

Микрокапсула состоит из полисахаридов и играет важную роль в жизнедеятельности *M.tuberculosis*, в частности, придает им устойчивость к неблагоприятным воздействиям внешней среды.

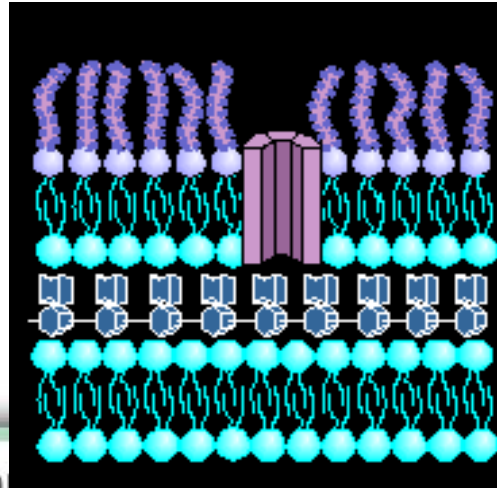


Схематическое устройство клеточной оболочки различных микроорганизмов

Грам (+) бактерии
Липидный бислой
клеточной мембраны
покрыт пористым
пептидогликановым
слоем, который не
вполне защищает от
антимикробных
агентов



Грам (--) бактерии
имеют две мембраны.
Внешняя мембрана
функционирует как
эффективный барьер
проницаемости, так
как состоит из
липополисахаридов
(ЛПС) и транспортных
каналов.



Микобактерии: многослойная
толстая клеточная оболочка,
богатая миколовыми
кислотами и исключительно
эффективно выполняющую
барьерные функции.

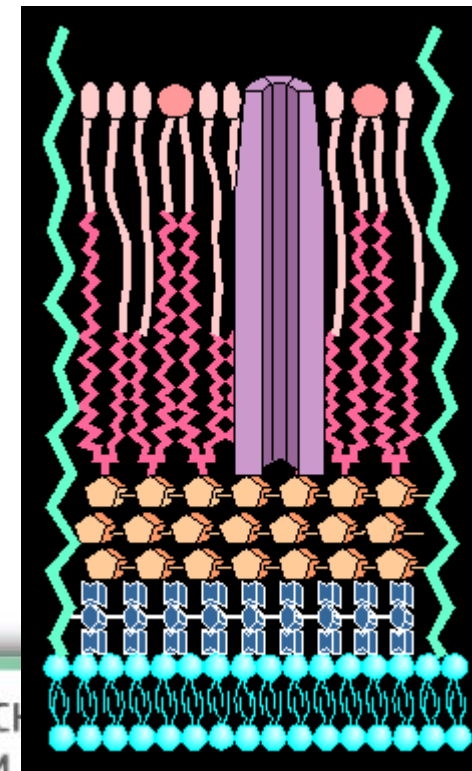
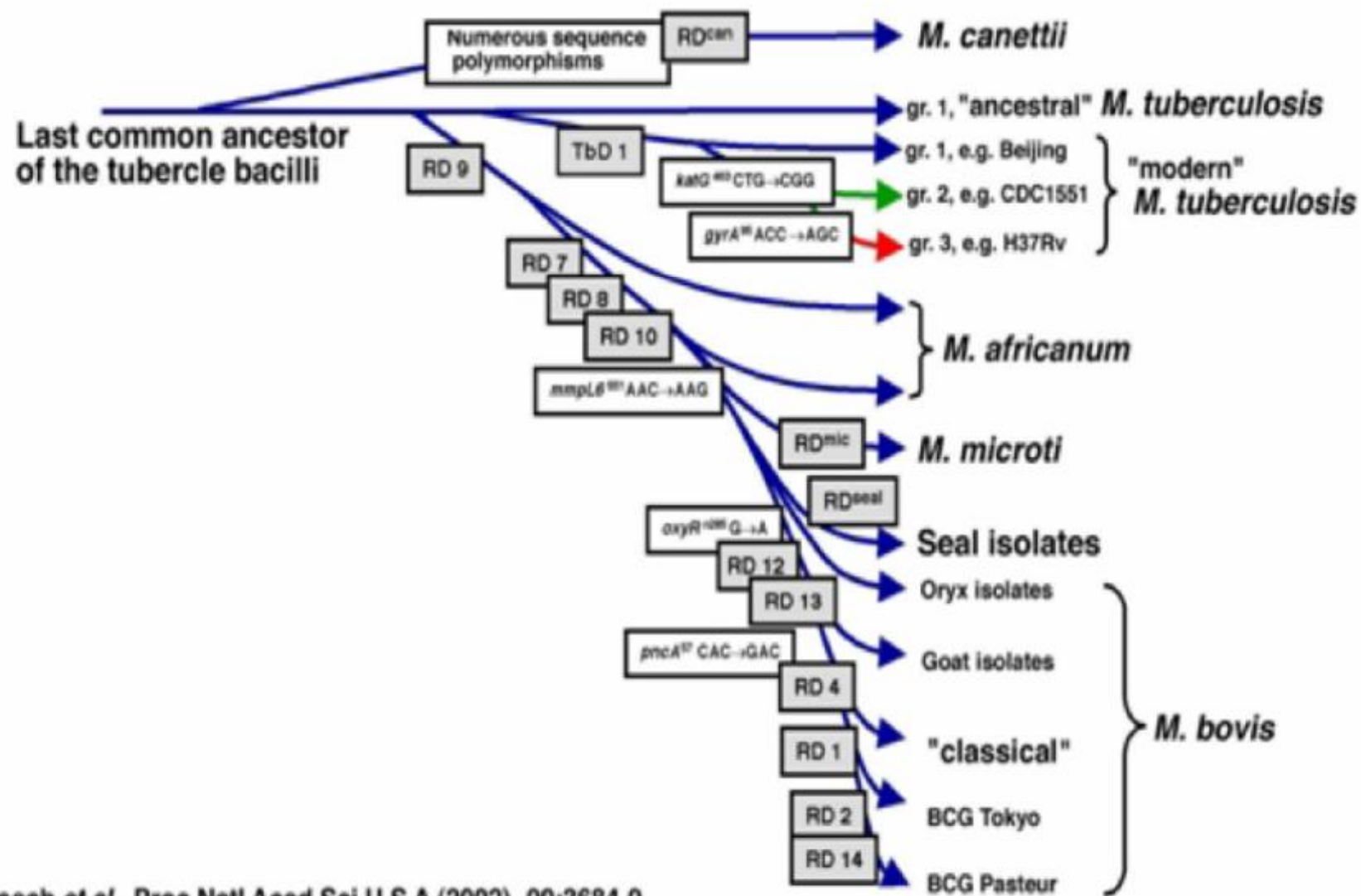


Схема предполагаемого эволюционного пути микобактерий



Brosch *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A (2002), 99:3684-9

институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



M.tuberculosis complex

характеризует совокупность признаков

- Медленная скорость роста - более 3-х недель
- Морфология колоний - R или S формы
- Температура роста - 35 - 37°C.
- Отсутствие пигментообразования - цвет слоновой кости
- Выраженная кислотоустойчивая окраска
- Положительный ниациновый тест
- Положительный нитратредуктазный тест
- Отсутствие термостабильной каталазы (68°C)
- Отсутствие роста на среде Левенштейна-Йенсена, содержащей:
 - § 1000 мкг/мл натрия салициловокислого;
 - § 500 мкг/мл паранитробензойной кислоты;
 - § 5% хлорида натрия.
- Рост в присутствии 1.5 мкг/мл ТСН



Современные тенденции в эволюции МБТ

При изучении полиморфизма генов, кодирующих каталазу, пероксидазу и А-субъединицу ДНК-гиразы, у *M. tuberculosis complex* были выделены три генотипические группы:

I группа: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. tuberculosis* и *M. Microti* - наиболее древняя (с точки зрения эволюции)

II и III группы включают различные штаммы *M. tuberculosis*, получившие распространение в некоторых географических регионах.

Клональное поведение характерно для I и II групп, а штаммы III группы крайне редко вызывают массовые заболевания.

В различных регионах мира распространены генетические семейства *M. tuberculosis*, получившие наименования Haarlem, Africa, Filipino.



Устойчивость микобактерий к факторам внешней среды

Особенности МБ:

Геном МБТ: 4,4 млн. пар оснований

Инертная липидная «мягкая» клеточная стенка

Полиморфность, адаптивность, живучесть

Длительность размножения – генерация в 18-20 часов

«Управляемые» каналы

4 пути дыхательного цикла, микроаэрофилы

Синтез: всех аминокислот, витаминов, ассимиляция железа

Антиоксидантная активность



Устойчивость микобактерий к факторам внешней среды

Сохранение жизнеспособности:

В почве и воде около года

В высохшей мокроте до 10-12 мес.

в книгах – 3-4 мес.

В уличной пыли до 10 дней

Выдерживают процессы гниения и могут несколько месяцев сохранять жизнеспособность и вирулентность в погребенных трупах.

Устойчивость к химическим веществам сильным кислотам, щелочам, спирту, фенолу, ацетону.

Химическим агентам (дезинфектантам)

Устойчивость к антибиотикам семейств β -лактамов, макролидов, цефалоспоринов и тетрациклинов.

Изменчивость и полиморфизм связаны с распространением развитием лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам.



Факторы патогенности

Корд –фактор (димиколат трегалозы) вторичного иммунодефицита и острого воспалительного процесса в органах и тканях организма определяют устойчивость *M.tuberculosis* к кислотам, щелочам и спиртам. Это вещество является слабым эндотоксином тормозит синтез лизосомальных ферментов, что предохраняет внутриклеточно расположенные *M.tuberculosis* от разрушения; угнетает синтез лимфоцитами CD4+ γ -интерферона, который является важным фактором активации макрофагов в их способности усиливать продукцию H_2O_2 , тормозит слияние фагосом и лизосом внутри фагоцита, что способствует персистенции МБТ.

Каталаза/пероксидаза повышают внутриклеточную выживаемость возбудителя, защищая его от механизмов лизиса в макрофаге или очаге воспаления

Сидерофоры – хелатные комплексы связывания и переноса ионы двухвалентного железа – антиокислительные ловушки



Морфологические физиологические и тинкториальные свойства

M. tuberculosis complex – грамположительные, прямые или слегка изогнутые палочки.

Кислото-спирто-щелочеустойчивость *M. tuberculosis* – дифференциальная окраска (КУМ)

Размножение крайне медленное, прихотливое : период удвоения 18–24 ч (обычные бактерии делятся каждые 15 мин). Поэтому для получения видимого роста типичных колоний требуется не менее 4–6 нед. Одной из причин медленного размножения микобактерий - выраженная гидрофобность. Более вероятно, что это генетически детерминировано и связано с более сложным устройством микобактерий (медленно растущие МБ (*M. tuberculosis*, *M. leprae*) имеют по одной копии оперона, а быстрорастущие (*M. smegmatis*) — лишь две копии.

Рост на жидких средах микобактерии поверхностный в виде нежной сухой плёнки. Среда остаётся прозрачной и добиться диффузного роста удастся только в присутствии детергентов, например Твина-80.

В микроколониях (т.е. на ранних сроках) образуются структуры, напоминающие жгуты — признак, который связывают с корд-фактором *M. tuberculosis*



Классификация микобактерий

- Семейство *Mycobacteriaceae*
- Порядок *Actinomycetales*
- Род *Mycobacterium*

Комплекс *Mycobacterium tuberculosis*:

M.tuberculosis, *M.bovis*, *M.bovis* BCG,
M.africanum, *M.microti*, *M.canettii*,
M.pinnipedii, *M.caprae*.

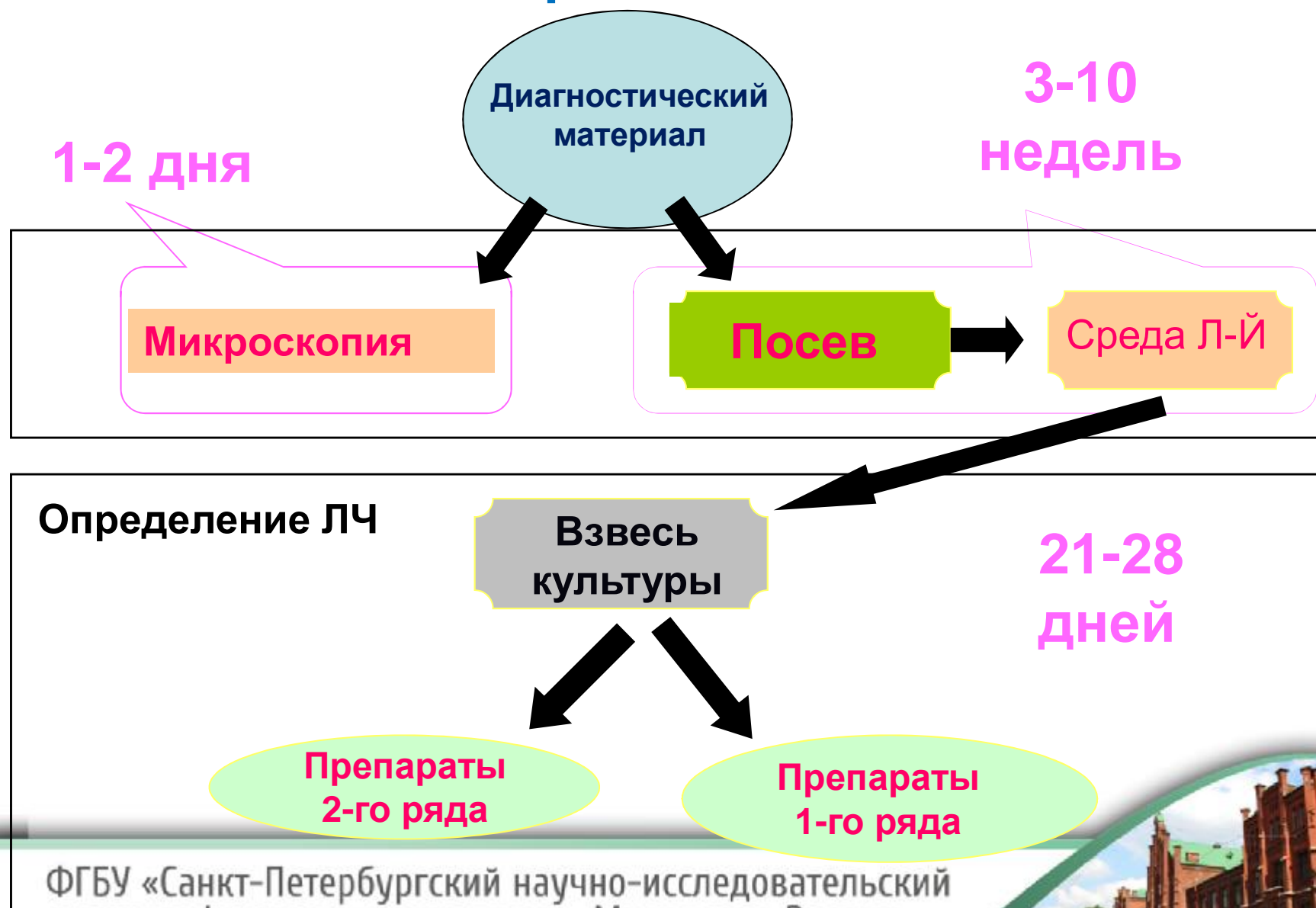


Классификация микобактерий

- Типичные патогены:
(микобактерии туберкулезного комплекса + *M. leprae*)
- Условно патогенные микобактерии:
(*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* и др.)
- Сапрфитные микобактерии:
(*M. vaccae*, *M. flei*, *M. tarrae*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum* и др.)



Схема выявления возбудителя туберкулеза классическими микробиологическими методами





Микобактерии из-за своего высокого содержания воска и жира трудно окрашивать обычными методами. **Роберт Кох окрашивал МБТ 24 часа метиленовым синим и применял раствор едкого калия.**

Позднее (1882) метод был изменен **Паулем Эрлихом**. Он использовал фуксин и метиловый фиолетовый в водном растворе анилина. Именно он открыл кислотоустойчивость, потому что он мог доказать, что окрашенный препарат не обесцвечивался под действием азотистой кислоты.

Ziehl ускорил в 1882 году проникновение краски в клетку бактерий добавлением фенола.

Neelsen применил в 1883 году метиленовый синий как контрастирующую окраску. Так появился до сих пор используемый способ окрашивания (окрашивание **Ziehl-Neelsen**).

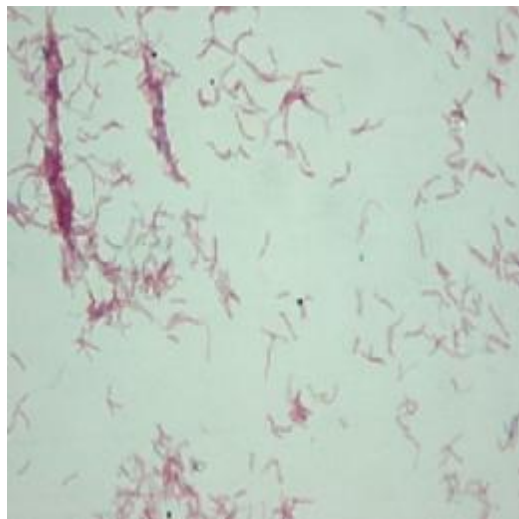


Микроскопические методы

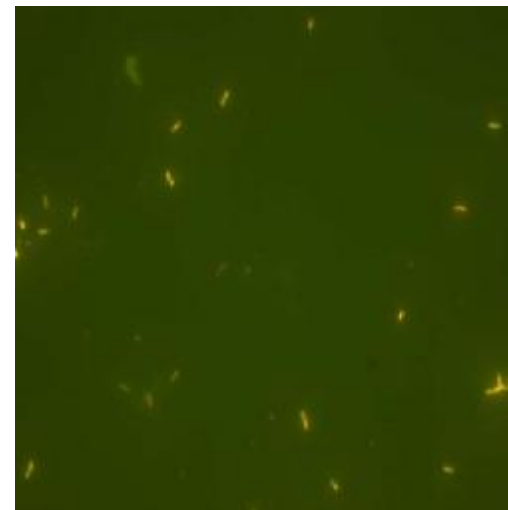
Основа методов – выявление кислотоустойчивых бактерий

Чувствительность - от 10000 клеток в 1 мл мокроты

Окраска по Цилю-Нильсену

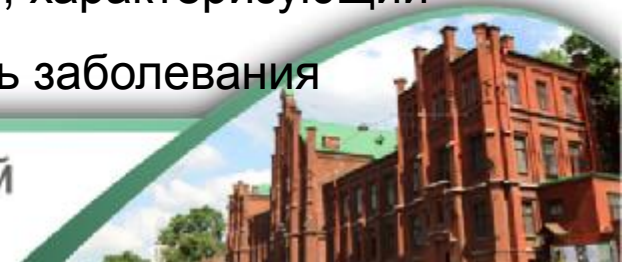


Окраска люминесцентными красителями



Число кислотоустойчивых бактерий (КУБ), обнаруживаемых при микроскопическом исследовании, важный показатель, характеризующий степень эпидемической опасности больного и тяжесть заболевания

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



Общие принципы люминесцентной микроскопии (ЛМ)

Люминесценция (от лат. *lumen*, род. падеж *luminis* — свет и -*escent* — суффикс, означающий слабое действие) — нетепловое свечение вещества, происходящее после поглощения им энергии возбуждения.

С.И.Вавилов в 1948 году дал каноническое определение люминесценции: «Будем называть люминесценцией избыток над температурным излучением тела в том случае, если это избыточное излучение обладает конечной длительностью примерно 10⁻¹⁰–10 секунд и больше». Это значит, что яркость люминесцирующего объекта в спектральном диапазоне волн его излучения существенно больше, чем яркость абсолютно чёрного тела в этом же спектральном диапазоне, имеющего ту же температуру, что и люминесцирующее тело



LED-микроскопия

Светодиоды (LED) как источник УФ излучения были разработаны с целью использовать преимущества флуоресцентной микроскопии без перечисленных недостатков.

В 2009 г. ВОЗ провела оценку эффективности LED-микроскопии на основе стандартов, разработанных для использования новых методов в рутинной практике. Результаты показали, что точность светодиодной микроскопии соответствовала принятым международным стандартам.

Метод был более чувствителен, чем общепринятый метод микроскопии с окраской по ЦН и имел преимущество в качестве, оперативности и стоимости исследований по сравнению как со световой микроскопией, так с общепринятой флуоресцентной микроскопией.

На основании данных выводов ВОЗ рекомендовала использовать LED-микроскопию как альтернативную технологию.



Культуральные методы

Посев на плотные питательные среды



колонии *M.tuberculosis*
на среде Левенштейна-Йенсена

- среды условно селективные
- продолжительность исследования
10 недель (70 дней)
- еженедельный просмотр посевов



История создания питательных сред

Proskauer и Beck (1894) показали, что аспарагин необходим для хорошего роста МБТ. Тогда же к факторам роста отнесли лейцин, тирозин, таурин, соли аммония и глицерин. Аспарагин д.б. в свободном состоянии

В 1936 году **Calmette A.** *Обнаружил, что *M.tuberculosis* могут инфицировать яйца и хорошо размножаться внутри них*
Рецептура питательных сред на яичной основе постоянно совершенствуется, однако в качестве международного «золотого» стандарта принята коагулированная яичная среда Левенштейна-Йенсена

В нашей стране получила распространение питательная среда Финн-2, отличающаяся аминокислотными добавками и сниженным значением *pH* до 6,8.

Другие яичные среды – Новая, Ogawa, Stonebrink и др.



Посев более чувствителен, чем микроскопия

- обнаруживает 10-100 живых бактерий в 1 мл мокроты

Посев необходим:

- для получения культуры микобактерий
- видовой идентификации
- тестирования лекарственной чувствительности



Время получения результатов исследования на туберкулез классическими микробиологическими методами

- ✓Микроскопия – 1-2 дня**
- ✓Культуральное исследование – 3-10 нед.**
- ✓Лекарственная чувствительность– 3-4 нед.**

Всего от 6 до 14 недель



Ускоренные методы выявления возбудителя

Культуральные

Культивирование на жидких
питательных средах
с автоматической регистрацией
роста культуры

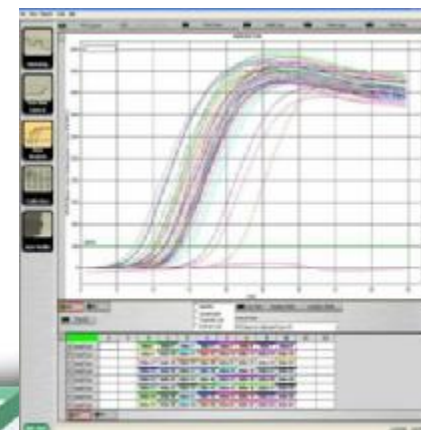
Bactec MGIT 960 7-14 дней



Молекулярно- генетические

Выявление ДНК возбудителя
в диагностическом материале

ПЦР 1-2 дня



—Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

Автоматизированная система предназначена для выявления микобактерий и определения лекарственной чувствительности МБТ

1. Постоянный автоматический мониторинг роста МБТ.
2. Получение достоверных результатов в течение 5-14 дней.
3. Автоматический контроль качества.
4. Производительность (до 8000 тестов в год)



Молекулярно-генетические технологии

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – одна из основных технологий современной молекулярно-генетической диагностики

Быстрый, простой, чувствительный и универсальный метод *in vitro* точной амплификации выбранных последовательностей ДНК/РНК из сложных комплексов нуклеиновых кислот



Достоинства метода ПЦР

- Быстрота проведения анализа
- Высокая специфичность
- Высокая чувствительность

Виды ПЦР

1. Классическая ПЦР
2. ПЦР в режиме реального времени



Классическая ПЦР состоит из трех этапов:

- 1) Выделение ДНК
- 2) Амплификация (собственно ПЦР) – экспоненциальное увеличение содержания специфического фрагмента ДНК микобактерий (например, IS6110)
- 3) Детекция результатов



ПЦР в режиме реального времени:

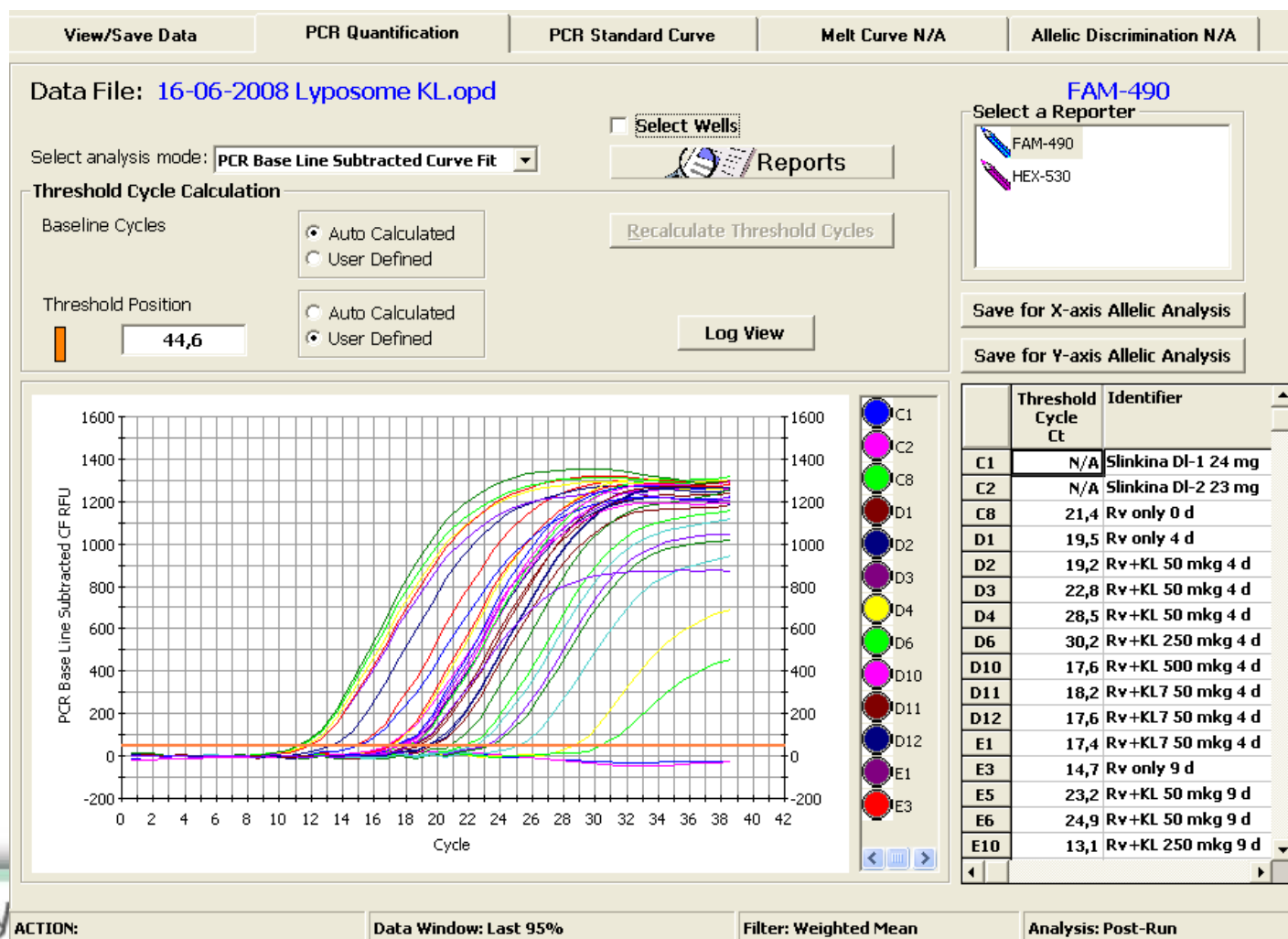
- 1) Выделение ДНК**
- 2) Детекция результатов происходит непосредственно во время амплификации**

Преимущества перед классической ПЦР

- 1. Сокращение времени исследования**
- 2. Снижение вероятности контаминации**
- 3. Удешевление (нет необходимости в выделении специального помещения для электрофореза, покупки реагентов и электрофоретического оборудования)**
- 4. Возможность проведения количественной оценки.**

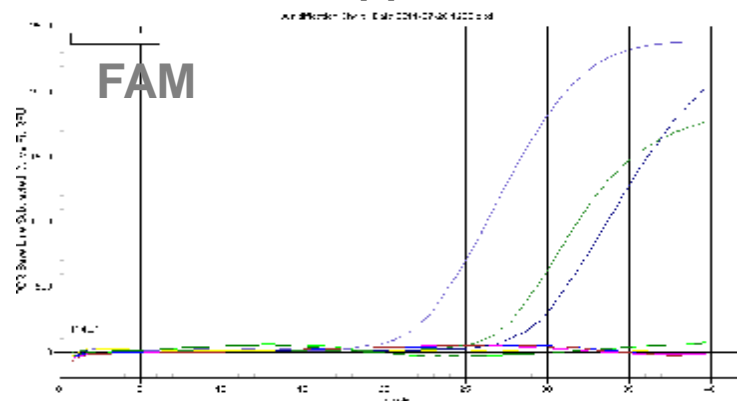


Результаты ПЦР в режиме реального времени, полученные на амплификаторе с оптическим модулем ICycler IQ-4 (BIO-RAD)

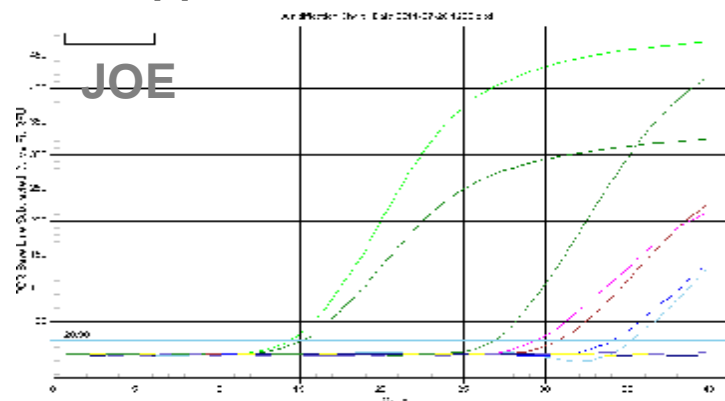


Результаты гибридно-флюоресцентной детекции ПЦР-РВ

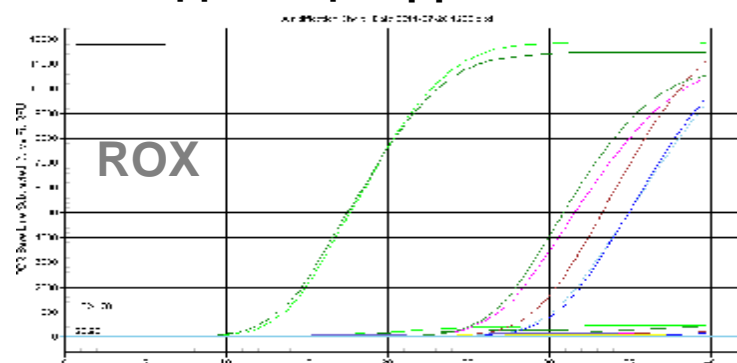
FAM – детекция ДНК M.tuberculosis



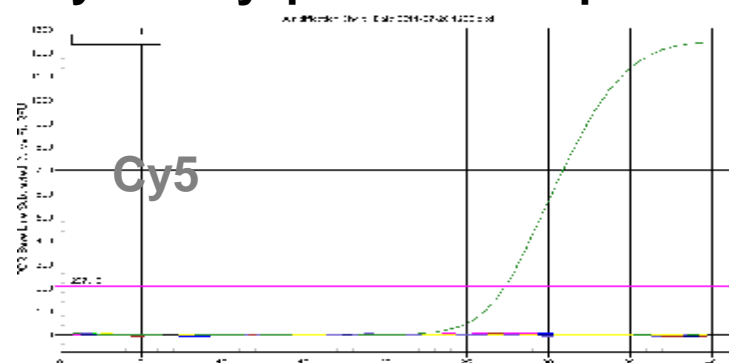
JOE – ДНК M.bovis M.bovis BCG



ROX – детекция ДНК M.bovis BCG



Cy5 – внутренний контроль



Чувствительность – 97%

Специфичность – 100%

«АмплиСенс® MTC-diff-FL»

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



Внедрение ПЦР позволило:

- **значительно сократить сроки подтверждения диагноза туберкулеза**
- **контролировать эффективность химиотерапии у больных туберкулезом легких с отрицательными результатами бактериоскопии**



Проблема приобретенной лекарственной устойчивости впервые была отражена:

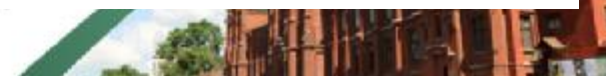
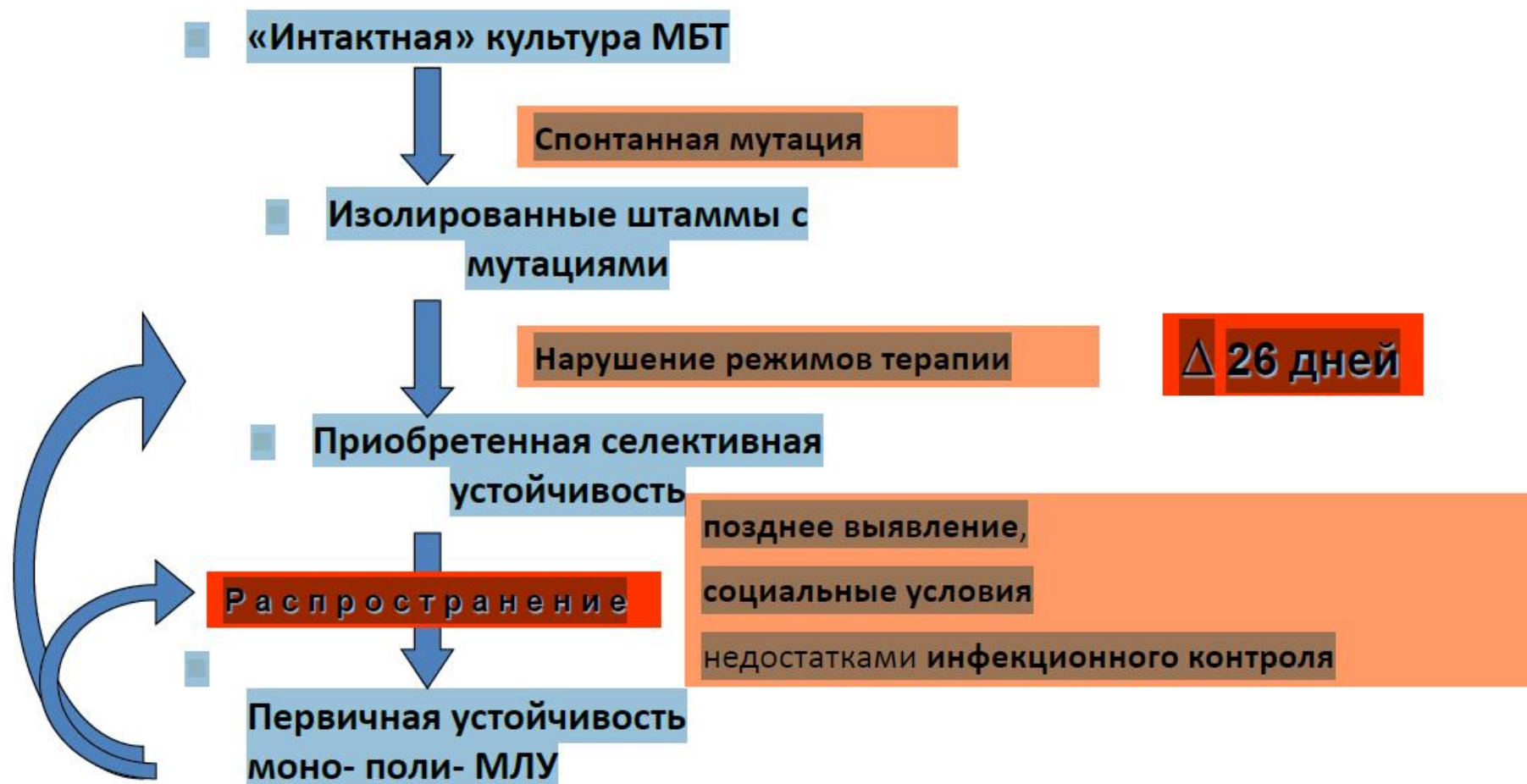
McDermott W., Muschenheim C., Hadley SJ, et al.
Streptomycin in the treatment of tuberculosis in humans.
Ann. Intern. Med. 1947; 27: 769-822

Crofton J., Mitchison DA Streptomycin resistance in
tuberculosis. BMJ 1948; 2: 1009-1015

- Микроорганизмы с ЛУ выявлялись у 90% больных после 4-х месячной монотерапии
- 5-летняя выживаемость после монотерапии стрептомицином была не лучше, чем при санаторном лечении.



Механизмы формирования лекарственной устойчивости МБТ



Виды устойчивости МБТ

Особенности терминологии:

В зависимости от того, получал ли пациент специфическую противотуберкулезную терапию до выделения возбудителя, различают **первичную и приобретенную устойчивость**

Первичная устойчивость

штаммы, выделенные от впервые выявленных пациентов, не получавших специфическую терапию или получавших менее 1 мес.

Приобретенная устойчивость (среди ранее леченных - ВОЗ): если устойчивый штамм выделен у пациента на фоне противотуберкулезной терапии, то есть прием препаратов происходил длительно более 1 мес.

Если невозможно установить факт применения противотуберкулезных препаратов, используют термин **"начальная"** устойчивость.

Множественная устойчивость микобактериям (MDR) являются микроорганизмы, устойчивые, как минимум, к рифампицину и изониазиду.

Широкая или экстенсивная устойчивость (XDR) – микобактерии MDR + Fq + Inj (Am / Ka / Cap)



Современные методы определения лекарственной чувствительности микобактерий

МТК

Культуральные

1) Колориметрический метод

2) Bactec MGIT 960

ПТП 1-го и 2-го ряда

6-13 дней

(после получения культуры)

Молекулярно-генетические
(1-3 дня)

- Биочипы
RIF, INH, Fq
- ДНК-стрипы (Hain-test)
 - GenoType® MTBDRplus
RIF, INH
 - GenoType® MTBDRsl
фторхинолоны
аминогликозиды/циклические пептиды
этамбутол
- Мультиплексная ПЦР
RIF, INH, Fq
- Секвенирование

НТМ

Культуральные

Sensititre TREK Diag
(Magellan Biosciences)



Колориметрический метод определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам I и II ряда

Время получения результата - 8-12 дней

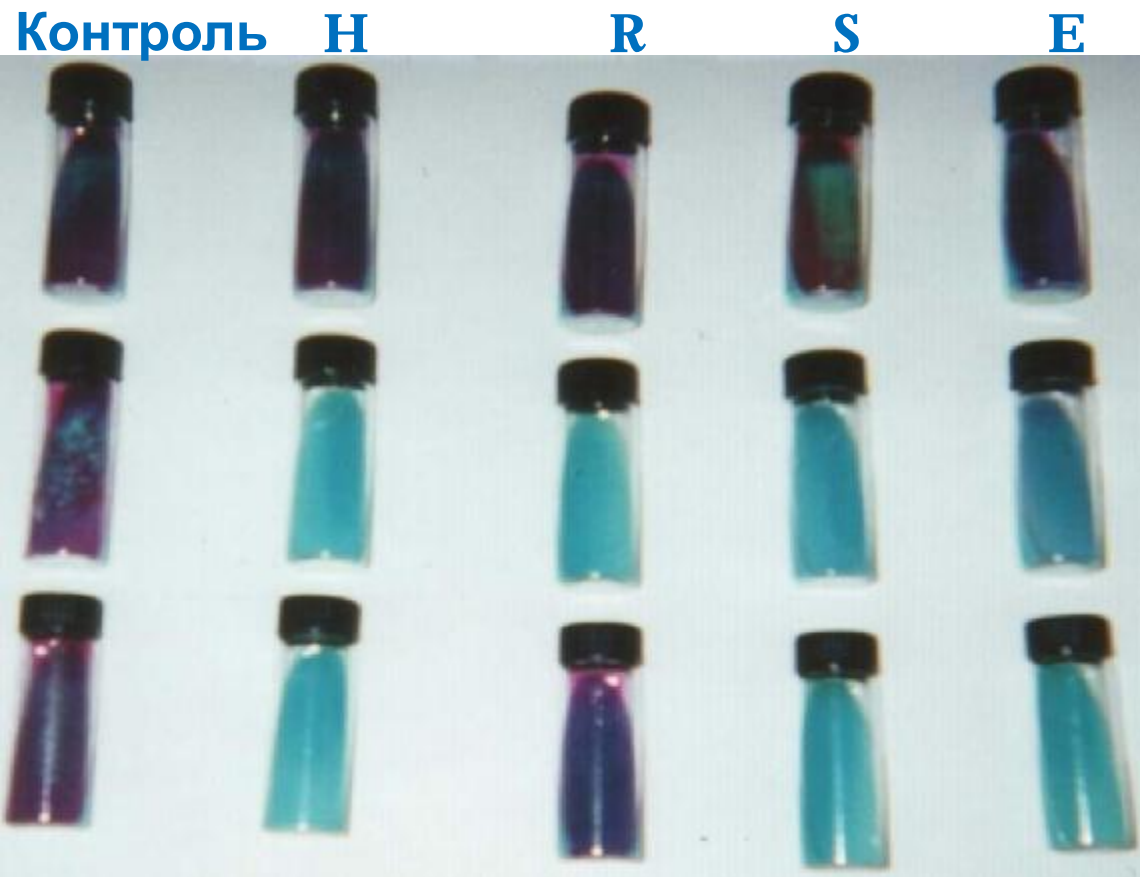
S – 10, H – 1, R – 40, E – 8 мкг/мл

K – 45, OfI – 4, Et – 30, Cap – 50, Cs – 30, PAS – 1 мкг/мл

Штамм МБТ,
устойчивый ко
всем препаратам

Штамм МБТ,
чувствительный ко
всем препаратам

Штамм МБТ,
устойчивый к RIF
ФГБУ «Санкт-Петербургский
институт фтизиопульмонологии»



Определение лекарственной чувствительности в автоматизированной системе BASTEC MGIT 960



- автоматический мониторинг роста микобактерий
- при достижении в контрольной пробирке значения единиц роста (growth units; GU=400) система сообщает о завершении теста
- культура считается устойчивой, если значение единиц роста более 100.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



Максимальное время исследования



набор SIRE Kit:
на 40 определений ЛЧ

На чувствительность к SIRE – 14 суток



На чувствительность к PZA – 21 сутки

набор PZA Kit:
на 50 определений ЛЧ

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



Молекулярно-генетические методы определения лекарственной устойчивости основаны на выявлении мутаций в геноме микобактерий

Препарат	Гены
Изониазид (H)	<i>katG</i> <i>inhA</i> , <i>ahpC</i> <i>kasA</i>
Рифампицин (R)	<i>rpoB</i>
Этамбутол (E)	<i>embCAB</i>
Пиразинамид (Z)	<i>pncA</i>
Стрептомицин (S)	<i>rpsL</i> , <i>rrs</i>

Препарат	Гены
Протионамид (Pto)	<i>inhA</i>
Парааминосалици- ловая кислота (PAS)	<i>thyA</i>
Фторхинолоны (Fq)	<i>gyrA</i>
Циклосерин (Cs)	<i>traA</i>
Канамицин (K)	<i>rrs</i>
Капреомицин (Cm) Виомицин(Vi)	<i>tlyA</i>



Рифампицин

Мишенью действия рифамицинов является фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза (ген *rpoB*).

Устойчивость к рифамицинам (рифампицину, рифабутину и др.) в подавляющем большинстве случаев (более 95% штаммов) связана с мутациями в сравнительно небольшом фрагменте β -субъединицы этого фермента.

Размер указанного фрагмента составляет 81 пару оснований (27 кодонов). Мутации в отдельных кодонах различаются по своему значению. Мутации в кодонах 526 и 531, обнаруживают высокий уровень резистентности к рифампицину (МПК > 32,0 мкг/мл) и другим рифамицинам.

Мутации в кодонах 511, 516, 518 и 522 сопровождаются низким уровнем устойчивости к рифампицину и рифапентину, при сохранении чувствительности к рифабутину.

В незначительной части случаев резистентность к рифамицинам связана с мутациями в других участках гена *rpoB*.



Изониазид

Изониазид (пролекарство). Для проявления антибактериальной активности молекула препарата должна быть активирована внутри микробной клетки. Активация происходит под действием фермента **каталазы-пероксидазы (ген *katG*)**. Мутации в этом гене (обычно в положении 315), приводящие к снижению активности фермента на 50%, обнаруживают приблизительно у половины изониазид резистентных штаммов микобактерий. Экспрессия этого гена, а также другого сходного с ним гена (ген *ahpC*), которые контролирует ген *oxyR*, также является мишенью активированной формы изониазида

Вторым механизмом устойчивости микобактерий к изониазиду является гиперпродукция мишеней действия активных форм препарата. Мишенями являются белки, участвующие в синтезе и транспорте предшественников миколовых кислоты: ацилированный белок-носитель (ген *asrM*), синтетаза (ген *kasA*) и редуктаза (ген *inhA*) белка-носителя.

Миколовые кислоты являются основным компонентом клеточной стенки микобактерий. Мутации обычно выявляются в промоторных областях перечисленных генов. Уровень устойчивости, связанной с гиперпродукцией мишеней, как правило, ниже, чем при мутациях в генах каталазы-пероксидазы.



Пиразинамид, как и изониазид, является пролекарством. После пассивной диффузии внутрь микробной клетки **пиразинамид** превращается в **пиразиновую кислоту** под действием фермента **пиразинамидазы** (ген *pnсA*).

Пиразиновая кислота ингибирует ферменты биосинтеза жирных кислот.

- 70-90% штаммов микобактерий, устойчивых к пиразинамиду, в структурных или промоторных областях пиразинамидазы обнаруживают мутации.

***M.bovis** обладает природной устойчивостью к пиразинамиду, благодаря специфической точечной мутации в 169 кодоне.*



Стрептомицин и другие аминогликазиды Канамицин, амикацин.

В отличие от большинства других микроорганизмов, устойчивость микобактерий к аминогликозидам не связана с продукцией АМФ.

У штаммов микобактерий, устойчивых к стрептомицину, обнаруживаются два вида мутаций, приводящих к модификации участка связывания антибиотика с малой субъединицей (23S) рибосомы: мутации в генах, кодирующих 16S рРНК (*rrs*), и генах, кодирующих S23 рибосомальный протеин (*rspL*).



Этамбутол

Мишенью действия этамбутола является белок арабинозилотрансфераза (**ген *embB***), участвующий в биосинтезе компонента клеточной стенки микобактерий – арабиногалактана – каркаса клеточной стенки МБТ, сложным образом удерживающего миколовые кислоты.

Устойчивость к этамбутолу, в 70% случаев, связана с точечной мутацией гена ***embB***.



Фторхинолоны

Механизмы устойчивости микобактерий к фторхинолонам не отличаются от механизмов, выявляемых у других микроорганизмов, и связаны с мутациями в генах **ДНК-гиразы**.

Основной мишенью фторхинолонов является энзимы, обеспечивающие транскрипцию ДНК – ДНК-гираза, состоящая из субъединиц 2*А и 2*В (**гены *gyrA* и *gyrB* соответственно**) и **ДНК-топоизомераза-II, состоящая из субъединиц 2*С и 2*Е (соответствующие гены *parC* и *parE*)**, Трансформация фторхинолонсвязывающего участка субъединиц А вследствие мутации в локусе *gyrA* были найдены у ряда видов бактерий с высоким уровнем устойчивости. Эти мутации обнаружены в 42-85% случаев выявленных клинических изолятов.

Другие ассоциированные с резистентностью мутации найдены в генах *gyrB*, снижающих внутриклеточную концентрацию препарата, а также в дополнительных генных локусах топоизомераз. У *M.tuberculosis* мутанты со спонтанной устойчивостью к ципрофлоксацину появляются с частотой от **10⁻⁷ до 10⁻⁸ при концентрациях 2 мкг/мл.**

• **Активное выведение.** В последние годы накапливаются данные о широком распространении у МБТ механизмов, связанных с активным выведением хинолонов – эфлюксом. У штаммов с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам этот механизм часто сочетается с модификацией мишеней



Циклосерин (D-циклосерин)

Один из механизмов действия циклосерина на *M.tuberculosis* - подавление синтеза пептидогликанов путем блокирования действия D-аланин рацемазы и D-аланин синтетазы.

Устойчивость *M.tuberculosis* к этому препарату может являться следствием модификации и гиперпродукции указанных ферментов.
(*M.stegmatis* устойчива к циклосерину, т.к.имеет ген D-аланин рацемазы *alrA*)



Капреомицин Ингибируют синтез белка путем нарушения функций рибосом. Канамицин связывается с 70S рибосомальной субъединицей, ингибитруя транслокацию и вызывая ошибки считывания в процессе синтеза белков.

Этионамид Действует на уровне ингибирования синтеза миколовых кислот клеточной стенки и приводит к потере кислотоустойчивости. В некоторых клинических изолятах *M.tuberculosis* с низким уровнем устойчивости к изониазиду наблюдали перекрестную устойчивость этионамида с изониазидом, и клонированный и охарактеризованный ген *inhA* помог в понимании этого.

Макролиды Устойчивость *M. avium-intracellulare* к макролидам определяется модификацией мишени их действия. У устойчивых штаммов обнаруживают замену аденина в 2058 положении молекулы 23S РНК.

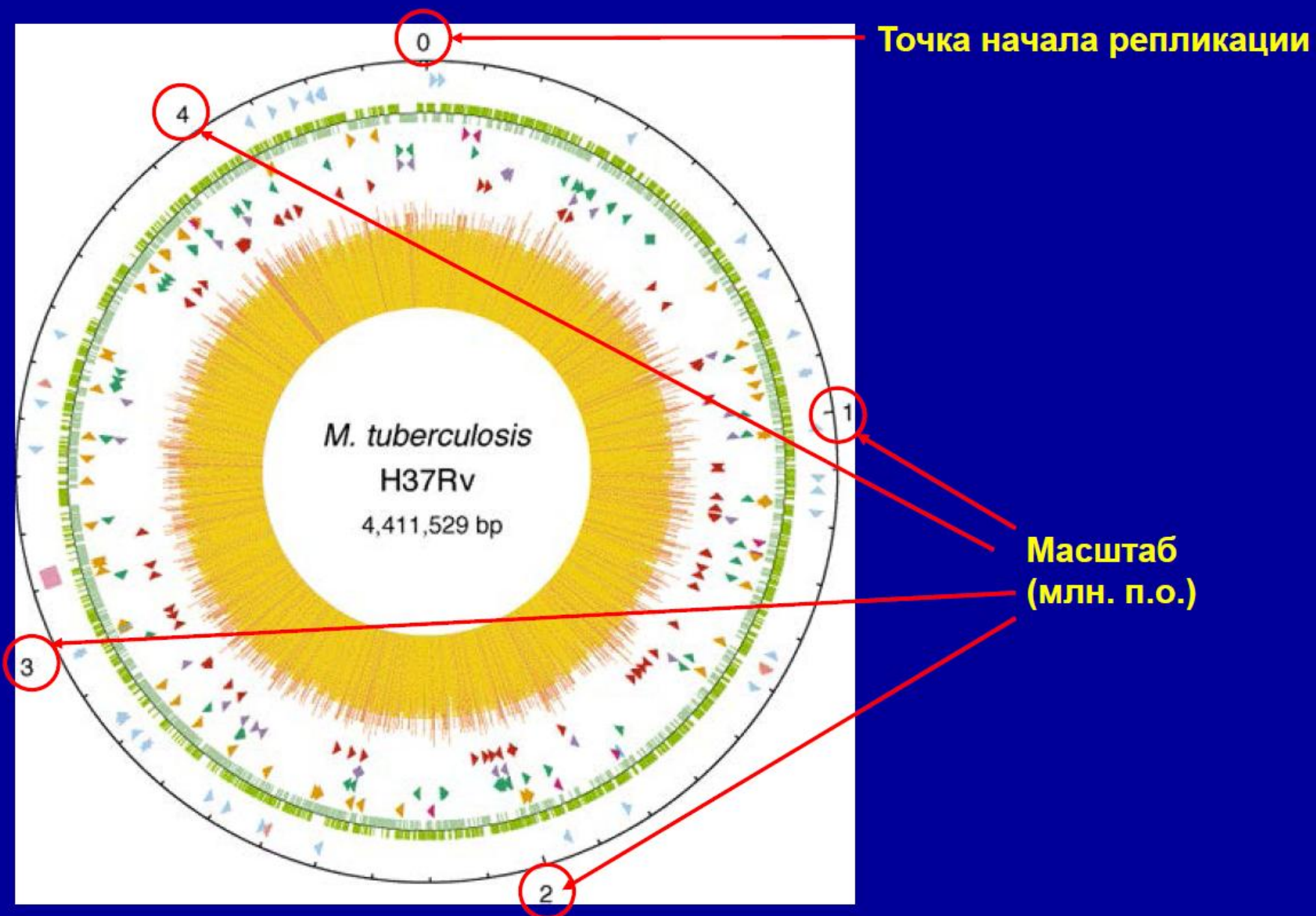


В 1998 г. была опубликована нуклеотидная последовательность хромосомы штамма *M.tuberculosis* H37Rv (Cole S.T. et al., Nature, 1998).

Хромосома представляет собой кольцевую структуру.
*Протяженность генома - **4 411 529 пар оснований.***
Геном содержит более 4 000 генов



Карта хромосомы *M.tuberculosis* H37Rv



Основные технологические решения на основе генома микобактерий для выявления, идентификации, определения мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью будут освещены на онлайн лекции.



Система GeneXpert

Полностью автоматическая система ПЦР
в реальном времени для быстрой
диагностики *Mycobacterium tuberculosis*
и резистентности к рифампицину



Система GeneXpert – ПЦР лаборатория в картридже



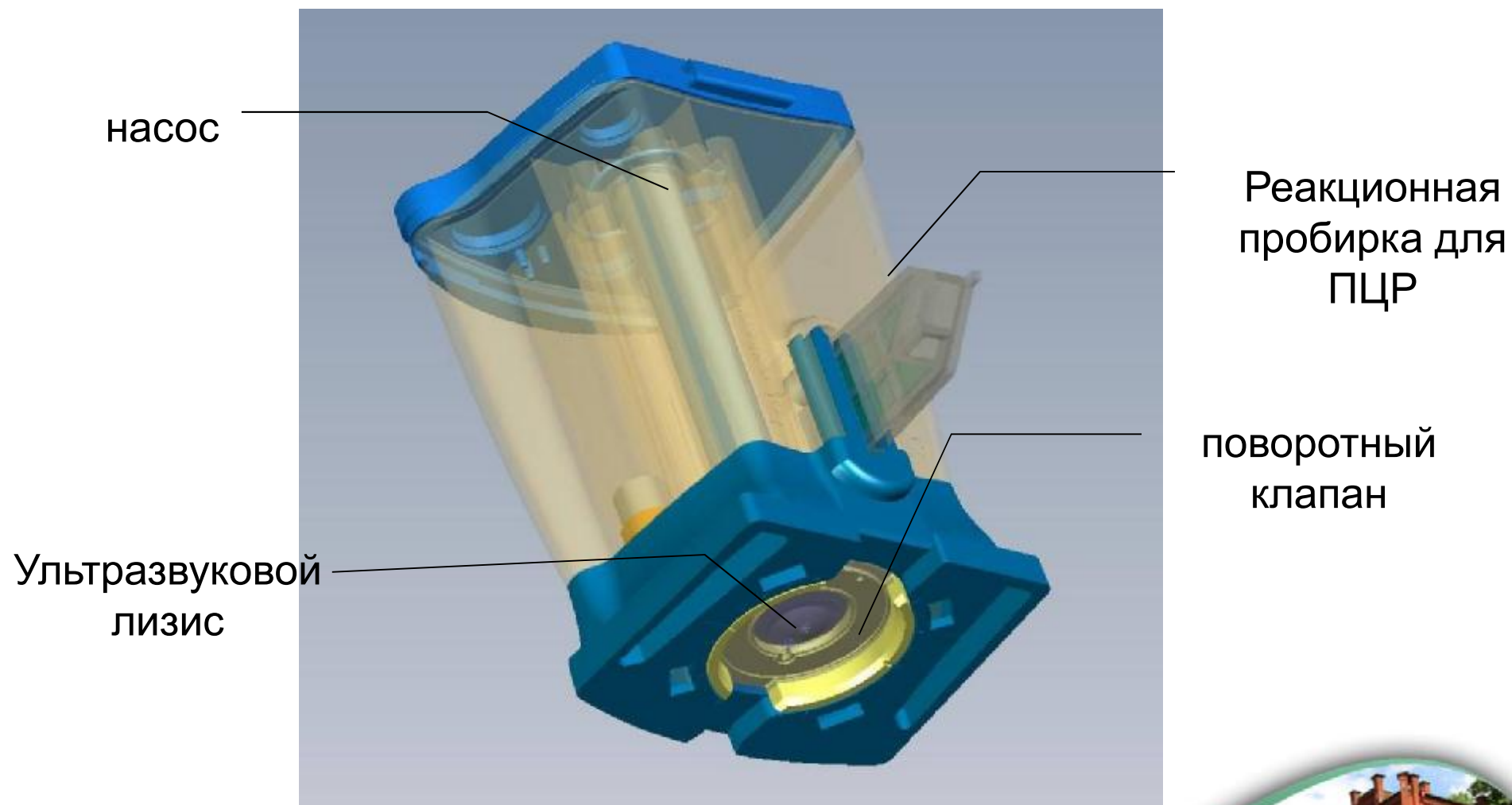
**Просто – быстро –
надёжно:
1 пациент - 1 картридж - 1
модуль**

- Полностью автоматизированная подготовка проб для амплификации
- Мультиплекс ПЦР в реальном времени
- Независимые модули
- Время подготовки проб – 15 мин.
- Время до получения результата - менее 2ч.
- Автоматическая интерпретация результатов
- Нет необходимости в ПЦР лаборатории
- Нет необходимости в специально обученном персонале

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России



Секрет – микрожидкостный картридж

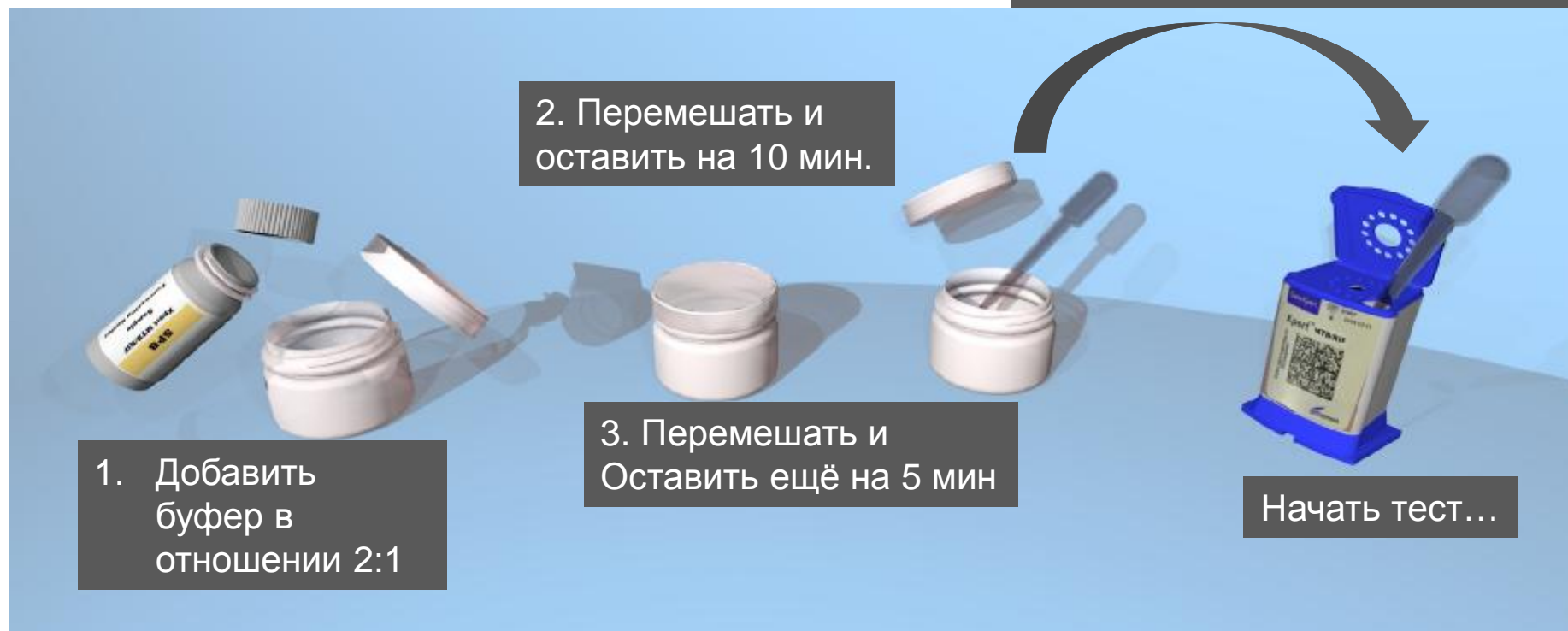


ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России

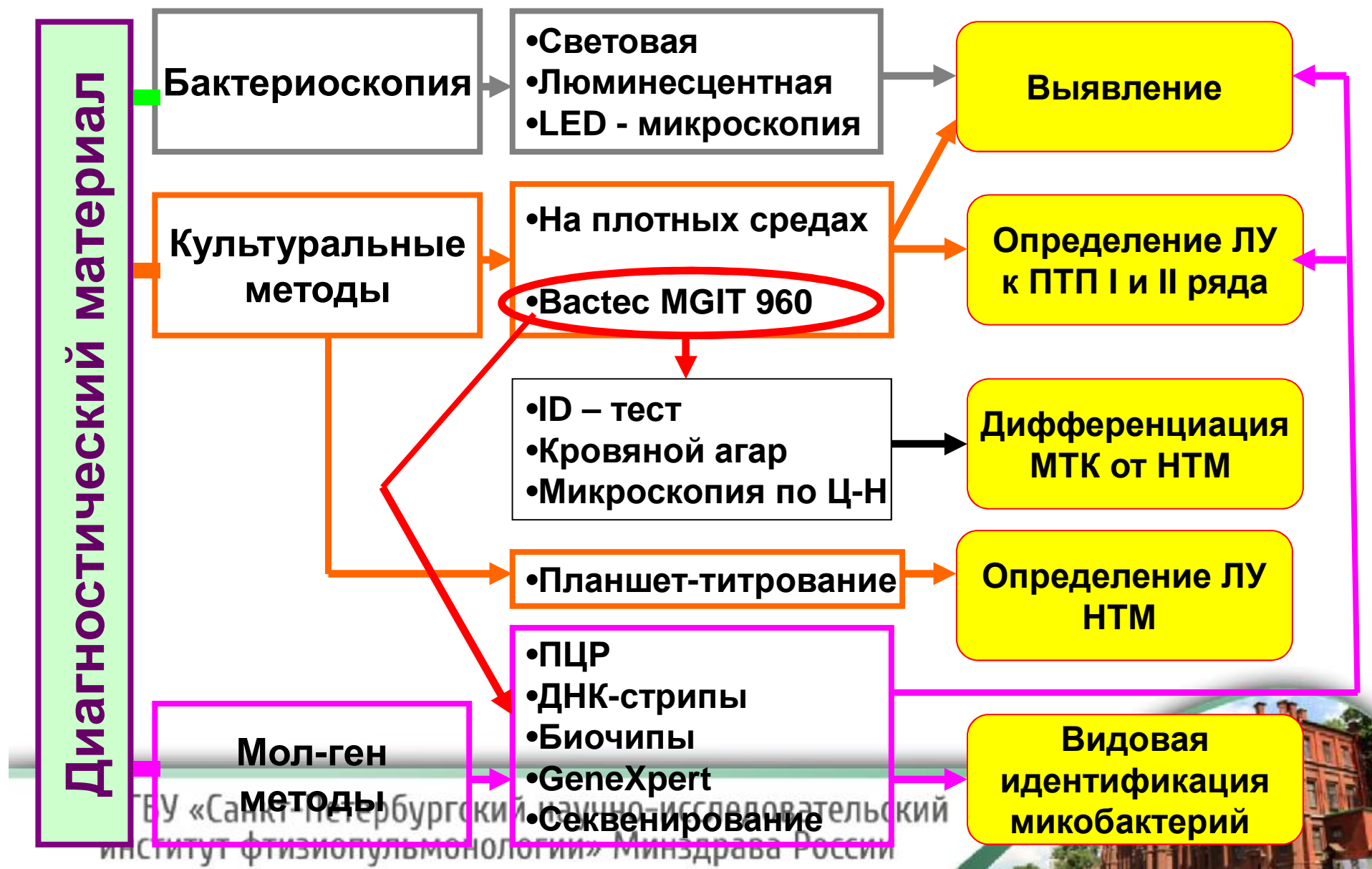


Простая обработка образца - мокрота

4. Добавить 2 мл обработанной
клинической пробы в картридж



Современный алгоритм микробиологической диагностики туберкулеза



Методы на ранних этапах внедрения

Название	Описание	Место применения
Анализатор выдыхаемого воздуха (при кашле)	Портативный анализатор летучих органических компонентов в воздухе, выделяемом при кашле	поликлиники, амбулатории
Метод изотермальной амплификации (LAMP)	ДНК амплификация, с образованием петель, возможна визуальная детекция, не требуется термоциклер.	периферические лаборатории
Определение липоарабиноманнана в моче	ЛАМ <i>M. tuberculosis</i> выделяется с мочой больными ТБ. ИФА или полоски	периферические лаборатории

