

frequencies did not deviate from equilibrium. In the same group frequency of alleles adiponektin gene for T and G was 0,55 and 0,45 correspondingly. Heterozygotes TG were 1,55-fold higher than in panmictic population; on the contrary, homozygotes were twice lower.

ЧЕРЕДНИК Ю.А.¹, КУЗЬМИН А.В.², ЧЕРНОУСОВА Л.Н.², АНОПРИЕНКО О.В.³, ГОРОВЕНКО Н.Г.⁴, КОСТРОМИНА В.П.¹, БЕЛОГОРЦЕВА О.И.¹

¹*Институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского АМН Украины, ул. Н. Амосова, 10, г. Киев, 03680, Украина.*

²*Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, г. Москва, Россия.*

³*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Заболотного, 150, г. Киев, 03143, Украина.*

⁴*Киевская Медицинская Академия последипломного образования им. Шупика П.Л. МЗ Украины, ул. Дорогожицкая, 9, г. Киев, 03112, Украина.*

E-mail: yurach@ukr.net

ДНК-ДИАГНОСТИКА И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *M.tuberculosis* У ДЕТЕЙ С ЛЕГОЧНОЙ ФОРМОЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

По данным ВОЗ за последние несколько лет заболеваемость туберкулезом среди взрослого населения выросла в несколько раз. Ежегодно в мире туберкулезом заболевает свыше 8 млн. человек, и более 2 млн. человек умирает от этой болезни. В Украине каждый год от туберкулеза умирает свыше 10 тысяч человек. Отмечено увеличение количества случаев заболевания у лиц с впервые выявленным туберкулезом, среди которых каждым девятым больным является ребенок [1]. Растет число больных детей разных возрастных групп с преобладанием острых, быстро прогрессирующих деструктивных процессов.

Отсутствие «золотого стандарта» лабораторной диагностики туберкулеза у детей делает необходимым разработку и применение новых современных диагностических процедур, поскольку традиционные методы диагностики туберкулеза, такие как бактериоскопический и культуральный характеризуются продолжительностью выявления МБТ, недостаточной специфичностью и чувствительностью. Так, с помощью бактериоскопии выявляется лишь 10-15% детей с вероятным диагнозом туберкулез, и 30-40% с помощью культурального метода [2]. В последнее время для повышения эффективности лабораторной диагностики туберкулеза разработан целый ряд новых микробиологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов. К наиболее перспективным относятся в первую очередь подходы, основанные на использовании техники ПЦР.

Имеющиеся данные по применению ПЦР для диагностики туберкулеза у детей демонстрируют различные результаты проводимых исследований [1]. Некоторые исследователи отмечают низкую чувствительность ПЦР-тестов у детей, что не позволяет исключить диагноз туберкулез в случае отрицательного анализа. Проблема недостаточной специфичности ПЦР проявляет себя в тех регионах, где ТБ – эндемическое заболевание и латентная инфекция *M.tuberculosis* (МБТ) является обычной [2]. Тем не менее, ряд подходов с использованием ПЦР, демонстрируют хорошие результаты, которые позволяют более эффективно использовать ПЦР процедуру для диагностики ТБ у детей [3, 4]. Методы на основе ПЦР являются незаменимыми для быстрого выявления микобактерий туберкулеза их идентификации на уровне вида и штамма, изучения эпидемиологических путей распространения инфекции с помощью генотипирования микобактерий, определения мутаций, ответственных за лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам (АМБП). Применение новых микрочип-технологий для решения данных задач

позволит автоматизировать и значительно сократить сроки проведения диагностической процедуры за счет высокой чувствительности и возможности одновременного проведения нескольких реакций на одном чипе [5].

Целью работы является оценка эффективности быстрого выявления МБТ в клиническом материале и определение генотипических характеристик *M.tuberculosis* у детей с легочной формой туберкулеза молекулярно-биологическими ПЦР-диагностическими и методами микрочип-детекции на протяжении комплексной антимикобактериальной терапии.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на образцах 60 детей (мокрота, венозная кровь, изоляты) с впервые диагностированным легочным туберкулезом, которые проходили лечение в ИФП в течение 2007-2008 годов. 36 пациентов составляли девочки и 24 – мальчики, средний возраст составлял $14,4 \pm 0,3$ года. Образцы анализировали классическим микроскопическим и микробиологическими методами, а также методом ПЦР-диагностики, при поступлении в стационар до начала лечения, через два месяца после начала терапии и после клинического выздоровления.

ПЦР-положительные образцы мокроты, отобранные при поступлении больного, анализировали на биологических микрочипах для сполиготипирования (DR-микрочип) и определения устойчивости к фторхинолонам (ТБ-Биочип-2), разработанных в ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН. Работа проводилась на базе ЦНИИТ РАМН согласно инструкциям разработчиков.

Результаты и обсуждение

Преобладание первичных форм легочного туберкулеза среди детей в исследуемой группе сказывалось на низком проценте бактериовыделителей. Частота обнаружения *M.tuberculosis* традиционными методами в начале терапии составляла $20,3 \pm 4,4\%$. Результаты обнаружения МБТ в клинических образцах методом ПЦР – $48,3 \pm 6,9\%$ в крови и $51,7 \pm 7,1\%$ в промывных водах бронхов. Частота обнаружения МБТ спустя два месяца после начала терапии ПЦР-тестом, составляла $23,3 \pm 4,7\%$ в обоих образцах, что на 16,6 % выше, чем традиционными методами – $5,7 \pm 2,4\%$ случаев. В конечной точке терапии ПЦР обнаруживал МБТ в $3,3 \pm 1,3\%$ препаратов крови и $10,0 \pm 2,9\%$ респираторных образцов (в 3,07 раза больше ($P < 0,05$)), а традиционные микроскопический и микробиологический методы не выявляли МБТ.

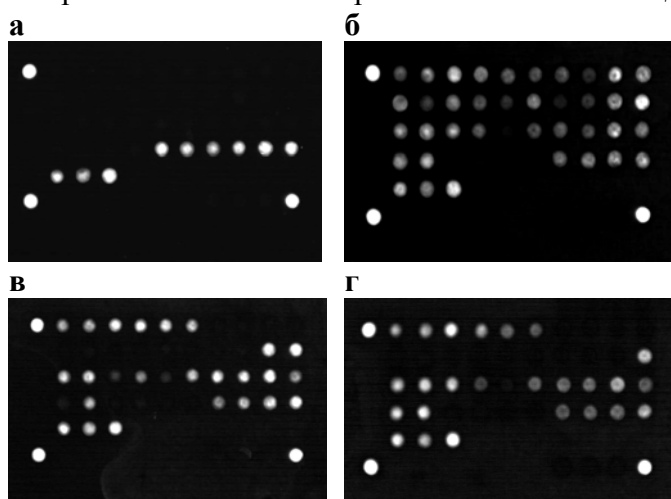


Рисунок 1. Результаты сполиготипирования некоторых изолятов, полученных из клинического материала детей с ТБОД. а – распределение точек гибридизации, характерное для штамма МБТ Beijing $\Delta 1-34$; б – подтип МБТ T1, с отсутствующим районом с 33 по 36 спейсер, обозначаемым F; в – штамм МБТ $\Delta 7-17$ и E (делеция 31 спейсера и F); г – подтип МБТ $\Delta 7-19$ и F.

Характеристика штаммов МБТ, выявленных в клинических образцах детей больных туберкулезом, была выполнена методом сполиготипирования (от англ. spacer oligonucleotide typing), основанного на ПЦР и последующей гибридизации ПЦР-продуктов с зондами, соответствующими спейсерным участкам локуса прямых повторов (DR) генома микобактерий [6]. Преимуществом метода сполиготипирования является возможность одновременной детекции возбудителя, причем анализ может выполняться непосредственно на клиническом образце без предварительного

подращивания культуры, а также способность дискриминировать штаммы микобактерий туберкулезного комплекса *M. tuberculosis* и *M. bovis*, что представляет серьезные трудности при использовании традиционных культуральных методов, особенно, при диагностике детского туберкулеза.

Локус DR представляет собой многократно повторяющиеся идентичные участки длиной 36 п.н., между которыми расположены уникальные спейсерные последовательности длиной от 24 до 41 н.п. Различные штаммы характеризуются наличием разного числа таких спейсерных последовательностей, что позволяет определять происхождение штамма и проводить эпидемиологические исследования. Метод был изначально предложен для внутривидового типирования *M. tuberculosis* [7], а впоследствии успешно распространен на штаммы *M. bovis*. Проведенные исследования позволили создать в разных странах обширные локальные коллекции и базы данных сполиготипов штаммов МБТ. Несмотря на меньшую дискриминирующую способность по сравнению с другими общепринятыми методами типирования [8, 9], дешевизна метода, простота его выполнения и интерпретации получаемых гибридационных профилей являются несомненными преимуществами. Для увеличения дискриминирующей способности существующего теста, включающего 43 спейсерные последовательности, был разработан расширенный вариант, содержащий 94 олигонуклеотида [10]. Существует также возможность проведения типирования в лаборатории без использования коммерческого теста, что уменьшает стоимость, но увеличивает время проведения анализа. Кроме того, чувствительность такого варианта на сегодня уже недостаточна. Применение новых технологий микрочипов позволяет при высокой чувствительности максимально сократить время проведения анализа, автоматизировать его и минимизировать расход материалов.

Методом сполиготипирования на микрочипе были определены штаммы МБТ для 12 образцов, из которых 50% составлял тип Beijing (Пекинский). Для сполиготипа данного семейства характерным является отсутствие спейсеров с 1 по 34 ($\Delta 1-34$) (Рис 1. а). Среди штаммов "не-Пекинского" типа были выявлены штаммы T1, а также один уникальный штамм (Рис 1. б, в, г). Известно, что среди больных, которые выделяют МБТ семейства Beijing, достоверно чаще встречается резистентность к АМБП, эти штаммы неблагоприятно влияют на ход туберкулезного процесса, нормализацию интоксикационного синдрома и прекращение бактериовыделения. Полученные в результате исследования сполиготипы пополняют базу данных генотипов, которые распространены на территории Украины [9].

Увеличение количества штаммов МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-МБТ), а также появление экстремально-устойчивых штаммов делает остро необходимой быструю диагностику лекарственной резистентности. Фторхинолоны являются эффективными антимикробными препаратами второго ряда противотуберкулезной терапии. Устойчивость к фторхинолонам у микобактерий чаще всего вызвана мутациями гена *gyrA*, хотя возможны мутации и в других районах, вызывающие низкую степень устойчивости. Ранее микрочипы были эффективно применены для выявления устойчивости к антибиотикам первого ряда [5, 11]. Проанализированные образцы клинического материала детей больных туберкулезом не выявили устойчивых штаммов, в отличие от контрольных изолятов взрослых больных с известной устойчивостью к фторхинолонам, выявившим мутации в позициях 90 и 94 аминокислот гена *gyrA*. По результатам определения чувствительности МБТ к фторхинолонам на микрочипах, а также с учётом анамнестических и клинкорентгенологических данных детей, больных туберкулезом лёгких, была назначена адекватная схема противотуберкулезной химиотерапии.

Выявление *M. tuberculosis* ПЦР-методами помогает диагностировать специфический процесс особенно в случаях, когда подтверждение этиологии болезни микроскопическими и микробиологическими методами невозможно. Тем не менее, чувствительность ПЦР-теста у детей ниже, чем у взрослых. Целесообразным является

продолжение поиска путей повышения информативности ПЦР с целью использования ее результатов в качестве контроля критерия бактериовыделения у детей. Также целесообразным является расширение базы данных генотипов МБТ, распространенных на территории Украины путем скрининга изолятов.

Литература

1. *Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S., et al.* Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2006 – vol. 173, № 10. – P. 1078-1090.
2. *Marais B.J., Pai M.* Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis // *Arch. Dis. Child.* – 2007 – vol. 92. – P 446-452.
3. *Wolf H., Mendez M., Gilman R.H.* Diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis by stool PCR // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2008 – vol. 79, № 6 – P. 893-898.
4. *Kulkarni S.P., Jaleel M.A., Kadival G.V.* Evaluation of an in-house-developed PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis in Indian children // *J. Med. Microbiol.* – 2005 – vol. 54 – P. 369-373.
5. *Gryadunov, V. Mikhailovich, S. Lapa, et al.* Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin Microbiol Infect.* – 2005 – vol. 11 – P. 531-539.
6. *Hermans P.W., van Soolingen D., Bik E.M., et al.* Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains // *Infect Immun.* – 1991 – vol. 59, № 8 – P. 2695-7025.
7. *J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *J. Clin. Microbiol.* 1997. – vol. 35. – P. 907-914.
8. *Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – vol. 37, № 8 – P. 2607-2618.
9. *Чередник Ю.А., Аноприенко О.В., Феценко Ю.И.* Молекулярно-генетическое типирование клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* в Украине // *Український пульмонологічний журнал* – 2005 – № 4 – С. 66-68.
10. *Van der Zanden A. G. M., Kremer K., Schouls L. M., et al.* Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides // *J. Clin. Microbiol.* – 2002 – vol. 40 – P. 4628-4639.
11. *Denkin S., Volokhov D., Chizhikov V., Zhang Y.* Microarray-based *pncA* genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Med. Microbiol.* – 2005 – vol. 54 – P. 1127-1131.

Резюме

Проведена оценка возможности быстрого выявления МБТ в клиническом материале и определение генотипических характеристик *M.tuberculosis* у детей с легочной формой туберкулеза молекулярно-биологическими PCR-диагностическими и методами микрочип-детекции на протяжении комплексной антимикобактериальной терапии.

Проведена оцінка можливості швидкого виявлення МБТ в клінічному матеріалі і визначення генотипових характеристик *M.tuberculosis* у дітей з легеневою формою туберкульозу молекулярно-біологічними PCR-діагностичними і методами мікрочіп-детекції впродовж комплексної антимікобактеріальної терапії.

Capability of fast TB pathogen detection in clinical specimens and genotypic characteristics of *M.tuberculosis* from children suffering from lung tuberculosis by PCR-diagnostic method and microchip-detection method during the course of complex antimycobacterial therapy is presented.

ШАПОШНИКОВА В. М.

*ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”,
040050, Київ, вул. Мельникова, 53*

ЧАСТОТА ВРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ЧЕРКАСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Питання вроджених вад розвитку та спадкової патології є на сьогодні досить актуальним та проблематичним в медицині та в суспільстві в цілому. За даними ряду авторів, фактори довкілля є причиною від 30 до 50% вроджених вад розвитку [3-5]. В Україні це питання постало особливо актуально після Чорнобильської катастрофи, внаслідок забруднення радіонуклідами значної території країни. В світовій та вітчизняній літературі, фіксуються різні статистичні показники частоти вроджених вад розвитку (12,6–40 на 1000 новонароджених). За висновками міжнародних та європейських організацій, які досліджують тенденції щодо вродженої та спадкової патології (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring systems, EUROCAT) розбіжності у частоті та структурі цих вад можуть бути пов’язані з різними підходами до діагностики, різними стандартами дослідження, недостатнім фаховим рівнем лікарів з даного питання [2, 8]. За даними європейських дослідників (Франція, Іспанія, Угорщина, Польща) частота вроджених вад розвитку у новонароджених дітей в середньому становить 16–20:1000, хоча очікувана їх частота мала б бути значно вищою – 60:1000 [1-3, 8].

В Україні загальна поширеність вроджених вад розвитку у новонароджених має виражені регіональні відмінності, які пояснюють, переважно, різним рівнем забруднення довкілля [6-11]. Територія Черкаської області частково забруднена внаслідок аварії на ЧАЕС, насичена хімічними відходами та промисловими викидами. Метою роботи було проаналізувати динаміку частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007 рр., виявити регіональні відмінності в частоті цих патологій та взаємоз’язки з екологічним станом довкілля.

Матеріали і методи

В процесі дослідження використані дані медичної статистики закладів охорони здоров’я області, обласного центру медичної статистики, матеріали медико-генетичних консультацій, пологових будинків. Об’єктом дослідження були новонароджені в Черкаській області за 1997-2007 рр. Проаналізовано 3198 сповіщень про реєстрацію вроджених вад розвитку у пологових стаціонарах за 1997-2007 рр., розраховано частоту вроджених вад розвитку на 1000 народжених живими як по області в цілому, так і в радіаційно-забруднених та умовно «чистих» районах.

Результати та обговорення

Динаміка частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007рр. представлена в таблиці 1. Середня частота вроджених вад розвитку за досліджуваний період дорівнює 27,5 випадків на 1 000 н/н і є порівнюваною з рівнем, який спостерігається в Україні, а також в європейських популяціях [1, 2, 11].

Таблиця 1

Частота вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007рр.

Рік	Частота вроджених вад розвитку (на 1000 н/н)
1997	27,4