

В связи с этим особый интерес представляет определение загрязнения воздушной среды помещений ПТУ микобактериями туберкулеза (МБТ).

Цель. Усовершенствование и разработка методов выявления МБТ в воздушной среде.

Материалы и методы. Для обоснования актуальности проблемы изучена заболеваемость туберкулезом населения РФ, а также медицинских работников ПТУ и взрослого населения в Свердловской области за 13 лет. Выполнено 2 экспериментальных исследования (всего 180) с использованием суспензий лабораторных штаммов *M. smegmatis* и H37Ra, уточнена разрешающая способность имеющегося метода выявления МБТ в воздушной среде в сравнении, во-первых, с методом, усовершенствованным нами, а во-вторых, с применением модификации усовершенствованного метода и предложенного нами нового устройства. Кроме экспериментальных исследований, проведены исследования воздушной среды на загрязненность микобактериями в различных подразделениях ПТД (всего 196 проб). У выделенных микобактерий изучались морфологические, культуральные, биохимические свойства. Для описания количественных показателей использовали среднее и ошибку среднего значения ($M \pm m$). В статистической обработке полученных данных использовали критерий достоверности Стьюдента, Манна-Уитни.

Результаты. Установлено, что заболеваемость туберкулезом медицинских работников противотуберкулезных учреждений Свердловской области превышает заболеваемость туберкулезом населения в 4 раза и в среднем за 2000–2012 гг. этот показатель составлял $53,7 \pm 6,8\%$ и $14,6 \pm 1,2\%$ соответственно. Больше всего случаев впервые выявленного туберкулеза у медицинских работников было обнаружено во фтизиатрических легочных отделениях (65%), третья часть от всех пришлась на диспансеры (поликлиники) — 26%, и в меньшей степени они фиксировались в бактериологической лаборатории — 5%. Эксперимен-

тальные исследования показали, что при распылении в камере взвесей аэрозолей микобактерий H37Ra и *M. smegmatis* с использованием обоих методов результаты по выявляемости микобактерий были выше, чем при отборе воздуха предложенным методом с помощью ПУ-1Б ($p \leq 0,001$). Кроме того, отмечалось выявление микобактерий при их меньших концентрациях в воздухе при отборе воздуха модифицированным способом с использованием «Устройства для отбора проб воздуха», что является более ценным. Результаты исследования воздушной среды помещений Свердловского областного противотуберкулезного диспансера показали, что МБТ были выявлены практически во всех исследуемых подразделениях: в бактериологической лаборатории, в поликлинике и отделениях лечения бактериовыделителей — и с формами, вызванными микобактериями с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Проведенные исследования показали, что при отборе проб воздуха «Устройством для отбора проб воздуха» результативность выявления МБТ повысилась в 2 раза (17 против 8) и составила $20,2 \pm 4,01$ против $9,5 \pm 2,93\%$ соответственно.

Выводы. 1. Заболеваемость туберкулезом медицинских работников противотуберкулезных учреждений Свердловской области превышает заболеваемость туберкулезом населения и за 2000–2012 гг. в среднем составляет $53,7 \pm 6,8\%$ и $14,6 \pm 1,2\%$ соответственно. 2. Для контроля воздуха на МБТ предложены два метода, сравнение которых показало, что частота выявляемых МБТ увеличилась в 2 раза с использованием «Устройства для отбора проб воздуха» и модификации метода. 3. МБТ были обнаружены в отдельных помещениях и во всех подразделениях, где фиксировались случаи заболевания туберкулезом медицинских работников. 4. В ПТУ необходимо планировать обследования воздуха на МБТ и ввести предложенную методику в производственный лабораторный контроль для прогнозирования заболеваемости и своевременного проведения профилактических мероприятий.

Комплексный молекулярно-генетический анализ образцов в микробиологической лаборатории

Д.В. Зименков, Е.В. Кулагина, В.Ю. Журавлев, А.С. Заседателей, Д.А. Грядунов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН;
Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии

Введение. Род *Mycobacterium* состоит из нескольких групп кислотоустойчивых микобактерий, среди которых встречаются патогенные для челове-

ка и животных. Кроме безусловных патогенов человека, таких как *M. tuberculosis* и *M. leprae*, целый ряд условно-патогенных микобактерий может вызывать

микобактериозы. Для микобактериозов характерно отсутствие диагностически значимых различий в клинико-рентгенологических и морфологических проявлениях специфического поражения. При этом существует межвидовое разнообразие в спектре естественной резистентности к действию антибактериальных препаратов, что приводит к необходимости определения вида микобактерий для верификации диагноза и назначения адекватной терапии. В отличие от неконтагиозных заболеваний, вызываемых нетуберкулезными микобактериями, для которых характерен низкий уровень передачи от человека к человеку, параллельная эволюция *H. sapiens* и *M. tuberculosis* насчитывает десятки тысяч лет. В настоящее время в человеческой популяции циркулирует несколько семейств *M. tuberculosis*, различающихся вирулентностью и трансмиссивностью, и ассоциацией с приобретенной лекарственной устойчивостью. Формы туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью значительно чаще ассоциированы с семейством Beijing, которое превалирует в структуре популяции возбудителя туберкулеза в России. Предварительное определение генотипа также имеет большое значение и для эпидемиологического мониторинга.

Таким образом, распространение устойчивых форм туберкулеза и неуклонно возрастающее количество микобактериозов ставят задачу разработки методов быстрой диагностики для эффективного лечения пациентов и предотвращения трансмиссии опасных штаммов.

Материалы и методы. Диагностическая платформа представляет собой совокупность тест-систем (наборов реагентов), основным элементом которых являются биочипы, состоящие из массива гидрогелевых ячеек, содержащих олигонуклеотидные зонды, специфичные к последовательностям микобактериального генома. Процедура анализа включает мультиплексную амплификацию и флуоресцентное маркирование фрагментов генома микобактерий с последующей гибридизацией полученных ПЦР-продуктов на биочипе. Учет и интерпретация результатов гибридизации проводятся в автоматическом режиме с использованием универсального аппаратно-программного комплекса для анализа биочипов, с выдачей результата о присутствии ДНК микобактерий в образце, наличии/отсутствии мутаций, ответ-

ственных за устойчивость к определенному химиопрепарату, генотипе микобактерий туберкулезного комплекса или виде микобактерии при анализе соответствующего биочипа.

Результаты. Разработаны и зарегистрированы в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения РФ новое поколение биочипов и набор реагентов ТБ-ТЕСТ на его основе, предназначенный для выявления форм туберкулеза, отличающихся широкой лекарственной устойчивостью. Методика позволяет идентифицировать суммарно 128 генетических детерминант устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, канамицину, амикацину, капреомицину и этамбутолу. Одновременно с идентификацией возбудителя туберкулеза и анализом генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости набор ТБ-ТЕСТ позволяет устанавливать генотип наиболее распространенных на территории РФ штаммов *M. tuberculosis*, таких как Beijing, Beijing B0, Haarlem, LAM, Ural.

Набор реагентов СПОЛИГО-БИОЧИП предназначен для типирования микобактерий туберкулезного комплекса с использованием специализированного биочипа. Набор позволяет дифференцировать микобактерии туберкулеза человеческого или бычьего типов, а также устанавливать генотип *M. tuberculosis*, что важно не только с эпидемиологической, но и с клинической точки зрения. Принцип действия набора основан на анализе 43 последовательностей спейсеров, фланкированных прямыми повторами. Результат генотипирования выдается в виде информации о профиле (сполиготипе) штамма микобактерий туберкулезного комплекса в соответствии с международной базой данных SPOLDB4.

Набор реагентов МИКО-БИОЧИП позволяет дифференцировать 35 видов микобактерий, в том числе входящих в MTBC (*M. tuberculosis* complex) и MAC (*M. avium* complex).

Выводы. Разработанный комплексный подход эффективно решает большинство молекулярно-генетических задач, стоящих перед диагностической лабораторией учреждений противотуберкулезной службы. Единый формат анализа, отвечающий самым современным требованиям, может обеспечить быстрое внедрение как и среди уже использующих в своих исследованиях наборы серии «ТБ-Биочип», так и среди новых пользователей.