

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО
РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФГУ «ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЗАЦИИ И ИНФОРМАТИЗАЦИИ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ»**

**РУКОВОДСТВО
ПО
ВЫЯВЛЕНИЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА И
ОПРЕДЕЛЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧИПОВ**

Москва, 2009

Организации разработчики:

ФГУ «Центральный НИИ организации и информатизации здравоохранения»
ГУЗ «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом» Департамента здравоохранения города Москвы

Авторский коллектив: **Сон И.М.** – д.м.н., профессор (ЦНИИОИЗ), **А.М. Мороз** - д.м.н., профессор (МНПЦБТ), **С.А. Стерликов** – к.м.н. (ФГУ ЦНИИОИЗ); **Е.И. Скачкова** – д.м.н. (ФГУ ЦНИИОИЗ); **Е.Ю. Носова** - к.м.н. (МНПЦБТ); **К.Ю. Галкина** - к.б.н. (МНПЦБТ); **М.А. Краснова** - к.м.н. (МНПЦБТ); **А.А. Букатина** (МНПЦБТ).

РУКОВОДСТВО ПО ВЫЯВЛЕНИЮ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧИПОВ.- М.: РИО ЦНИИОИЗ.- 2009 г.- 52 с.

В руководстве изложены принципы диагностики туберкулёза с использованием биологических чипов, показания к использованию метода. Дан общий обзор методики определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулёза с использованием биологических чипов. Рассмотрены организационные составляющие и экономическая эффективность метода.

Особенностью диагностики туберкулёза и определения лекарственной чувствительности возбудителя с использованием биологических чипов является возможность быстрой идентификации наличия МБТ в исследуемом материале и определение их лекарственной чувствительности к наиболее эффективным противотуберкулёзным препаратам первого и второго ряда. Относительная простота и высокая достоверность метода позволяют применять его в крупных противотуберкулёзных диспансерах (областных, городских, межрайонных) при наличии необходимого небольшого набора помещений и соответствующего оборудования.

Диагностика туберкулёза с использованием биологических чипов существенно сокращает сроки выявления возбудителя и определения лекарственной чувствительности, что позволяет сразу начать адекватную противотуберкулёзную терапию с использованием препаратов, к которым чувствительность возбудителя сохранена. В свою очередь, это ведет к повышению эффективности лечения, сокращению сроков пребывания больных в стационаре, снижению риска распространения МБТ с множественной лекарственной устойчивостью, характеризующейся наличием одновременной резистентности к рифампицину и изониазиду. Появляется возможность дифференцированного подхода к проведению противотуберкулёзных мероприятий в очагах туберкулёзной инфекции.

Изложенные в руководстве методики и рекомендации целесообразно использовать для планирования эффективных экономических затрат при составлении бюджета территориальных органов здравоохранения вообще, и противотуберкулёзной службы в частности.

Рецензенты:

А.О. Марьяндышев - заведующий кафедрой фтизиопульмонологии ГОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», член-корреспондент РАМН, д.м.н, профессор

А.В. Свистельник – заместитель директора по научной работе ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза», к.м.н.

В.Н. Киншт – заведующий лабораторией генодиагностики ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза», к.м.н.

С.И. Рыжков - главный врач государственного учреждения здравоохранения «Противотуберкулёзный диспансер» Ростовской области

Т.И. Малыгина – заместитель главного врача по организационно-методической работе ГУЗ «Областной противотуберкулёзный диспансер» Белгородской области

Е.Б. Тюрина – заведующая бактериологической лабораторией ГУЗ «Областной противотуберкулёзный диспансер» Белгородской области

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МБТ	9
ПРИНЦИП МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧИПОВ	12
СБОР МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ	14
ПРИЕМ И РЕГИСТРАЦИЯ ОБРАЗЦОВ	17
ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
ПРОВЕДЕНИЕ ГИБРИДИЗАЦИИ. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ	18
МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА И ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ В МОЛЕКУЛЯРНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ДЛЯ РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМАМИ «ТБ-БИОЧИП» И «ТБ-БИОЧИП-2»	26
I. Помещение для пробподготовки образцов ДНК МБТ, получаемых из диагностического материала должно содержать необходимое оборудование и аппаратуру:	26
II. Помещение для проведения ПЦР-исследования	27
III. Помещение для электрофореза и гибридизации на биочипах	28
IV. Помещение для регистрации результатов	28
НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ	30
Лицензирование и режим работы в ПЦР-лаборатории	30
Допуск к работе в ПЦР-лаборатории и посещению лаборатории другими специалистами	31
Помещения и рабочие зоны ПЦР-лаборатории	31
Вентиляция	32
Требования к внутренней отделке и оборудованию помещений	32
Использование лабораторного оборудования и мебели	33
Доставка и разборка материала	33
Утилизация отходов	34
Обработка помещений и дезинфекция	34
Рабочая одежда сотрудников ПЦР-лаборатории и требования к личной гигиене ..	35
Действия сотрудников лаборатории при контаминации	35
Контроль качества исследований	36
ОЦЕНКА СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА БИОЧИП-ДИАГНОСТИКИ	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	48
Приложение 1.....	49
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	51

Список сокращений.

- АПК – аппаратно-программный комплекс
БПА – белок-переносчик еноил-ацильного радикала
БЭ – бюджетная эффективность
ГБ – гибридизационный буфер
ГИНК – гидразид изоникотиновой кислоты
ГСН – Государственное статистическое наблюдение
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМБ РАН - Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской Академии Наук
ЛБ – лизирующий буфер
МБТ – Микобактерия туберкулёза (человеческий тип)
МИК – минимальная ингибирующая концентрация
МЛУ – устойчивость микобактерии туберкулёза к изониазиду и
рифампицину
МУ – методические указания
НК – нуклеиновые кислоты
ПБ – промысловый буфер
ПБА – патогенный биологический агент
ПТП – противотуберкулёзные препараты
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РНК – рибонуклеиновая кислота
СанПиН – санитарные правила и нормы
СГЗ – суммарные годовые затраты
СГПЭ – суммарный годовой положительный эффект
СП – санитарные правила
УОУР – участок, определяющий устойчивость к рифампицину
M. bovis – возбудитель туберкулёза, бычий тип микобактерий.
QRDR – участок, определяющий устойчивость к фторхинолонам

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез – основная причина смертности взрослого населения от инфекционных заболеваний. Ежегодно в мире около 10 млн. человек заражается туберкулезом и 3 млн. умирает.

В 2007 году в России заболело туберкулёзом 118367 человек, что составляет 83,2 на 100 000 населения (форма № 8 ГСН). При этом, несмотря на то, что культуральная диагностика туберкулёза во многих регионах РФ оставляет желать лучшего, среди этого количества больных было выявлено 48 567 больных туберкулёзом с наличием бактериовыделения (34,2 на 100 000 населения), а 33 789 человек (23,8 на 100 000 населения) были массивными бактериовыделителями, у которых возбудитель в материале определялся с использованием световой или люминесцентной микроскопии¹.

К сожалению, лечение даже этих, впервые выявленных, больных не всегда эффективно². По данным ф. 8-ТБ, из числа впервые выявленных больных с положительными результатами микроскопии мокроты, зарегистрированных для лечения в 2007 году, эффективный курс химиотерапии был зарегистрирован всего лишь у 57,8%. В отдельных территориях доля больных эффективным курсом химиотерапии составляет менее 40%. Еще хуже результаты лечения больных туберкулёзом из группы «рецидив». Доля больных туберкулёзом - бактериовыделителей из группы «рецидив» с эффективным основным курсом лечения этой же когорты составила в среднем по РФ лишь 44,2%. Что касается больных с другими курсами повторного лечения (в их число входят, в первую очередь, больные с неэффективным курсом химиотерапии), то доля больных с эффективным основным курсом лечения среди них составила 31,0%³.

Наиболее опасны в клиническом и эпидемиологическом отношении МБТ, резистентные к противотуберкулёзным препаратам, в том числе – МЛУ МБТ. По данным ф. 7-ТБ за 2007 год, лекарственная устойчивость МБТ среди впервые выявленных больных туберкулёзом в среднем по РФ составила 31,9%, в том числе – множественная – 12,9%. Среди больных туберкулёзом из группы «рецидив» лекарственная устойчивость МБТ в среднем по РФ составила 44,8%, в том числе – множественная – 24,8%⁴. В целом среди контингентов противотуберкулёзной службы МЛУ МБТ у больных, состоящих на учете среди всех больных туберкулёзом органов дыхания с бактериовыделением выявлены в 21,4% случаев.

Считается, что средний курс лечения больного туберкулезом при сохраненной лекарственной чувствительности МБТ составляет 6-9 месяцев.

¹ Туберкулёз в Российской Федерации, год 2007. Аналитический обзор основных статистических показателей по туберкулёзу, используемых в Российской Федерации. М., 2008. – 172 с.

² Там же.

³ Богородская Е.М., Стерликов С.А. Данные подготовлены публикации.

⁴ Там же.

При лечении больных с МЛУ МБТ продолжительность курса лечения увеличивается до 2-х лет, а стоимость курса доходит до 3-4 млн. рублей⁵.

С учетом изложенного очевидно, что эффективность лечения туберкулеза и борьбы с заражением пациентов лекарственно-устойчивыми МБТ во многом зависит от скорости обнаружения возбудителя, его идентификации и определения лекарственной чувствительности. Таким образом, показатели оперативности, достоверности и точности диагностики являются определяющими для повышения эффективности лечения этого социально-значимого заболевания.

В настоящее время для определения лекарственной чувствительности МБТ используется культуральная диагностика с посевом анализируемого материала на плотные питательные среды, содержащие чистые субстанции основных противотуберкулезных препаратов в стандартных концентрациях. Этот метод считается «золотым стандартом» в диагностике туберкулеза и используется практически во всех противотуберкулезных учреждениях России. Применение этого метода регламентировано приказом Министерства здравоохранения РФ № 109 от 23.03.2003 года «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации». Тем не менее, несмотря на богатую историю и широкое использование этого метода, по результатам Федеральной системы внешней оценки качества по разделу «Культуральное выявление МБТ», доля лабораторий с хорошими и отличными результатами внешней оценки качества составила лишь 41,5% среди лабораторий регионального уровня и 51,4% среди лабораторий районного уровня. Доля лабораторий с неудовлетворительными результатами тестирования составила 31,4% среди лабораторий регионального уровня и 42,9% среди лабораторий районного уровня⁶.

Кроме того, ответ о наличии возбудителя и его лекарственной чувствительности при использовании этого метода может быть получен не ранее 8-12 недель. При этом, чаще всего, больным назначают ПТП первого ряда (рифампицин и изониазид) в составе I режима химиотерапии, независимо от того, каким по лекарственной чувствительности штаммом они заражены, хотя подбор схемы лечения с учетом характера устойчивости МБТ, в значительной степени определяет ее эффективность.

Применение I режима химиотерапии при высоком уровне первичной МЛУ МБТ приводит к индукции лекарственной устойчивости и создает

⁵ По данным ВОЗ (информационные бюллетени №№ 1 и 3 за март 2005 г.) стоимость курса составляет от 0,5 до 1 млн. рублей. Однако при этом не учитывался ряд иных факторов: стоимость препаратов для патогенетической терапии, лечения сопутствующих нарушений, расходы на оплату больничных листов и т.п.).

⁶ Шульгина М.В., Заикин Е.В., Белиловский Е.М., Малахов В.Н., Якубовяк В. Внешняя оценка качества выявления МБТ и определения их лекарственной чувствительности в Российской Федерации//Туберкулёз в Российской Федерации, 2007 г. М., 2008.- С. 112-118.

условия для формирования большого контингента хронически больных туберкулёзом легких, в том числе – с МЛУ⁷.

Применение импортных автоматизированных систем с использованием жидких сред – Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson) или BacT/Alert 3D (BioMerieux) сокращает время обнаружения возбудителя до 1-2 недель, но определение чувствительности МБТ к ПТП 1-го ряда продлевает время анализа еще на 1-2 недели. Таким образом, получение сведений о лекарственной чувствительности возбудителя возможно уже к окончанию первого месяца лечения, что значительно лучше результатов культуральной диагностики на твердых средах. Однако высокая стоимость расходных материалов и реактивов ограничивает применение этого метода.

Существенным недостатком всех культуральных методов является то, что МБТ, полученные из материала от больных туберкулёзом, не всегда дают рост на питательной среде, что делает невозможным определение лекарственной чувствительности МБТ. В этом случае лечение больного назначается чаще всего по I или III стандартным режимам химиотерапии. Применение I режима химиотерапии при наличии первичной МЛУ МБТ приводит к её индукции и создает условия для формирования большого контингента хронически больных туберкулёзом легких, в том числе – с МЛУ⁸. Между тем, доля образцов материала, в которых МБТ не дают рост на питательной среде, составляет до 60% при использовании твердых сред и до 20% при использовании жидких сред, что не позволяет подобрать оптимальный режим лечения этих больных.

Разработанная в ИМБ РАН и уже внедренная в ряде противотуберкулезных учреждений России новая технология диагностики, основанная на использовании биологических микрочипов, способна кардинально изменить ситуацию. Эта технология не имеет аналогов в мире по скорости и эффективности выявления лекарственно-устойчивых форм туберкулеза и идентификации их разновидностей. Время получения результата анализа при использовании биологических чипов составляет около 2 суток. При этом образцы, не дающие ответа на вопрос об устойчивости МБТ к лекарственным препаратам, при наличии достаточного количества МБТ в анализируемом образце, практически отсутствуют. Главным преимуществом биочип-технологии диагностики туберкулеза является высокая оперативность и надежность анализа, что позволяет:

1. Еще до начала курса химиотерапии определить стратегию лечения больного, подобрать оптимальный набор противотуберкулёзных препаратов и условия лечения больного (отделение или палаты для больных с отсутствием или наличием бактериовыделения, либо отделение (или палата) для больных, выделяющих МЛУ МБТ.

⁷ Мишин В.Ю. Оптимизация лечения впервые выявленных больных туберкулёзом легких на основе принципов доказательной медицины// Химиотерапия туберкулёза в современных эпидемиологических условиях. М., 2008. – С. 53-68.

⁸ Там же.

2. Предотвратить индукцию лекарственной устойчивости МБТ и формирование хронических форм туберкулёза.
3. Осуществлять оперативный динамический контроль эффективности лечения больного и коррекцию режима химиотерапии в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя.

Кроме того, биочипы выявляют 95% случаев устойчивости к рифампицину и около 80% случаев устойчивости к изониазиду. Это связано с тем, что биочипы выявляют определенные мутации, ответственные за возникновение лекарственной устойчивости.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МБТ.

Тест-системы «ТБ-БИОЧИП» и «ТБ-БИОЧИП-2» предназначены для выявления генетических маркеров лекарственной устойчивости к трем наиболее активным группам противотуберкулёзных препаратов: гидразиды изоникотиновой кислоты, рифампицин и фторхинолоны.

Изониазид (isoniazid) – синтетический бактерицидный препарат, ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу и останавливает синтез миколовых кислот МБТ.

Устойчивость МБТ к изониазиду обусловлена мутациями в четырех основных генах:

- Ген *katG* кодирует каталазу-пероксидазу. Мутации расположены на всем протяжении гена, наиболее часты замены в кодонах 315, 328, 335.
- Промоторная и структурная области гена *inhA*, кодирующего редуктазу еноил-ацил переносящего белка.
- Межгенная регуляторная область генов алкилгидропероксид-редуктазы *ahpC* и регулятора трансляции – *охуR*.
- Ген *kasA*, кодирует редуктазу β-кетоацил-ацил-переносящего белка.

Резистентность МБТ к изониазиду также может определяться мутациями в менее изученных генах *furA* и *ndh* [8].

Ген *katG*

Изониазид попадает в бактерию в качестве про-лекарства, которое не действует, пока его не окислит фермент бифункциональная каталаза-пероксидаза (*KatG*), за синтез которой ответственен ген *katG*. *KatG* удаляет из изониазида гидразин и связывает изоникотил-еноильную группу с НАД⁺, превращая препарат в активную форму.

Комплекс изоникотиноил-НАД препятствует синтезу миколовых кислот и, соответственно, синтезу клеточной стенки МБТ, посредством связывания фермента *InhA*, являющегося еноил-ацильным переносчиком редуктазы, и *KasA* – β-кетоацил-ацил переносчика протеин-синтазы, блокируя их НАД-Н-связывающие сайты.

Реактивный кислород, вовлекаясь в процесс активации препарата как *in vivo*, так и *in vitro*, повышает уровень H_2O_2 , что является возможной причиной высокого уровня чувствительности возбудителя к изониазиду. Около половины всех устойчивых к препарату МБТ содержат мутации в гене *katG*. Описаны разнообразные замены аминокислот, которые либо снижают активность фермента, либо ведут к его быстрому протеолизу. Иногда отмечается делеция целого гена. В результате мутаций изменяется кристаллическая структура фермента, что в свою очередь ведет к снижению способности каталазы-пероксидазы окислять изониазид, и, как следствие, возникает устойчивость к препарату.

Замена Ser на Thr в 315 кодоне, составляющая приблизительно половину из всех мутаций *katG* [15, 17], снижает сродство фермента к изониазиду, что препятствует формированию комплекса изоникотиноил-НАД и, соответственно, приводит к становлению резистентности к препарату.

Уровень резистентности МБТ к изониазиду зависит также от местоположения мутации. МБТ, требующие очень высоких МИК для инактивации (125 мкг/мл) имеют, как правило, мутации в кодонах 65, 125, 511, 513, 521 и 617 гена *katG*. Штаммы с мутациями в 52-57 и 463 кодонах данного гена требуют для инактивации 1 мкг/мл препарата, с мутациями в 315, 335, 350, 629, и 262 - 2 мкг/мл. МИК для штаммов, имеющих мутации в кодонах 409 и 465; 275 и в 695 составляет, соответственно 2; 5; 10 и 40 мкг/мл [14].

Ген *inhA*

Ген *inhA* кодирует фермент **InhA**, являющийся редуктазой белка-переносчика еноил-ацильного радикала (БПА), которая в качестве кофактора использует НАД.

У МБТ две системы синтеза жирных кислот: СЖКІ и СЖКІІ. СЖКІ продуцирует насыщенные жирные кислоты, а СЖКІІ, ответственна за биосинтез ненасыщенных длинноцепочечных (60-90 молекул углеводорода в цепи) жирных кислот, посредством элонгации продуктов СЖКІ.

Продукты СЖКІІ являются предшественниками миколовых кислот, которые входят в состав клеточной стенки МБТ. Биохимические исследования выявили, что *InhA* входит в СЖКІІ. Данный фермент ингибируется активированным изониазидом, что приводит к накоплению насыщенных жирных кислот, изменениям в строении клеточной стенки и лизису микобактериальной клетки.

Около 20% штаммов возбудителя, устойчивых к изониазиду, содержат мутации в гене *inhA*, и почти все они происходят в области промотора, по всей видимости, увеличивая его экспрессию. Реже мутации, обуславливающие резистентность к изониазиду, приводят к заменам аминокислот, которые снижают аффинитет белка *InhA* к кофактору НАД-Н.

Ген *kasA*

Наряду с белком *InhA* в синтезе миколовых кислот участвует фермент *KasA* (β -кетоацил-ацил-переносчик синтазы), кодируемый геном *kasA*.

В присутствии изониазида количество белка *KasA* увеличивается, что отражает механизм ап-регуляции. *InhA* совместно с *KasA* и ферментом АсрМ являются компонентами одной системы – синтазы жирных кислот II типа, действующей в составе мультиферментного комплекса, синтезирующего миколовые кислоты.

Гены *oxyR*- *ahpC*

Ген *oxyR* выступает в качестве регулятора реакции на пероксид и контролирует экспрессию гена *katG* и некоторых других генов, включая *ahpC*, кодирующий малую субъединицу алкил-гидропероксидазной редуктазы. У МБТ ген *ahpC* прилежит к гену *oxyR* и транскрибируется в противоположном направлении. Мутации в генах *oxyR* и *ahpC* являются компенсаторной реакцией на снижение каталазно-пероксидазной активности, контролируемой генами *katG* и *inhA*. Мутации промотора, вызывающие сверхрегуляцию *ahpC*, были выявлены приблизительно в 10% штаммах возбудителя, устойчивых к изониазиду. Интересно, что мутации, вызывающие повышенную экспрессию *ahpC*, реже встречаются у штаммов с заменой в гене *katG* Ser315>Thr, предположительно потому, что активность фермента *KatG* существенно не страдает, а следовательно, не требуется компенсаторного повышения активности работы гена *ahpC* [16].

Рифампицин (rifampicin) – полусинтетическое производное натурального продукта рифамицина, получаемого из фильтрата культуры *Streptomyces mediterranei*, применяется как противотуберкулезный препарат с 1972 года. Рифампицин очень эффективен и имеет быстрый бактерицидный эффект, помогающий даже при коротком курсе терапии [16].

Резистентность МБТ к рифампицину чаще всего определяется мутацией в гене *rpoB*, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы МБТ.

Апофермент РНК-полимеразы состоит из четырех полипептидов: двух α -субъединиц, одной β -субъединицы и одной β' -субъединицы. Для начала транскрипции к ним присоединяется σ -субъединица, образуя голофермент. В присутствии рифампицина РНК-полимераза не в состоянии удлинять дочернюю цепочку РНК после присоединения нескольких первых рибонуклеотидов. Мутации, придающие устойчивость к рифампицину, препятствуют связыванию препарата с ферментом.

Несмотря на довольно значительный размер фермента *rpoB* (1172 аминокислоты) у МБТ, почти все мутации происходят в сегменте гена *rpoB*, состоящем из 81 основания, который кодирует аминокислоты 507 и 533. Концентрация мутаций, вызывающих устойчивость к рифампицину в этом сегменте, получившем название «участок, определяющий устойчивость к рифампицину» (УОУР), облегчает их выявление молекулярными методами. В 96% случаев у штаммов, резистентных к рифампицину, мутации находятся в УОУР. Большинство мутаций в кодонах 516, 526 и 531 обуславливают устойчивость к рифампицину высокого уровня (минимальная ингибирующая концентрация (МИК)>32 мкг/мл), однако при некоторых заменах отмечаются

более низкие МИК: например, Asp516>Tyr (2 мкг/мл), His526>Leu (8 мкг/мл) и His526>Asn (8 мкг/мл).

Мутации *rpoB* являются основной причиной возникновения лекарственной устойчивости МБТ к рифампицину. Лишь приблизительно у 2% устойчивых к рифампицину штаммов МБТ, механизм возникновения устойчивости не связан с мутацией в гене *rpoB* [16].

Резистентность МБТ к фторхинолонам определяется мутацией в QRDR области гена *gyrA*, содержащей пять полиморфных кодонов, четыре из которых (позиции 88, 90, 91, 94) обуславливают развитие резистентности к фторхинолонам.

Фторхинолоны действуют путем ингибирования топомераз II типа (ДНК-гираз). Топомеразы разрезают двухцепочечную ДНК, ковалентно связывают оба конца, проводят другую нить двухцепочечной ДНК сквозь образовавшийся разрыв и вновь связывают разрезанные концы. Фторхинолоны связываются с этими ферментами в комплексе с ДНК, ингибируя их активность и оставляя несшитыми разрывы ДНК. Комплекс топоизомераза-фторхинолон связывается с хромосомой, блокируя как репликацию ДНК, так и транскрипцию РНК. Топомераза II типа состоит из двух субъединиц, которые кодируются генами *gyrA* и *gyrB*. Первым участком, в котором были найдены мутации, вызывающими устойчивость к фторхинолонам, оказался короткий сегмент QRDR. В *gyrB* также было описано несколько мутаций, вызывающих устойчивость к фторхинолонам, в особенности на участке белка, который, как полагают, связывается с QRDR, образуя «карман», куда присоединяются фторхинолоны. Однако у штаммов, устойчивых к фторхинолонам, мутаций в *gyrB* не выявлялось [14].

Сродство фторхинолонов к топомеразе II типа является главным фактором, определяющим МИК, и здесь, по-видимому, решающая роль принадлежит радикалу в положении С8 [19]. Некоторые аналоги фторхинолонов обладают таким сродством к топомеразе, что сохраняют активность при приемлемом уровне препарата в отношении МБТ с мутацией *gyrA* [19]. Это означает, что появление одной мутации в *gyrA* не всегда означает полную потерю активности всех антибактериальных препаратов фторхинолонового ряда. Однако когда у МБТ появляются две мутации в *gyrA*, даже наиболее активные фторхинолоны теряют активность.

ПРИНЦИП МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЧИПОВ

Молекулярно-биологические методы получили большое распространение в научных исследованиях и практическое применение в диагностике различных бактериальных и вирусных инфекций после открытия в 1985 г. Кэрри Мюллисом (лауреат Нобелевской премии, 1989) полимеразной цепной реакции (ПЦР). Идея создания биологического микрочипа возникла в конце 80-х годов XX столетия одновременно в Великобритании, Югославии и СССР. В Советском Союзе эти работы были

инициированы и проводились в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН под руководством академика А.Д. Мирзабекова. В 1999 году американская газета «Sunday Times» опубликовала имена 20 ученых, работы которых окажут наибольшее влияние на развитие технологий XXI века. Возглавлял этот список академик РАН А.Д. Мирзабеков - «русский изобретатель первого в мире биочипа, который революционизирует медицинскую диагностику». Первые биологические микрочипы появились в конце прошлого века, а сейчас уже десятки компаний выпускают различные типы чипов, отличающихся друг от друга по методике изготовления и по методу, с помощью которого регистрируют результат взаимодействия чипа с образцом⁷.

Выявление МБТ и определение их лекарственной чувствительности к ПТП при помощи биологических микрочипов достигается проведением ряда последовательных этапов, включающих деконтаминацию клинического образца, лизис микроорганизмов, две последовательные стадии мультиплексной ПЦР, гибридизацию полученных ПЦР-продуктов (ампликонов) на биологическом микрочипе, регистрацию и интерпретацию полученных результатов. Метод позволяет обнаружить не менее 500 геном-эквивалентов микобактерий (100-300 КОЕ в 1 мл мокроты) и определить наличие/отсутствие устойчивости к ПТП со специфичностью 95%.

Первая стадия ПЦР служит для амплификации а) специфичной для МБТ нуклеотидной последовательности *IS6110*-элемента и б) фрагментов генома микроорганизма, отвечающих за возникновение резистентности, из материала клинического образца (мокроты).

Вторая стадия ПЦР, проводимая по асимметричному типу, служит для получения преимущественно одноцепочечных ПЦР-продуктов (используя ампликоны, полученные на 1-й стадии) с одновременным введением в них флуоресцентной метки.

Гибридизация на биологическом микрочипе проводится с продуктом второй стадии ПЦР с целью идентификации мутаций, приводящих к устойчивости МБТ к ПТП. Биологический микрочип представляет собой подложку с упорядоченно расположенными трехмерными микроячейками полиакриламидного геля, содержащими ковалентно иммобилизованные олигонуклеотидные зонды, последовательности которых комплементарны как немутантным фрагментам генов, так и фрагментам, содержащим мутации. При гибридизации одноцепочечный флуоресцентно меченный продукт образует высокостабильный гибридизационный комплекс только с полностью комплементарным иммобилизованным зондом (т.е. каждый нуклеотид изучаемой мишени образует совершенный гибридизационный дуплекс с соответствующим нуклеотидом в составе зонда). При наличии даже одного неспаренного основания эффективность гибридизации молекулы-мишени с иммобилизованным зондом снижается, флуоресцентный сигнал в соответствующей ячейке падает, а после процедуры отмывки снижается

до уровня фонового шума. Таким образом, ячейки, содержащие полностью комплементарные к молекуле-мишени олигонуклеотиды, имеют сигнал флуоресценции, по меньшей мере, в несколько раз превосходящий сигналы ячеек, в которых не образовалось совершенных гибридизационных комплексов.

Анализ результатов гибридизации проводится на приборе «Чипдетектор-01». Для возбуждения флуорофорных групп красителя, встроенного в процессе второй стадии ПЦР в исследуемый фрагмент генома и входящего в состав гибридизационного комплекса, используется монохроматический свет с длиной волны 650 нм. Флуоресцентные сигналы каждой ячейки регистрируются ПЗС-камерой и подвергаются оцифровке. Специальное программное обеспечение позволяет сравнить флуоресцентные сигналы в ячейках, определить, в каких ячейках образовались совершенные комплексы, используя заданный алгоритм сравнения и, таким образом, выдать отчет об отсутствии/наличии мутаций в исследуемой ДНК микобактерий и, соответственно, о чувствительности/устойчивости исследуемого штамма к ПТП¹.

СБОР МАТЕРИАЛА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эффективность лабораторных исследований зависит от качества диагностического материала. Соблюдение правил сбора, хранения и транспортировки диагностического материала, а также точное соблюдение алгоритма обследования больных непосредственно влияет на результат и обеспечивает биологическую безопасность.

Применяемые при биочип-диагностике технологии рассчитаны на работу только с диагностическим материалом из органов дыхания: мокротой, бронхоальвеолярными смывами, плевральным экссудатом. Собираемый материал направляется одновременно для проведения биочип-диагностики и культурального исследования.

Сбор материала необходимо проводить в специальном помещении: комнате (рис. 1) или кабине для сбора мокроты (рис. 2).



Рисунок 1. Комната для сбора мокроты



Рисунок 2. Кабина для сбора мокроты

Сбор материала – опасная процедура, поэтому собирать материал необходимо соблюдая правила инфекционной безопасности. Сотрудник, работающий в комнате для сбора мокроты, должен быть должным образом проинструктирован и снабжен необходимыми средствами индивидуальной защиты. В функциональные обязанности сотрудника входит инструктаж больных по технике сбора мокроты, наблюдение за процессом сбора мокроты, первичный контроль качества собранного материала, заполнение сопроводительных листов, ведение необходимой медицинской документации, контроль наличия достаточного количества дезсредств, расходных материалов, а также за соблюдением санитарно-противоэпидемического режима в зоне его ответственности.

Лицам, ответственным за сбор мокроты необходимо следить за выполнением определенных правил:

- нужно объяснить больному цели исследования и необходимость откашливать не слюну или носоглоточную слизь, а содержимое глубоких отделов дыхательных путей. Этого можно добиться путем продуктивного кашля, возникающего в результате нескольких

глубоких вдохов. Нужно также предупредить больного, что он должен предварительно прополоскать рот кипяченой водой для удаления основной части вегетирующей в полости рта микрофлоры и остатков пищи.

- участвующий в сборе мокроты медицинский работник, помимо халата и шапочки, должен надеть респиратор, резиновые перчатки и резиновый фартук.
- больному рекомендуют держать флакон как можно ближе к губам и сразу же отделять в него мокроту по мере откашливания.
- по завершении сбора мокроты медицинский работник должен тщательно закрыть флакон крышкой, оценить количество и качество собранной мокроты, промаркировать флакон и поместить его в специальный бикс для транспортировки в лабораторию.

Мокроту собирают в два стерильных пластиковых контейнера (пробирки центрифужные, стерильные на 50 мл., размер 115x28). Интервал между сбором двух порций мокроты должен составлять не менее двух часов. Один контейнер с оформленным направлением, в котором указано «ЧИП-ПЦР». Ф.И.О. больного, № отделения, Ф.И.О. лечащего врача, передается в лабораторию молекулярной диагностики для исследования с применением системы «ТБ-БИОЧИП», а другой контейнер вместе с соответствующей документацией передается в микробиологическую лабораторию.

Правильно собранная мокрота имеет слизистый или слизисто-гнойный характер. Оптимальный объем порции составляет 5 мл.

Если больной не выделяет мокроту, то накануне вечером и рано утром в день сбора материала нужно давать ему отхаркивающие средства или применить раздражающую ингаляцию. Собранный таким образом материал имеет более жидкую, слюнообразную консистенцию. Поэтому во избежание его «выбраковки» в лаборатории следует сделать специальную отметку в направлении.

Процедуру сбора мокроты повторяют ежедневно в течение 3-х дней.

Следует помнить о том, что биочип-диагностика является очень чувствительным методом. Это определяет необходимость строгого соблюдения санитарного режима в комнате сбора мокроты. Вытяжная вентиляция и бактерицидная лампа должны всегда находиться в исправном состоянии и работать. Недопустимо проведение сбора материала методом «сплошного потока», когда в промежутках между забором проб отсутствует необходимая дезинфекция. Это может способствовать контаминации и получению недостоверных результатов исследования.

Во время транспортировки материал следует предохранять от воздействия прямых солнечных лучей и тепла. Для транспортировки материала рекомендуется пользоваться биксами или специальными транспортировочными ящиками (контейнерами) с мягкими легко стерилизующимися прокладками на дне и с гнездами или прокладками для пробирок. Прокладки должны быть выполнены из материалов, обладающих высокой адсорбционной способностью с тем, чтобы в случае протечки они

могли адсорбировать жидкость и ограничить участок загрязнения в пределах транспортировочного контейнера.

Во избежание инфицирования бланков направлений и сопроводительных документов желательно помещать их в чистый конверт или полиэтиленовый пакет и передавать непосредственно в лабораторию, не помещая их в транспортировочный контейнер. Категорически запрещается заворачивать флакон с материалом в бланк направления.

ПРИЕМ И РЕГИСТРАЦИЯ ОБРАЗЦОВ

Поступающие для исследования пробы материала принимают на отдельном столе. Прием поступающих проб и их осмотр следует проводить в одноразовых перчатках и респираторе. Перед тем, как открыть транспортировочный контейнер, необходимо протереть его наружную поверхность тампоном, смоченным соответствующим дезинфицирующим средством.

После этого следует аккуратно открыть крышку контейнера и проверить, нет ли на поверхности пробирок следов протечки материала. Ни в коем случае не использовать поврежденные пробирки (разбитые или с трещинами). Такие пробирки уничтожаются, после чего следует запросить новый образец, отметив в сопроводительном бланке.

Необходимо проверить наличие идентификационных номеров на пробирках с материалом и сверить их с номерами в сопроводительных документах. Материал должен поступать в лабораторию только в стерильной пробирке объемом 50 мл с плотно завинчивающейся крышкой. К каждой пробирке в отдельном конверте должно прилагаться направление, где разборчиво указаны дата исследования, фамилий, имя, отчество пациента, вид материала (мокрота, лаваж), отделение клиники из которой поступил пациент, вид исследования (исследование на биологическом микрочипе), категория пациента (впервые выявленный, с подозрением на туберкулез, с подозрением на рецидив), фамилия, имя, отчество лечащего врача и контактный телефон. Все данные регистрируют в специальном журнале.

После работы с пробирками следует уничтожить одноразовые перчатки и вымыть руки с мылом. Бланки направлений следует желательно подвергнуть стерилизации в сухожаровом шкафу в течение 30 минут при 85°C.

ОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ, ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК МБТ

Данный этап включает в себя пробоподготовку исследуемого материала (деконтаминацию клинического образца и выделение ДНК МБТ). Все операции следует проводить в отдельном помещении лаборатории молекулярной диагностики, специально предназначенном для пробоподготовки. Не рекомендуется проводить пробподготовку в посевных помещениях бактериологических лабораторий, т.к. метод биочип-диагностики крайне чувствителен к перекрестной контаминации.

Для пробподготовки и выделения ДНК МБТ используют стандартное лабораторное оборудование (шкаф биологической защиты, шейкер, встряхиватель, центрифуги, термостат и пр.), и приготовленные заранее реактивы (раствор «Деконт», промывочные буферы ПБ-1, ПБ-2, лизирующий буфер ЛБ). Порядок действий подробно описан в прилагаемой к оборудованию документации, а также излагается в ходе обучения сотрудников.

По завершении данного этапа необходимо провести уборку в ламинарном шкафу и включить бактерицидную лампу.

ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Первая стадия ПЦР служит для амплификации специфичной для МБТ нуклеотидной последовательности *Is6110* и фрагментов генома микроорганизма, отвечающих за возникновение резистентности к ПТП, в материале клинического образца (мокроты). После проведения ПЦР результаты регистрируют с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. После проведения фореза и просмотра геля в проходящем ультрафиолетовом свете на источнике ультрафиолетового излучения (трансиллюминаторе) на вторую стадию ПЦР отбирают все те ампликоны, в которых был выявлен набор полос следующего размера: 309 п.н. (*IS6110*), 212 п.н. (*gpoB*), 166 п.н. (*katG*), 133 п.н. (*inhA*), 126 п.н. (*ahpC*) для «ТБ-БИОЧИП» и 309 п.н. (*IS6110*), 181 п.н. (*gyrA*) для «ТБ-БИОЧИП-2».

Вторую стадию ПЦР проводят по асимметричному типу, при котором концентрация одного из праймеров в десятки раз превышает концентрацию другого, что приводит к образованию преимущественно одноцепочечных ПЦР-продуктов. В качестве матрицы используют ампликоны, полученные на первой стадии, с одновременным введением в них флуоресцентной метки.

Проведение ПЦР и электрофореза осуществляют в отдельных, специально предназначенных для этого помещениях лаборатории молекулярной диагностики. По завершении данного этапа необходимо провести в ПЦР-боксах уборку и включить бактерицидную лампу.

ПРОВЕДЕНИЕ ГИБРИДИЗАЦИИ. УЧЕТ И РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Процедура гибридизации состоит из перенесения 10 мкл реакционной смеси после второй стадии ПЦР в пробирку вместимостью 500 мкл, добавления 20 мкл гибридизационного буфера и нанесения на биочип 30 мкл полученной смеси в отдельном ПЦР-боксе. После проведения гибридизации полученные результаты регистрируют в лабораторном журнале. Выписку результатов осуществляют на специальных бланках, в которых указывается фамилия, имя, отчество пациента, отделение клиники, из которой он поступил, вид материала и дата его поступления, результаты анализа, дата получения результата, подпись проводившего исследование.

Биологический микрочип системы «ТБ-БИОЧИП» содержит 72 иммобилизованных дискриминирующих зонда, 3 маркерные ячейки для

корректного обчета интенсивности флуоресценции с использованием программного обеспечения и 2 ячейки пустого геля, играющие роль отрицательного контроля. Гелевые ячейки, содержащие олигонуклеотиды, объединены в 21 группу таким образом, что сравнение интенсивности флуоресцентных сигналов ячеек внутри каждой группы позволяет сделать заключение о наличии/отсутствии мутации (минорного полиморфизма), приводящей к замене одного аминокислотного остатка. На чипе также расположены ячейки, содержащие олигонуклеотиды, комплементарные последовательности IS6110, уникальной для *Mycobacterium tuberculosis complex*, что позволяет дифференцировать МБТ от других микобактерий.

Интерпретация результатов гибридизации осуществляется путем сравнения интенсивности флуоресцентных сигналов в ячейках, принадлежащих к одной группе. Максимальный флуоресцентный сигнал свидетельствует о наличии совершенного гибридизационного дуплекса. Учет результатов производится с использованием чип-детектора и специализированного программного обеспечения ImageWare.

На рисунке 3 представлена схема биологического микрочипа системы «ТБ-БИОЧИП» для выявления устойчивости к изониазиду и рифампицину.

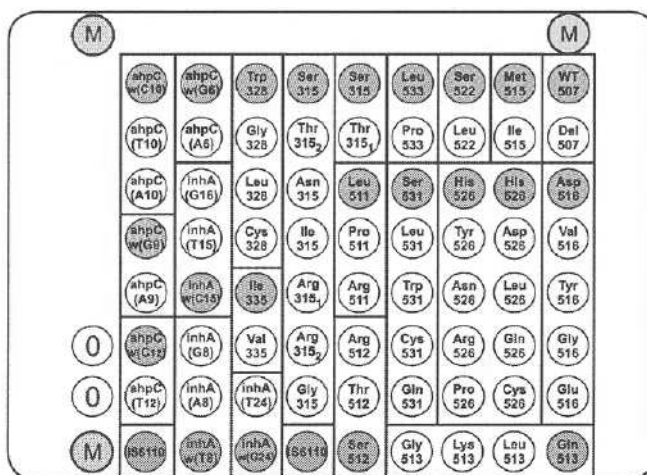


Рисунок 3. Схема размещения дискриминирующих олигонуклеотидов на биочипе для выявления мутаций, приводящих к устойчивости к изониазиду и рифампицину.

Серым цветом обозначены ячейки, содержащие олигонуклеотиды, способные формировать совершенный гибридизационный дуплекс с ДНК, не имеющей мутаций (т.е. с ДНК дикого типа). Белым цветом обозначены ячейки, содержащие олигонуклеотиды, которые формируют несовершенные гибридизационные дуплексы с ДНК дикого типа и совершенные с ДНК, содержащей мутацию (тип мутации указан в ячейке).

Отдельную группу составляют 2 ячейки, содержащие зонд, комплементарный последовательности фрагмента инсерционного элемента Is6110.

Если максимальный сигнал регистрируется в ячейке с иммобилизованным олигонуклеотидом, комплементарным ДНК МБТ дикого типа, это

говорит о том, что в исследуемом участке образец ДНК не имеет мутаций и является чувствительным к рифампицину и изониазиду (рисунок 4).

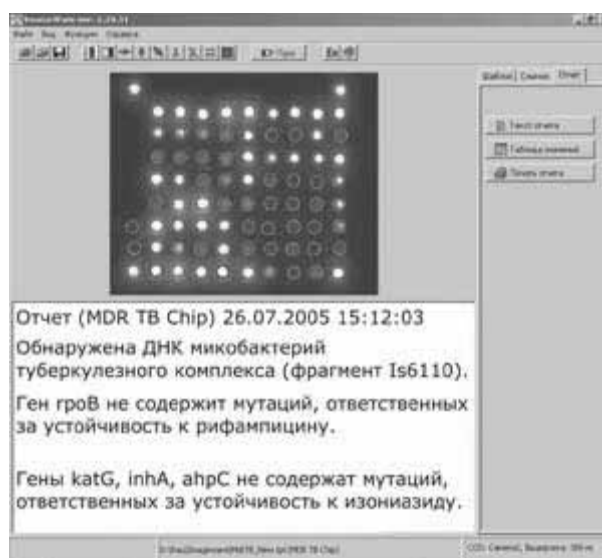


Рисунок 4. Схематическое изображение ответа при обнаружении МБТ, чувствительных к изониазиду и рифампицину, а также графическое отображение результата анализа в программе ImageWare.

В случае регистрации максимального сигнала в ячейке, обозначенной на схеме биочипа белым цветом (рис. 3), внутри рассматриваемой группы, считается, что геном изучаемого образца содержит мутацию, приводящую к лекарственной устойчивости (рис. 5).

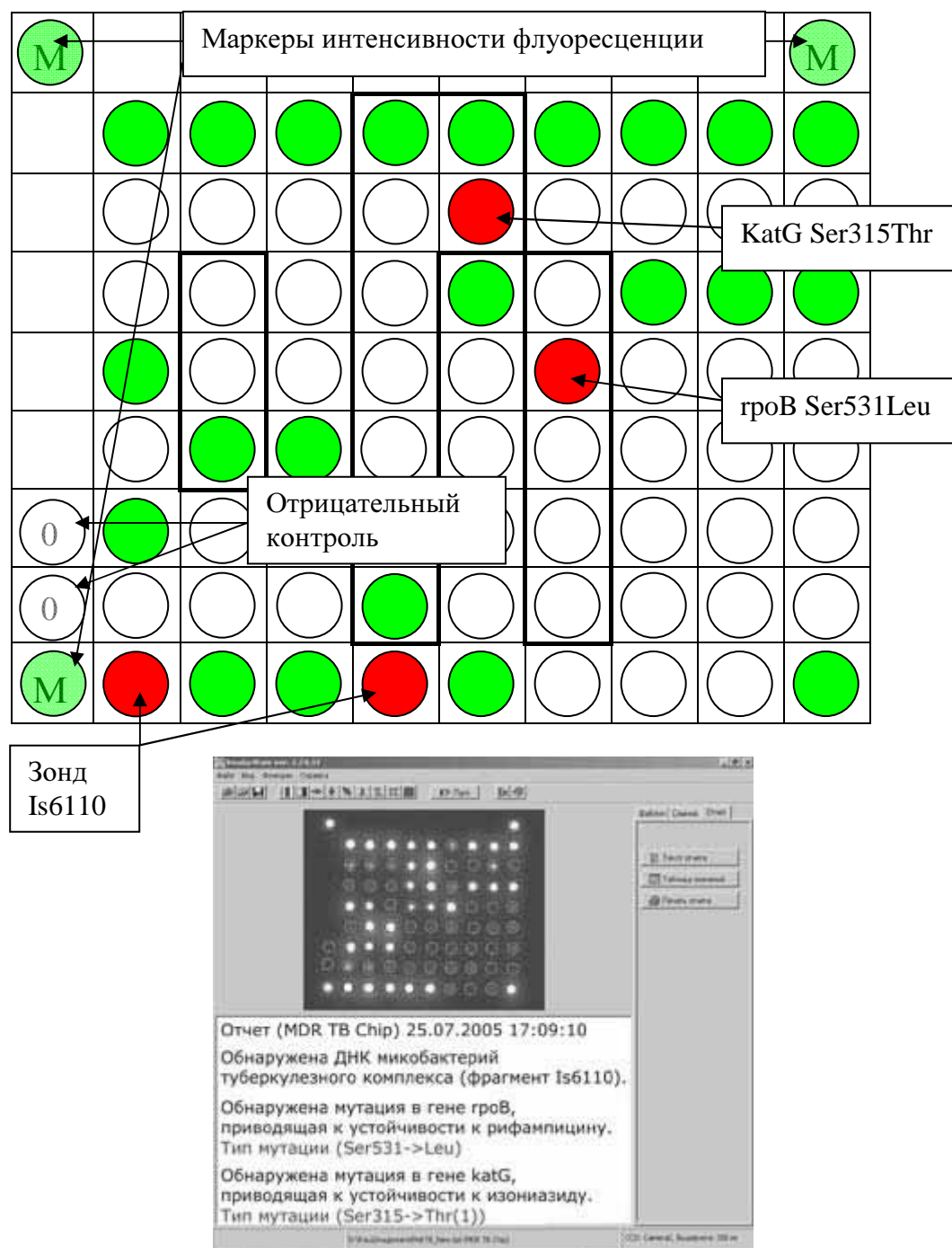


Рисунок 5. Схематическое изображение ответа при обнаружении МБТ, устойчивых к изониазиду и рифампицину, а также графическое отображение результата анализа в программе ImageWare.

Тест-система «ТБ-БИОЧИП» позволяет выявить 27 мутаций в гене rpoB и 21 мутацию в генах katG, inhA и ahpC, т.е. 80-85% всех случаев наличия МЛУ у обследуемых больных туберкулёзом легких в течение 48 часов.

При выявлении вышеуказанных мутаций материал исследуют с использованием тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2».

Тест-система «ТБ-БИОЧИП-2» позволяет выявить 10 мутаций в сегменте гена *gyrA*, который получил название «участок, определяющий устойчивость к хинолонам» (QRDR), в 80, 88, 90, 91, 94 кодонах, а также естественный полиморфизм *gyrA* Ser95Thr.

Биологический микрочип системы «ТБ-БИОЧИП-2» содержит 33 иммобилизованных дискриминирующих зонда, 3 маркерные ячейки для корректного сравнения интенсивности флуоресценции с использованием программного обеспечения и 2 ячейки пустого геля, играющие роль отрицательного контроля. На данном чипе также присутствуют ячейки, содержащие зонды к последовательности IS6110. На рисунке 6 представлена схема размещения дискриминирующих олигонуклеотидов на биочипе.

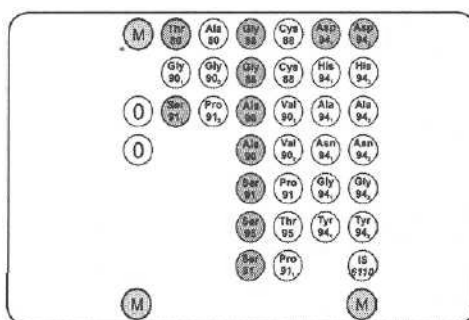


Рисунок 6. Схема размещения дискриминирующих олигонуклеотидов на биочипе для выявления мутаций, приводящих к устойчивости к фторхинолонам.

Серым цветом обозначены гелевые ячейки, содержащие олигонуклеотиды, способные формировать совершенный гибридационный дуплекс с ДНК, не имеющей мутаций (т.е. с ДНК дикого типа). Ячейки белого цвета содержат олигонуклеотиды, которые формируют несовершенные гибридационные дуплексы с ДНК дикого типа и совершенные с ДНК, содержащей мутацию (тип мутации указан в ячейке). Отдельную группу составляет ячейка, содержащая зонд, комплементарный последовательности фрагмента инсерционного элемента IS6110.

На рисунке 7 приведена схема ответа при обнаружении МБТ, чувствительных к фторхинолонам.

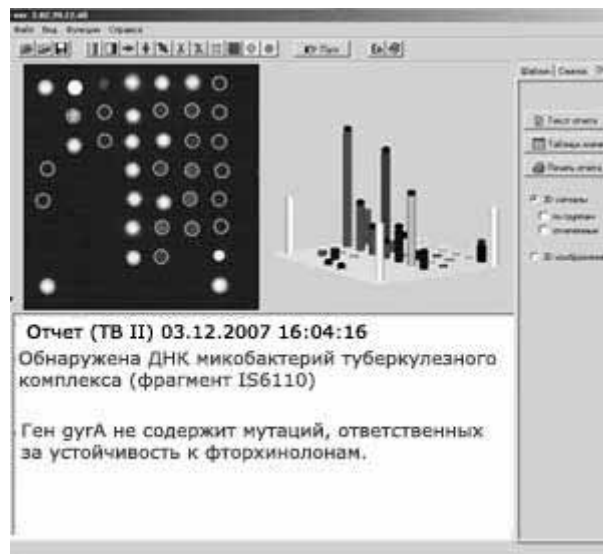
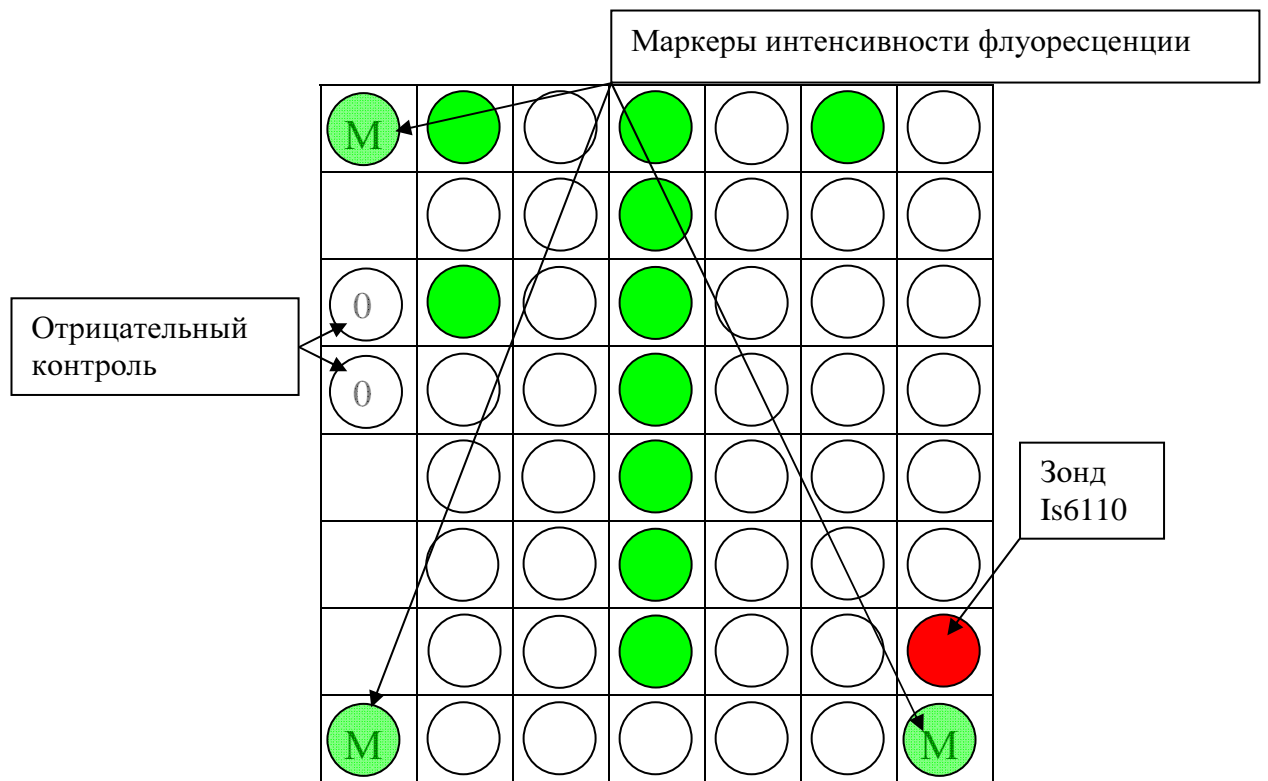


Рисунок 7. Изображение биочипа после анализа мокроты больного, зараженного штаммом МБТ, чувствительным к фторхинолонам.

На рисунке 8 представлено изображение биочипа после анализа штамма МБТ, устойчивого к фторхинолонам. Штамм также имеет естественный полиморфизм Ser->Thr в 95-м кодоне (не ведет к возникновению устойчивости) и замену Asp->Gly в 94-м кодоне, обуславливающую устойчивость к фторхинолонам.

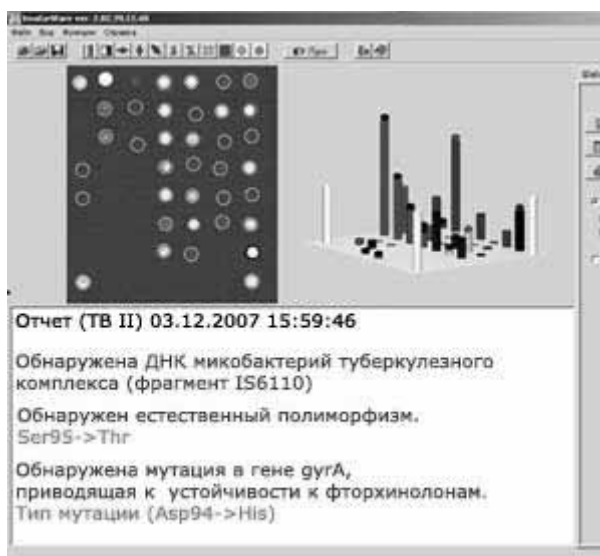
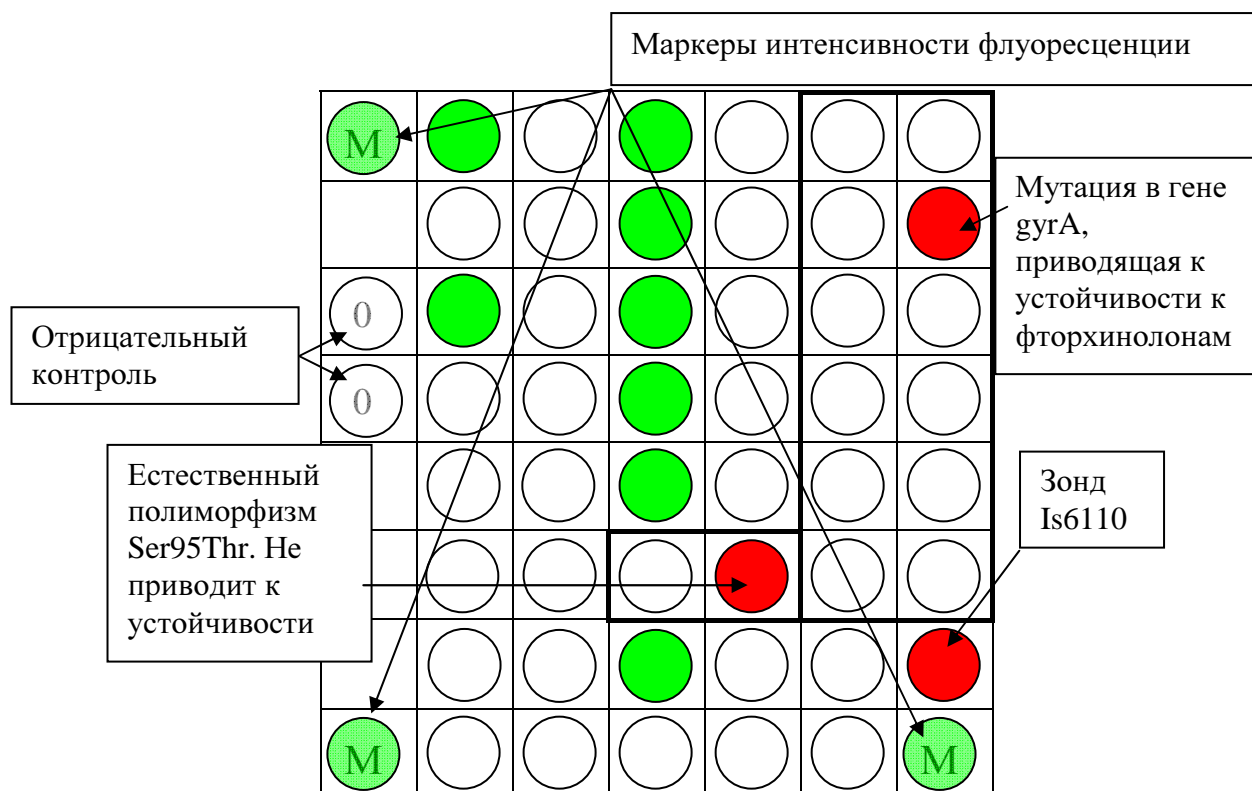


Рисунок 8. Изображение биочипа после анализа мокроты больного, зараженного штаммом МБТ, устойчивым к фторхинолонам. Кроме маркера устойчивости также имеется естественный полиморфизм Ser95Thr, не приводящий к возникновению устойчивости.

Интерпретация результатов исследования не является сложным процессом, однако требует наличия квалифицированного специалиста – врача-лаборанта, прошедшего сертификационный цикл по специальности «ПЦР-диагностика».

По результатам исследовательской работы с биологическими чипами специалистов Новосибирского НИИ туберкулёза были выявлены следующие возможные проблемы при регистрации результатов исследования:

1. сигнал регистрируется в ячейках, соответствующих ДНК как дикого, так и мутантного типа. Данная ситуация может отмечаться при наличии в мокроте в разных концентрациях как чувствительных, так и резистентных микобактерий («Микст-инфекция»).
2. одинаково слабые сигналы в ячейках могут свидетельствовать о малой концентрации микобактерий в материале или наличии ингибиторов ПЦР в пробе. Описанная методика предназначена только для исследования образцов мокроты; иные материалы (например, образцы тканей) могут содержать значительное число ингибиторов ПЦР.

В целом, при тщательном соблюдении техники на всех этапах исследования, частота совпадений при определении лекарственной чувствительности МБТ с использованием «классических» бактериологических методик и биочип-диагностики составляет 95%.

Анализ ДНК микобактерий методом ПЦР в условиях противотуберкулезного учреждения требует строжайшего соблюдения правил работы с микроорганизмами III-IV группы и правильной организации ПЦР лаборатории. Несоблюдение этих правил, также как и недостаточная квалификация персонала лаборатории, неизбежно приведет к ложноположительным результатам. Двухраундовая «нестед»-методика, когда в качестве мишени используются синтезированные в первом раунде ПЦР ампликоны, накладывает дополнительные требования к организации рабочего процесса (отдельный ПЦР-бокс и инструментарий для второго этапа ПЦР) и квалификации персонала (точность, высочайшая аккуратность и достаточный опыт работы).

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА И ОРГАНИЗАЦИЯ РАБОТЫ В МОЛЕКУЛЯРНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ДЛЯ РАБОТЫ С ТЕСТ-СИСТЕМАМИ «ТБ-БИОЧИП» И «ТБ-БИОЧИП-2».

Достоверность определения лекарственной чувствительности МБТ с помощью биологических микрочипов прежде всего зависит от качества постановки теста, исключающего возможность контаминации реакционной смеси следовыми количествами ДНК (специфических продуктов амплификации ДНК – ампликонов; ДНК-стандарта, используемого в качестве положительного контроля; положительной ДНК клинического образца). В процессе работы могут встретиться два вида контаминации:

1) перекрестная контаминация между образцами (в процессе обработки клинических образцов или при инъекции реакционной смеси), приводящая к появлению ложноположительных результатов;

2) контаминация продуктами амплификации (ампликонами), приводящая к ошибкам в серии последующих анализов, так как в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в больших количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации. Контаминация посуды, автоматических пипеток, лабораторного оборудования, поверхности лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории следовыми количествами ампликонов приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

Определить источник контаминации бывает очень трудно и, как правило, это требует значительных затрат времени и средств. Накопленный к настоящему времени опыт работы лабораторий, использующих метод ПЦР для диагностики, позволяет сформулировать основные требования к организации лабораторий молекулярной диагностики. Соблюдение данных требований позволит исключить возможность контаминации и получения ложноположительных результатов. Для этого необходимо разделение различных стадий проведения анализа, размещая их в отдельных помещениях.

I. Помещение для пробподготовки образцов ДНК МБТ, получаемых из диагностического материала должно содержать необходимое оборудование и аппаратуру:

1. Ламинарный бокс биологической безопасности класс II.
2. Набор автоматических пипеток переменного объема (0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл) для работы с образцами (выделения ДНК МБТ) и для работы с реагентами, входящими в фирменный набор.
3. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольными фильтрами объемом до 200 и до 1000 мкл.
4. Пробирки полипропиленовые объемом 50,0 мл, с резьбовой крышкой.
5. Одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл.
6. Штативы для микропробирок и автоматических пипеток.
7. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл (25-100°C).

8. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл (16 тыс. g).
9. Встряхиватель (вортекс) для пробирок типа «Эппендорф» 1,5 мл.
10. Напольная центрифуга (3 тыс. g).
11. Холодильник на 2-8°C с морозильной камерой (до -20°C).
12. Одноразовые резиновые перчатки.
13. Одноразовый халат.
14. Противоаэрозольные респираторы (с фильтром HEPA).

Перед началом пробподготовки необходима предварительная обработка помещения ультрафиолетом, полов и рабочих поверхностей – хлорсодержащими материалами. Необходимо использование чистых перчаток, одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим пипеткам.

Все исследования в помещении для пробподготовки выполняются исследователем, одетым в одноразовый халат, резиновые перчатки, колпак и противоаэрозольный респиратор с фильтром HEPA. По окончании работы одноразовая одежда подвергается автоклавированию. Срок использования противоаэрозольного респиратора с фильтром HEPA - 3 мес.

По завершении данного этапа необходимо провести уборку в ламинарном шкафу и включить бактерицидную лампу. Все отработанные расходные материалы помещают в мешки для сбора биологических отходов и переносят в специально предназначенное помещения для автоклавирования отходов.

II. Помещение для проведения ПЦР-исследования.

В этом помещении в одном ПЦР-боксе собирают реакционную смесь для ПЦР из набора тест-систем «ТБ-БИОЧИП», а в другом - выделенные образцы ДНК МБТ, которые переносят в предварительно подготовленные пробирки с реакционной смесью. Полученные смеси помещают в амплификатор и проводят ПЦР по специальной программе. Любые виды работ с инфекционными агентами в этом помещении проводить запрещено. Помещение должно содержать необходимое оборудование и аппаратуру:

1. Настольный ПЦР-бокс с бактерицидной лампой - 2 шт.
2. Амплификатор (типа «Терцик»).
3. Набор автоматических пипеток переменного объема (2-10 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл) для приготовления реакционной смеси.
4. Набор автоматических пипеток переменного объема (2-10 мкл; 20-200 мкл) для внесения ДНК МБТ.
5. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольными фильтрами, объемом до 10, 20, 200 и до 1000 мкл.
6. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,2 или 0,5 мл (в зависимости от модели амплификатора).
7. Пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл.

8. Штативы для микропробирок (80x1,5 мл, 0,5 мкл), автоматических пипеток.
9. Штатив с крышкой для замораживания (до -70°C) пробирок 1,5 – 2,0 мл (100 мест).
10. Холодильник на 2-8°C с морозильной камерой.
11. Одноразовые резиновые перчатки.
12. Отдельные халаты для работы в разных ПЦР-боксах.

III. Помещение для электрофореза и гибридизации на биочипах.

В этом помещении проводят электрофорез (детекцию полученных ампликонов после проведения ПЦР). Данное помещение должно быть максимально изолировано от помещений, где проводят пробоподготовку и ПЦР-исследования. Гибридизацию на биочипах можно проводить в этом помещении, но в отдельном ПЦР-боксе.

Необходимое оборудование и аппаратура:

1. Настольный ПЦР-бокс с бактерицидной лампой.
2. Лабораторный стол для приготовления буфера для электрофореза.
3. Камера для горизонтального электрофореза с гребенками для формирования кармашков в пластине геля.
4. Источник постоянного тока для электрофореза со стабилизатором.
5. Ультрафиолетовый трансиллюминатор для просмотра гелей.
6. Электронные весы с точностью взвешивания до 10 мкг.
7. Посуда из термостойкого стекла: мерные цилиндры на 50 мл, 1 литр; колбы на 200 мл.
8. Электроплитка или микроволновая печь для расплавления агарозы, поддерживающая температуру до +150°C.
9. Термостат суховоздушный, до 60°C.
10. Холодильник -20/+10°C.
11. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (2-10 мкл; 20-200 мкл) для внесения ампликонов в пластины геля.
12. Отдельный набор автоматических пипеток переменного объема (2-10 мкл; 20-200 мкл) для внесения смеси гибридизационного буфера и ампликонов в гибридизационную камеру.
13. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольными фильтрами 0,5-10 мкл, 20 мкл, 1-200 мкл.
14. Одноразовые полипропиленовые микропробирки для ПЦР на 0,5 мл.
15. Штативы для микропробирок, автоматических пипеток.
16. Штатив с крышкой для замораживания (до -70°C) пробирок 1,5 – 2,0 мл (100 мест).
17. Одноразовые резиновые перчатки.
18. Одноразовые халаты.

IV. Помещение для регистрации результатов.

В этом помещении проводят подготовку чипов для их компьютерного анализа и регистрации результатов, а также просмотр чипов в чип-детекторе,

регистрацию результатов в лабораторном анализе и заполнение бланка анализа. Помещение должно содержать оборудование:

1. Термостат на 37°C для инкубации чипов.
2. Раковина для отмывания чипов.
3. Лабораторный стол для просушки чипов.
4. Стол лабораторный (моющийся) для компьютерной системы.
5. Компьютерная система с чип-детектором.
6. Компьютер для регистрации полученных результатов.

Все рабочие помещения должны быть оснащены ультрафиолетовыми лампами с максимумом излучения в области 254 нм (типа ДБ-60) из расчета 2,5 Вт на 1 м³. Лампы должны быть расположены так, чтобы прямому облучению подвергались поверхности рабочих столов, оборудование и материалы, с которыми имеет контакт оператор во время проведения ПЦР-анализа. Облучение необходимо проводить в течение 1 часа до начала работы и в течение 1 часа после окончания работы. В каждой комнате должна быть установлена раковина с проточной водопроводной водой.

Работа должна проводиться в лабораторной одежде, сменяемой при переходе из одного помещения в другое, и в одноразовых перчатках, так как анализируемые респираторные образцы являются потенциально опасным инфицированным материалом. Желательно, чтобы на разных этапах проведения ПЦР-анализа работали различные сотрудники.

Следует использовать отдельные наборы дозаторов, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, предназначенных для различных стадий анализа, и не переносимых из одного помещения в другое. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

Клинические образцы следует хранить отдельно от реагентов

Штат для работы в лаборатории молекулярной диагностики должен включать как минимум двух сотрудников: врача-лаборанта (амплификация, гибридизация, компьютерный анализ и регистрация результатов) и лаборанта (пробоподготовка). Сотрудники должны иметь сертификаты по специальности «ПЦР-диагностика». Временные затраты на проведение каждой операции биочип-диагностики приведены в Приложении 1.

Один день в неделю обязательно отводится для полной санитарной обработки всех рабочих помещений. Для обработки и уборки рабочего места необходимо в каждом помещении иметь ватно-марлевые тампоны (салфетки), пинцет, дезинфицирующий и инактивирующий растворы, не содержащие хлор.

НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ.

Работа в лаборатории проводится согласно следующим действующим нормативным документам:

- санитарные правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- методические указания 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патологическими биологическими агентами III-IV групп патогенности».
- методические указания 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами III-IV групп патогенности».
- методические указания 3.5.5.1034-01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности при работе методом ПЦР».
- правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждениях системы здравоохранения СССР, Москва, 1981г.

Данные нормативные документы рекомендуется иметь в наличии непосредственно в ПЦР-лаборатории.

В задачи авторов руководства не входит детальное описание содержания настоящих документов, поэтому мы ограничимся наиболее существенными, с нашей точки зрения, моментами, представленными в этих документах.

Лицензирование и режим работы в ПЦР-лаборатории.

ПЦР-лаборатория должна пройти лицензирование для работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности. Хранение патогенных биологических агентов (ПБА), к которым относится и материал, содержащий МБТ, допускается только в помещениях заразной зоны.

Для ПЦР-лаборатории, должен быть разработан документ, определяющий режим безопасной работы в конкретных условиях, с учетом характера работ, особенностей технологии, свойств микроорганизма и продуктов его жизнедеятельности. При этом требования безопасности не должны быть ниже требований, регламентируемых СП 1.3.2322-08. Документ должен быть согласован с комиссией по контролю соблюдения требований биологической безопасности организации и утвержден руководителем.

Допуск к работе в ПЦР-лаборатории и посещению лаборатории другими специалистами.

Работу с МБТ методом ПЦР выполняют специалисты с высшим и средним специальным образованием, прошедшие подготовку на лицензированных курсах специализации (повышения квалификации) по молекулярно-генетическим (ПЦР) методам диагностики. Допуск персонала к работе должен осуществляться на основании приказа руководителя организации, издаваемого один раз в два года с условием проверки знаний персоналом требований биологической безопасности. Инструктажи по соблюдению требований биологической безопасности должны проводиться не реже 1 раза в год. Допуск инженерно-технического персонала к обслуживанию оборудования оформляется на основании приказа руководителя организации один раз в два года. Разрешение на посещение лаборатории, цеха, участка, конкретного рабочего места инженерно-техническому персоналу, не работающему постоянно в организации, выдает руководитель подразделения. Посещение должно осуществляться в сопровождении сотрудника структурного подразделения после прекращения работы и проведения текущей дезинфекции. Посещение должно регистрироваться в специальном журнале.

Все сотрудники ПЦР-лаборатории должны проходить периодические медицинские осмотры в соответствии с нормативными документами.

Помещения и рабочие зоны ПЦР-лаборатории.

ПЦР-лаборатория должна включать следующий минимальный набор рабочих зон:

- приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала;
- выделения НК;
- приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР;
- детекции продуктов амплификации методом электрофореза или ГИФА.

В ПЦР-лабораториях необходимо также предусмотреть наличие вспомогательных помещений (комнаты ведения учетных документов или ординаторской (комнаты персонала); кабинета заведующего лабораторией (может быть объединен с комнатой персонала); раздевалки для сотрудников; комнаты приема пищи; туалета; подсобных (складских) помещений, которые могут быть общими с другими подразделениями учреждения). ПЦР-лаборатория должна иметь два входа: один – для сотрудников, другой – для передачи исследуемого материала (допускается наличие окна).

Объемно-планировочные решения и размещение оборудования должны обеспечивать поточность движения материала.

Зону выделения нуклеиновых кислот размещают в отдельном помещении. При необходимости этап выделения НК может быть совмещен в одном помещении с этапом приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР при наличии в нем отдельных ПЦР-боксов (боксов биологической безопасности) - для подготовки реакционных ПЦР-смесей и для выделения НК. В помещение выделения НК материал доставляют только

в закрытых одноразовых пробирках в виде маркированных аликвот. В зоне приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР производят приготовление ПЦР-смеси, внесение в пробирку для ПЦР выделенных препаратов ДНК или кДНК, обратную транскрипцию РНК и амплификацию ДНК или кДНК. Помещение для приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР должно быть отдельным. Приготовление реакционных ПЦР-смесей проводят в ПЦР-боксе.

Зону детекции продуктов амплификации располагают в отдельном помещении, по возможности оснащенном ПЦР-боксом.

Вентиляция.

При строительстве новых или реконструкции имеющихся ПЦР-лабораторий помещения оборудуют приточно-вытяжной или вытяжной вентиляцией. Следует полностью исключить воздухообмен между помещением детекции продуктов амплификации и другими помещениями. Разница в давлении воздуха в помещениях ПЦР-лаборатории достигается за счет различий в кратности воздухообмена в них. Кратность воздухообмена должна соответствовать значениям, приведенным в таблице.

Наименование помещения	Кратность воздухообмена (куб.м/ч)	
	приток	вытяжка
Зона приема, регистрации, разбора и первичной обработки материала	5	6
Зона выделения нуклеиновых кислот	5	6
Зона приготовления реакционных смесей и проведения ПЦР	5	5
Зона детекции продуктов амплификации	5	7

Требования к внутренней отделке и оборудованию помещений.

На границе «чистой» и «заразной» зон должен располагаться санитарный пропускник. Внутренняя отделка помещений должна быть выполнена в соответствии с их функциональным назначением и гигиеническими нормативами. Поверхность пола, стен, потолка в лабораторных помещениях «заразной» зоны должна быть гладкой, без щелей, устойчивой к многократному действию моющих и дезинфицирующих средств. Полы должны быть не скользкими, иметь гидроизоляцию. В помещениях «заразной» зоны не допускается устройство подпольных каналов и подвесных потолков, а выступающие и проходящие трубы (батареи отопления) располагают на расстоянии от стен с целью возможности проведения их дезинфекции. Места ввода инженерных коммуникаций должны быть герметичными. Отопительные приборы должны иметь гладкую легко очищаемую поверхность. Окна и двери помещений «заразной» зоны лаборатории должны быть герметичными. Допускается заполнение оконных проемов стеклоблоками. Помещения лабораторий должны быть непроницаемы для грызунов и насекомых. Окна цокольного и первого этажей независимо от наличия охранной сигнализации должны быть

оснащены металлическими решетками, не нарушающими правил пожарной безопасности. Двери должны иметь запирающие устройства. Ширина проходов к рабочим местам или между двумя рядами выступающего оборудования должна быть не менее 1,5 метра. Помещения на всех этапах ПЦР-анализа оборудуют бактерицидными лампами в соответствии с «Методическими указаниями по применению бактерицидных ламп для обеззараживания воздуха и поверхностей в помещениях» № 11-16/03-06 от 28.02.95. Бактерицидные лампы в помещениях ПЦР-лаборатории устанавливаются из расчета 2,5 Вт/куб. м.

Использование лабораторного оборудования и мебели.

Лабораторное оборудование и мебель (столы, стеллажи для содержания животных, стулья и т.д.) должны быть гладкими, без острых краев и шероховатостей и иметь покрытие, устойчивое к действию моющих и дезинфицирующих средств. Поверхность столов не должна иметь швов и трещин. В помещениях «заразной» зоны не допускается использование мебели из древесины и с мягким покрытием. Для работы с МБТ должны применяться боксы биологической безопасности II класса. Все работы в боксах биологической безопасности проводят на поддонах с салфетками, смоченными дезинфицирующим раствором. Работа должна выполняться ближе к задней стенке бокса биологической безопасности II класса и быть видимой снаружи.

Боксы биологической безопасности должны проверяться на защитную эффективность:

- после монтажа и подготовки к использованию;
- не реже одного раза в год при наличии фильтров предварительной очистки воздуха от крупнодисперсных частиц;
- не реже одного раза в полугодие при отсутствии фильтров предварительной очистки воздуха от крупнодисперсных частиц;
- после перемещения или ремонта бокса.

При проверке должна определяться эффективность работы фильтров очистки воздуха, скорость воздушного потока в рабочем проеме бокса.

Доставка и разборка материала.

Доставка в лабораторию материала для исследования осуществляется в контейнерах, биксах или в сумках-холодильниках. Доставляемые емкости с жидкими материалами должны быть закрыты пробками, исключающими выливание содержимого во время транспортирования. Дно контейнеров, содержащих емкости с ПБА, должно быть покрыто адсорбирующим материалом (марлевая салфетка, ткань, вата и пр.). Не допускается доставка материала в хозяйственных сумках, чемоданах, портфелях и других предметах личного пользования. Прием и разборка доставленного материала (проб) должны проводиться с соблюдением мер предосторожности. Емкости с ПБА должны помещаться на поднос или лоток, покрытый многослойной

марлевой салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором. Персонал должен использовать маску⁹ и резиновые перчатки.

Утилизация отходов.

Все жидкие отходы, образующиеся в процессе работы в «заразной» зоне, перед сбросом в канализационную систему подлежат обязательному химическому или термическому обеззараживанию. Перенос ПБА и использованной посуды для обеззараживания должен осуществляться в закрывающихся емкостях.

После проведения детекции и учета результатов исследования пробирки с продуктами ПЦР и использованные наконечники к микродозаторам подвергают первичной обработке дезинфицирующими растворами, вызывающими деградацию ДНК (например, 0,2% раствор ДП-2Т или другие аналогичные ему, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке). Процедуру проводят непосредственно в комнате учета результатов амплификации. Окончательную дезактивацию использованных расходных материалов и реагентов (гель, буфер для электрофореза) производят в автоклавной комнате.

Для дезинфекции медицинских отходов применяют химический и физический методы обеззараживания по режимам, обеспечивающим гибель соответствующих возбудителей. Дезинфекция выделений, крови, мокроты и др. проводится также сухими хлорактивными дезинфицирующими средствами (хлорная известь, кальция гипохлорит нейтральный и пр.). Возможно одновременное обеззараживание и утилизация медицинских отходов с использованием установок, разрешенных к применению в установленном порядке.

Обеззараживание медицинских отходов классов Б и В (белье, маски, спецодежда, салфетки, изделия медицинского назначения однократного применения и др.) перед утилизацией осуществляют в местах их образования способом погружения в растворы дезинфицирующих средств в соответствии с санитарными правилами и нормами «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений» (СанПиН 2.1.7.728-99, утверждены 22.01.1999г.).

Обработка помещений и дезинфекция.

В лаборатории должен храниться как минимум недельный запас дезинфицирующих средств. Вновь поступающие на склад партии дезинфицирующих средств необходимо контролировать на содержание действующего вещества.

Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами». Перед началом работы рабочую поверхность столов дополнительно обрабатывают 70%-ным этиловым спиртом. Ежемесячно проводят профилактическую обработку рабочей поверхности

⁹ В случае работы с материалом, содержащим МБТ, следует использовать респираторы.

столов и штативов 1 N соляной кислотой. Текущая уборка помещений проводится ежедневно влажным способом после окончания рабочего дня: в «чистой» зоне лаборатории с применением моющих средств, в «заразной» зоне с применением дезинфектантов. В комнатах, в которых проводят работу с выделенными НК, рабочие поверхности, штативы, оборудование следует обеззараживать ежедневно ультрафиолетовым излучением в течение 1 часа. Уборочный инвентарь должен быть промаркирован отдельно для «чистой» и «заразной» зон. Перенос его из одной зоны в другую не допускается. Стеклоочистительные поверхности бактерицидных ламп следует протирать в выключенном положении ветошью, смоченной спиртом, не реже 1 раза в неделю.

Рабочая одежда сотрудников ПЦР-лаборатории и требования к личной гигиене.

Сотрудники лабораторий должны быть обеспечены рабочей одеждой: медицинскими халатами, пижамами (комбинезонами), шапочками, сменной обувью и средствами индивидуальной защиты в зависимости от характера выполняемых работ и в соответствии с действующими нормативными документами. Каждое помещение для проведения исследований методом ПЦР оснащают индивидуальным набором одежды, используемой только в данном помещении. При работе в помещении детекции продуктов амплификации следует надевать бахилы. Перемещение одежды из зоны в зону категорически не допускается. Рекомендуется использование одноразовой одежды. Рабочая одежда и обувь должны соответствовать размерам работающих и храниться отдельно от личной одежды. Смена рабочей одежды должна проводиться по мере загрязнения, но не реже 1 раза в неделю. Перед сдачей в стирку защитная одежда должна быть обеззаражена. Обработку рабочей одежды из зоны детекции продуктов амплификации проводят отдельно от одежды из других зон. По окончании работ медицинский персонал должен обработать руки дезинфицирующим раствором или 70% спиртом с последующим мытьем с мылом. Допускается использование кожных антисептиков в соответствии с инструкциями по применению.

Действия сотрудников лаборатории при контаминации.

При возникновении контаминации лаборатории проводят следующие мероприятия:

- утилизацию всех находящихся в «контаминированной» зоне реактивов;
- утилизацию исследуемых материалов на всех промежуточных стадиях обработки (кроме исходной);
- генеральную уборку, химическую и ультрафиолетовую дезинфекцию всех поверхностей лабораторных помещений;
- дезинфекцию мебели, рабочих поверхностей, а также поверхностей корпусов приборов и оборудования химическим методом и ультрафиолетовым излучением;

- обработку паром под давлением всей спецодежды «контаминированной» зоны.

Случаи контаминации регистрируют в специальном журнале с указанием мероприятий по ее устранению и результатов внутрилабораторного контроля. Проведение ПЦР-исследований до завершения деконтаминационных мероприятий не допускается.

Детально действия сотрудников при контаминации описаны в Приложении 3 методических указаний МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патологическими биологическими агентами III-IV групп патогенности».

Контроль качества исследований.

В ПЦР-лаборатории, проводящей работы с ПБА III-IV групп патогенности, проводят внутрилабораторный контроль качества дезинфекции, исследование смывов с рабочих поверхностей и воздушной среды боксов. В ПЦР-лаборатории проводят внутрилабораторный контроль качества ПЦР-исследований. ПЦР-лаборатория принимает участие во внешнелабораторном контроле качества деятельности генодиагностических лабораторий. Внутрилабораторный контроль проводят с периодичностью, зависящей от объема выполняемой работы и определяемой руководителем лаборатории, но не реже одного раза в квартал. Количество проб зависит от объема проводимых исследований и должно быть достаточным для оценки работы сотрудников и выявления контаминированных участков лаборатории. Для выявления возможной контаминации лаборатории нуклеиновыми кислотами контроль проводят путем взятия смывов с поверхностей. Смывы с поверхностей берут стерильными ватными тампонами (зондами). Перед взятием смывов тампоны (зонды) смачивают стерильным физиологическим раствором или ТЕ-буфером (10 mM Tris, 1 mM ЭДТА), после чего вращательными движениями протирают рабочие поверхности. После взятия смыва зонд помещают в микропробирки типа «эппендорф» с 300-400 мкл ТЕ-буфера, вращают в течение 10-15 с, избегая разбрызгивания раствора, и, отжав избыток жидкости о стенки пробирки, удаляют. Полученные суспензии центрифугируют при 8000 g (12000 об./мин.) в течение 1 мин. Надосадочную жидкость отбирают наконечником с аэрозольным барьером в микропробирку объемом 1,5 мл. Для выделения НК используют 0,1-0,2 мл надосадочной фракции. В качестве критериев оценки качества исследований методом полимеразной цепной реакции в лаборатории учитывают результаты внутреннего и внешнего лабораторного контроля, а также отсутствие случаев лабораторной контаминации нуклеиновыми кислотами.

ОЦЕНКА СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА БИОЧИП-ДИАГНОСТИКИ.

В традиционном для фармакоэкономических исследований подходе¹⁰ экономическая оценка эффективности определенной медицинской программы, метода лечения или диагностики определяется путем сопоставления выраженных в материальных единицах преимуществ внедрения новых манипуляций и затрат, связанных с их внедрением и проведением. То есть, экономический анализ эффективности того или иного метода в условиях стационара заключается в сравнительной оценке клинической эффективности и требуемых денежных затрат на его проведение при сопоставлении с традиционными применяемыми методиками.

При определении затрат принимается во внимание их различная природа, что находит отражение в их классификации на прямые, не прямые и косвенные затраты. При этом стоимость лекарственных препаратов является лишь одной из многих составляющих прямых медицинских затрат, другие составляющие прямых затрат обычно включают:

- расходы на содержание пациента в лечебном учреждении;
- стоимость профессиональных медицинских услуг (плата за врачебные консультации, оплата рабочего времени врачей и медицинских сестер);
- стоимость лекарственных препаратов;
- стоимость лабораторного и инструментального обследования;
- стоимость медицинских процедур (лечение, реабилитационные мероприятия, санитарно-противоэпидемические мероприятия);
- стоимость питания больного в стационаре и др.;

Более сложным представляется учет не прямых затрат, связанных с потерей трудоспособности пациентом из-за лечения, заболевания или смерти, или производственные потери, которые несут навещающие пациента члены его семьи или друзья. К ним относят

- затраты за период отсутствия пациента на его рабочем месте из-за болезни или выхода на инвалидность;
- «стоимость» времени отсутствия на работе членов семьи пациента или его друзей, связанного с его болезнью;
- экономические потери от снижения производительности на месте работы;
- потеря дохода для семьи и т.д.

Косвенные затраты измерять количественно крайне трудно, и поэтому они обычно остаются за рамками выполняемого фармакоэкономического анализа.

¹⁰ Авксентьева М.В., Воробьев П.А., Герасимов В.Б. и др. Экономическая оценка эффективности лекарственной терапии (фармакоэкономический анализ). – М., «Ньюдиамед», 2000.

Целью настоящих оценок не является полнота учета всех положительных последствий внедрения технологии диагностики на основе биологических микрочипов. Они многообразны и их инновационный потенциал не исчерпывается только полученными результатами. Цель состоит в корректной оценке бюджетной эффективности внедрения данной технологии в практику специализированных медицинских учреждений сегодня. Исходя из этого, при определении критерия эффективности подлежат учету только краткосрочные (в масштабах периода лечения) эффекты и связанные с ними прямые и непрямые материальные затраты.

Для оценки экономической эффективности внедрения биочип-диагностики нами выбран критерий, отражающий размер экономии бюджетных средств, связанных с лечением заболевания в расчете на единицу затрат при внедрении и использовании технологии. При этом положительный экономический эффект будет складываться из составляющих:

1. Экономия за счет сокращения затрат на содержание пациента в лечебном учреждении.
2. Сокращение расходов на выплату по листам временной нетрудоспособности за счет сокращения периода временной нетрудоспособности.
3. Сокращение потерь бюджетов всех уровней и внебюджетных фондов от не начисленных и не поступивших налогов и отчислений за счет более быстрого восстановления трудоспособности пациентов и возвращения их к активной деятельности.

Затраты на внедрение и использование биочип-диагностики туберкулёза определяются совокупной стоимостью анализов, необходимых для получения результата о наличии выделения МБТ, их чувствительности к наиболее активным противотуберкулёзным препаратам. Совокупная стоимость анализа включает:

1. Текущие затраты на проведение анализа (расходные материалы, заработная плата персонала и т.п.).
2. Стоимость амортизации основного оборудования.

Указанные ниже расчеты будут применимы к крупному региональному центру по борьбе с туберкулёзом, осуществляющему мониторинг, выявление и лечение туберкулёза с пропускной способностью 1000 – 2500 больных ежегодно. Протокол расчета предусматривает проведение 3-х последовательных ежедневных анализов для определения наличия бактериовыделения и лекарственной чувствительности МБТ.

Принятым в настоящее время протоколом диагностики регламентировано параллельное использование биочип-диагностики и культуральных исследований. Рассматривается два варианта штатного первичного оснащения центра диагностическим оборудованием: культуральная диагностика на твердых средах и автоматизированные системы диагностики с использованием жидких сред. Стоимость одного

анализа с использованием этих методов известна, и составляет около 200 рублей для культуральной диагностики на твердых средах, и около 700 рублей при проведении диагностики на импортных жидких средах фирмы B&D, BioMerieux.

Расчет стоимости одной диагностической манипуляции представлен в таблице 1.

Таблица 1

Стоимость проведения диагностики с использованием Биочипов

Наименование статьи затрат	Затраты
<u>Инвестиционные затраты:</u>	
- универсальное лабораторное оборудование, руб.	1 800 000 – 2 300 000
- специализированное оборудование (АПК), руб.	600 000
- подготовка помещений ¹¹ , руб.	600 000 – 1 000 000
- обучение персонала, руб.	200 000
ИТОГО инвестиционных затрат:	<u>3 200 000 - 4 100 000</u>
<u>Амортизационные затраты:</u>	
1. Ресурс по специализированному оборудованию, проб	20 000
2. Ресурс по лабораторному оборудованию и помещениям, лет	15
ИТОГО амортизационные затраты, руб./пробу.	55-65
<u>Удельные текущие затраты</u>	
1. Набор реактивов, включая стоимость чипа и расходных материалов лаборатории пробподготовки, руб./пробу	650
2. Расход электроэнергии, руб./пробу (при полной загрузке)	менее 5 ¹²
3. Фонд заработной платы, руб./пробу.	70
ИТОГО удельные текущие затраты	820
Суммарная стоимость анализа = Амортизационные затраты + Удельные текущие затраты = 885 руб. за пробу.	

Отдельно следует учесть такой показатель, как **коэффициент избыточности чипов (Ки)**. В силу различных обстоятельств (в том числе – научных исследований и необходимости проведения контроля качества) в медицинских учреждениях используется на 20% больше чипов, чем в

¹¹ Без учета стоимости подготовки помещений (кабин) для сбора мокроты, поскольку их наличие необходимо и в случае классических методов культуральной диагностики.

¹² Незначительная величина, рассчитана при следующих исходных данных по расходу: в среднем 2 кВт/час за 6 часов работы и 0,3 кВт/час при 5 рабочих днях в неделю с нагрузкой 6 тыс. анализов в год.

соответствии с диагностическим протоколом. Эмпирически рассчитано, что $K_{и} \approx 1,2$. В период внедрения технологии он может составлять 1,3, а при отработанной тактике обследования – 1,15.

Таким образом, расходы на проведение каждого анализа составляют $880 * K_{и}$.

Сумма положительных эффектов от внедрения биочип-диагностики рассчитывается исходя их трех составляющих:

1. Годовая экономия за счет сокращения средств на содержание больного в медицинском учреждении, возникающая вследствие более оперативной диагностики формы заболевания и правильного назначения лечения рассчитывается по формуле [1]:

$$[1] \quad \mathcal{E}_1 = K_{млу} * N * P_1 * T_{1,2}, \text{ где:}$$

\mathcal{E}_1 – годовая экономия за счет сокращения средств на содержание больного в медицинском учреждении.

$K_{млу}$ – среднее распространение туберкулёза с МЛУ МБТ в общем входном потоке. Данную величину рекомендуется брать из внутрилабораторной документации – полицейского регистра лекарственной чувствительности. Если такой учет не ведется, данную величину можно приблизительно определить по форме 7-ТБ:

$$K_{млу} \approx \frac{\text{Ф.7 – ТБ, т.2000, подстрочник 2001(5) + подстрочник 2001(6)}}{\text{Ф.7 – ТБ, т.2000, подстрочник 2001(1) + подстрочник 2001(2)}}$$

Показатель, полученный по сведениям из ф. 7-ТБ не является полностью сформированным, поскольку в нем имеются сведения только о впервые выявленных больных и больных с рецидивом туберкулёза.

N – ежегодное число больных, которым проводится культуральная диагностика.

P_1 – стоимость одного койко-дня в специализированном медицинском учреждении (в соответствии с бюджетными обязательствами субъекта РФ). Она включает в себя расходы на содержание (с учетом основного и вспомогательного персонала), обслуживание и питание, в рублях.

$T_{1,2}$, где – сокращение времени лечения пациента за счет внедрения биочип-диагностики (в сутках).

2. Экономия на оплате больничных листов по временной нетрудоспособности за счет сокращения времени нахождения в стационаре рассчитывается по формуле [2]:

$$[2] \quad \mathcal{E}_2 = K_{млу} * N * Z_c * T_{1,2} / 30, \text{ где:}$$

\mathcal{E}_2 – экономия на оплате больничных листов по временной нетрудоспособности за счет сокращения времени нахождения в стационаре

Z_c – средняя заработная плата в субъекте РФ.

3. Восполнимые потери бюджетов по налогам и отчислениям во внебюджетные фонды, связанные с периодом временной нетрудоспособности, рассчитываются по формуле [3]:

$$[3] \quad \text{Э}_3 = K_{\text{млу}} * N * Z_c * 0,26 * 0,84 * T_{1,2} / 30 + K_{\text{млу}} * N * Z_c * 0,13 * T_{1,2} / 30, \text{ где:}$$

Э_3 – Восполнимые потери бюджетов по налогам и отчислениям во внебюджетные фонды, связанные с периодом временной нетрудоспособности.

Первое слагаемое определяет отчисления работодателя во внебюджетные фонды, а второе – подоходный налог, уплачиваемый работником. В сокращенном виде данная формула записывается как [4]:

$$[4] \quad \text{Э}_3 = 0,44 * K_{\text{млу}} * N * Z_c * T_{1,2} / 30$$

При проведении оценок по формулам [1]-[4] не учитывается два фактора:

1. Внутрибольничное заражение лекарственно-устойчивыми формами туберкулёза вследствие длительного периода диагностики, и, как следствие, неоптимальной организацией лечебного процесса больных с различной лекарственной чувствительностью возбудителя.
2. Наличие «зон нечувствительности» культуральных технологий диагностики. В 50% случаев для диагностики с использованием твердых питательных сред и в 25% случаев для технологии с использованием систем ускоренной диагностики на жидких питательных средах культуры МБТ не дают роста.

Эти факторы можно учесть нижеследующим образом.

Внутрибольничное заражения ведет к увеличению числа больных с устойчивостью МБТ к ПТП, в том числе – множественной. По данным ряда авторов, использовавших культуральную диагностику МБТ на твердых средах, при неблагоприятных условиях один больной, выделяющий лекарственно-устойчивые МБТ, способен за время ожидания анализа заразить до 20 человек с чувствительной к ПТП формой заболевания. Однако на практике этому препятствуют проводимые санитарно-гигиенические и противоэпидемические мероприятия.

В качестве рабочей гипотезы мы принимаем, что этот показатель составляет не более 1 зараженного каждым больным, выделяющим МЛУ МБТ при проведении культуральной диагностики на твердых средах, и не более 0,5 для ускоренных методов культуральной диагностики с использованием жидких сред. Число больных МЛУ МБТ во входном потоке увеличивается, но одновременно увеличивается время лечения для вновь появившейся группы за счет смещения времени начала правильного лечения в точку, где выясняется о наличии новой формой заболевания. Как минимум, можно принять, что это время составляет время ожидания результата

первичного анализа¹³. То есть у той части больных, которые подверглись внутрибольничному заражению, время лечения существенно возрастает, а, следовательно, возрастает и время, на которое сокращается лечение при применении биочип-диагностики.

Среднее время ожидания анализа составляет 77 дней для системы диагностики с использованием твердых сред, и 15 дней при использовании систем ускоренной диагностики на жидких средах.

Наличие «зон нечувствительности» ведет к увеличению срока ожидания анализа. Если предположить, что факт отсутствия роста определяется после истечения 2/3 стандартного срока анализа, то это будет означать, что у 20% (при использовании систем ускоренной диагностики на жидких питательных средах) – 60 % (при использовании твердых сред), время фактического начала лечения сдвигается на этот же срок.

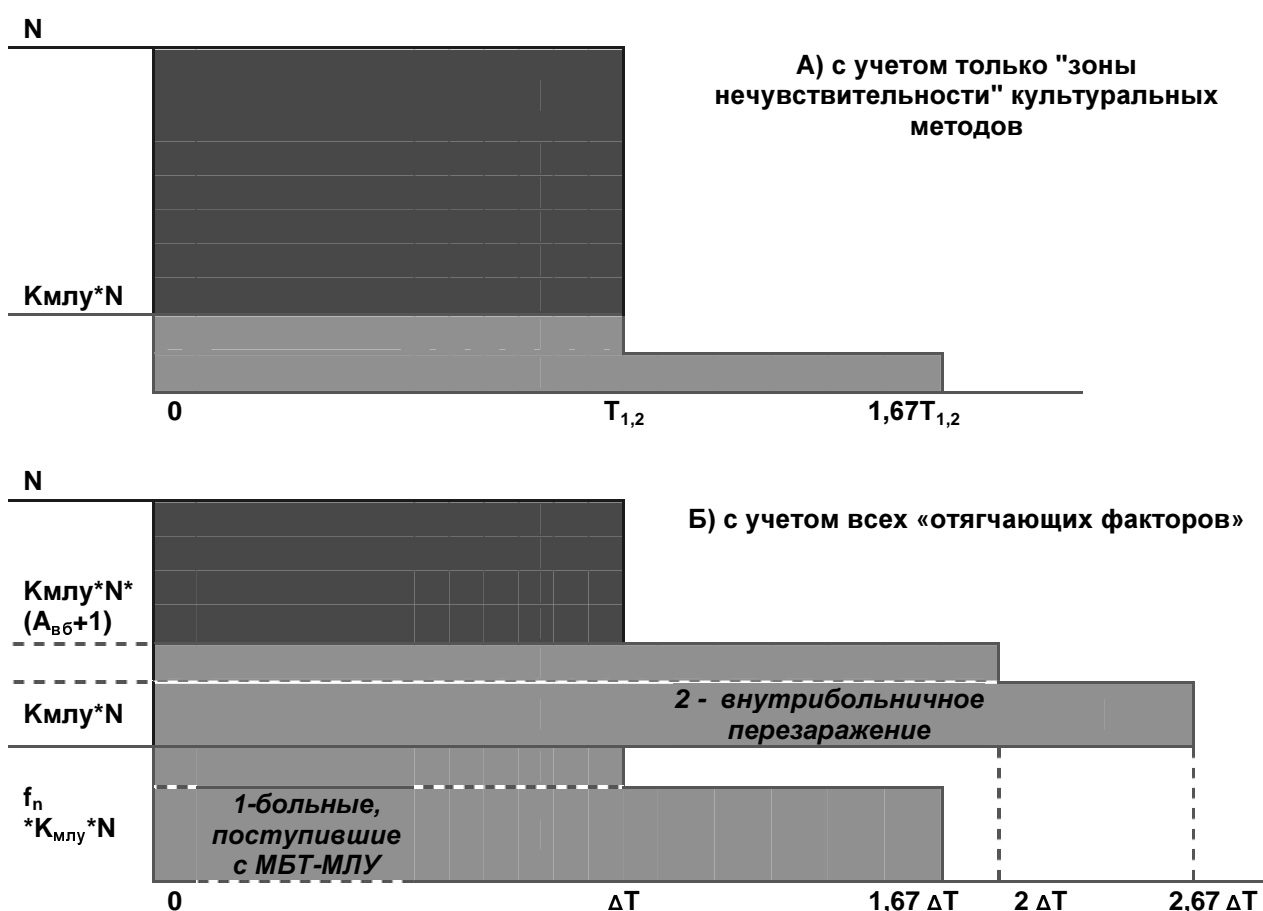


Рисунок 9. Сокращение временной нетрудоспособности вследствие ликвидации внутрибольничного заражения при своевременной диагностике лекарственной устойчивости МБТ.

На представленных в координатах NT рисунках красное поле характеризует область сокращения временной нетрудоспособности, вызванной заболеванием. Видно, что в отсутствие «отягчающих факторов» значение постоянного фактора R_i (формула 4) определяется площадью

¹³ В действительности гораздо больше, поскольку первичный анализ содержит посев культур, которые брались еще не у зараженного лекарственно-устойчивыми МБТ больного.

большого красного прямоугольника. С учетом наличия «зоны нечувствительности» этот показатель возрастает на величину площади малого красного прямоугольника, которая связана с тем, что для части пациентов через время $0,67T$ выясняется отсутствие роста посева и анализ повторяется.

Ниже данная картина представлена с учетом внутрибольничного перекрестного заражения больных устойчивой формой заболевания. Видно, что к моменту времени T в результате этого процесса появляется дополнительная группа больных с устойчивой формой заболевания, у которой первично взятый анализ даст результат, соответствующий моменту поступления в стационар, а не реальному состоянию на момент получения результата. Для них повторная диагностика начнется не ранее времени T , которая опять же с учетом особенностей чувствительности методов даст результат, статистически аналогичный первой группе с МБТ-МЛУ.

Таким образом, суммарный эффект от наличия «зоны нечувствительности» культуральных методов и внутрибольничного перезаражения отображается площадью красной области на рис. Б и с учетом этого для вариантов 1 и 2 может быть учтен следующим образом:

$$[5] \quad R = K_{млу} \times N \times [(1 - f_n) \times (\Delta T - 3) + f_n \times (1,67 \times \Delta T - 3) + A_{вб} \times (1 - f_n) \times (2 \times \Delta T - 3) + A_{вб} \times f_n \times (2,67 \times \Delta T - 3)]$$

или в сокращенном виде:

$$[6] \quad R = K_{млу} \times N \times [\Delta T \times (2A_{вб} + 1) + 0,67 \times f_n \times \Delta T \times (A_{вб} + 1) - 3A_{вб} - 3]$$

Где:

R – Среднее время сокращения временной нетрудоспособности, дни

ΔT – среднее время ожидания анализа при использовании различных методов культуральной диагностики. В среднем оно составляет 77 для лабораторий, проводящих культуральную диагностику на твердых питательных средах и 15 при использовании систем ускоренной диагностики.

f_n – показатель, отражающий наличие «зон нечувствительности» методов культуральной диагностики. При использовании культуральной диагностики на твердых средах он составляет 0,5 (50%), а при использовании систем ускоренной диагностики – 0,25 (25%).

$A_{вб}$ – показатель, учитывающий внутрибольничное заражение во время ожидания результатов исследования. При использовании культуральной диагностики на твердых средах принимается за 1 (т.е., 1 больной с лекарственно-устойчивыми микобактериями успеваеет заразить одного

больного с лекарственно-чувствительным возбудителем), а при использовании систем ускоренной диагностики – 0,5.

С учетом [5, 6] общие показатели бюджетной экономии по различным статьям будут определяться следующим образом:

$$[7] \quad \mathcal{E}_1 = P_1 \times R$$

$$[8] \quad \mathcal{E}_2 = 3c \times R/30$$

$$[9] \quad \mathcal{E}_3 = 0,44 \times \mathcal{E}_2$$

Соответственно, суммарный положительный эффект (СГПЭ) можно рассчитать путем суммирования отдельных его компонентов:

$$[10] \quad \text{СГПЭ} = \mathcal{E}_1 + \mathcal{E}_2 + \mathcal{E}_3$$

В качестве примера, рассчитаем общие годовые затраты, связанные с внедрением биологических микрочипов, годовой положительный эффект от внедрения биочип-технологии и бюджетную эффективность от внедрения технологии в учреждении, в котором стоимость пребывания больного на койке составляет 1500 рублей в сутки, в год поступает 2000 больных с трудовым стажем, достаточным для получения максимальной оплаты больничных листов, средняя распространенность больных, выделяющих лекарственно-устойчивые МБТ (Кмлу) составляет 35%, используется культуральная диагностика с использованием твердых питательных сред, средний размер оплаты труда больных составляет 14 000 рублей, а оплата труда сотрудников лаборатории – 35 000 рублей. Коэффициент избыточности чипов (Ки) принимается равным 1,15.

1. Расчет суммарных годовых затрат.

Суммарные годовые затраты складываются из затрат на амортизацию помещений, оборудования и текущих затрат на производство исследований.

Амортизация = расход ресурса по спец. оборудованию + расход ресурса по лабораторному оборудованию и помещениям.

Исходя из того, что было закуплено универсальное лабораторное оборудование на сумму 2 000 000 рублей, проведена подготовка помещений, которая обошлась в 1 000 000 рублей, обучен персонал, который будет работать в течение 20 лет, а также закуплено специальное лабораторное

оборудование, рассчитанное на 20 000 анализов, рассчитываем годовые расходы на амортизацию.

Годовая амортизация (Га)=(стоимость полной амортизации универсального лабораторного оборудования)/15 лет+(стоимость полной амортизации подготовленных помещений)/15 лет+(стоимость обучения персонала, который будет работать в лаборатории)/20 лет+(стоимость полной амортизации специализированного лабораторного оборудования)/(20 000 проб / (ежегодное число проводимых тестов x Ки)).

Число проводимых тестов рассчитывается исходя из числа больных, проходящих через головное учреждение. На каждого больного приходится 3 теста. При этом необходимо также учесть показатель избыточности чипов (Ки).

Для вышеуказанного примера это значение составит: 7 200.

$G_a = 1\,800\,000/15 + 800\,000/15 + 600\,000/(20\,000/(2000*3*1,15)) + 200\,000/20 = 390\,333,33$ рубля, или 65,06 рублей за пробу.

Текущие затраты (Тз) складываются из стоимости реактивов, биочипа и расходных материалов лаборатории пробподготовки (650 рублей на пробу), расхода электроэнергии (1,86 рублей на пробу) и годового фонда заработной платы в расчете на 1 анализ (70 рублей на пробу) = 819,36 рублей за пробу.

Таким образом, стоимость одного анализа (Са) будет составлять:

$S_a = G_a + T_z = 65,06 + 819,36 = 884,41$ рублей за пробу.

При проектируемой загрузке оборудования 6000 проб в год, суммарные годовые затраты (СЗГ) составят:

$S_{ГЗ} = S_a * 6000 = 884,41 * 6000 = 5\,306\,469,33$ рублей.

2. Расчет суммарного годового положительного эффекта (СППЭ):

При использовании исходной технологии культуральной диагностики с определением лекарственной чувствительности МБТ на твердых питательных средах:

$R = K_{млу} * N * [\Delta T * (2 * A_{вб} + 1) + 0,67 * f_n * \Delta T * (A_{вб} + 1) - 3 * A_{вб} - 3]$
 $= 0,35 * 2000 * [77 * (2 * 1 + 1) + 0,67 * 0,5 * 77 * (1 + 1) - 3 * 1 - 3] = 193\,613$ дня

$\mathcal{E}_1 = P_1 * R = 1500 * 193\,613 = 290\,419\,500$ рублей

$\mathcal{E}_2 = 3c * R / 30 = 14\,000 * 193\,613 / 30 = 90\,352\,733,33$ рубля

$$\mathcal{E}_3=0,44 \times \mathcal{E}_2=0,44*90\ 352\ 733,33=39\ 755\ 202,67 \text{ рубля}$$

$$\text{СГПЭ} = \mathcal{E}_1^1 + \mathcal{E}_2^1 + \mathcal{E}_3^1 = 420\ 527\ 436,00 \text{ рублей}$$

3. Расчет бюджетной эффективности от внедрения биологических чипов (БЭ):

$$\text{БЭ}=\text{СГПЭ}/\text{СГЗ}=420\ 527\ 436,00/5\ 306\ 469,33= 79,2 \text{ раза}$$

Рассчитаем положительный эффект от внедрения биочип-диагностики и бюджетную эффективность от внедрения чипов при использовании в том же учреждении систем ускоренной диагностики на жидких питательных средах. При этом суммарные годовые затраты (СГЗ) остаются на том же уровне, что и в предыдущем примере (5 306 469,33 рублей).

$$R=K_{\text{млу}}*N * [\Delta T \times (2 \times \text{Авб} + 1) + 0,67 \times \text{fn} \times \Delta T \times (\text{Авб} + 1) - 3 \times \text{Авб} - 3] \\ =20488 \text{ дней}$$

$$\mathcal{E}_1=P_1 \times R_2=1500*20488= 30\ 732\ 187,50 \text{ рублей}$$

$$\mathcal{E}_2= 3c \times R_2/30=14000*(20\ 488/30)= 9\ 561\ 125 \text{ рублей}$$

$$\mathcal{E}_3=0,44 \times \mathcal{E}_2=0,44*9\ 561\ 125 =4\ 206\ 895 \text{ рублей}$$

$$\text{СГПЭ}=\mathcal{E}_1^2 + \mathcal{E}_2^2 + \mathcal{E}_3^2= 44\ 500\ 207,50 \text{ рублей}$$

$$\text{БЭ}=\text{СГПЭ}/\text{СГЗ}=44\ 500\ 207,5/5\ 306\ 469,33=8,4 \text{ раза.}$$

Проведенные оценки показывают высокую бюджетную эффективность внедрения биочип-технологии для диагностики туберкулеза и его лекарственно устойчивых форм. За счет высокой оперативности получения анализа и появлением в связи с этим возможности оптимально организовать лечение больного даже при использовании этой технологии параллельно с культуральными технологиями с использованием жидких сред ее использование экономит бюджету в 8,4 раза больше средств, чем необходимо затратить на ее внедрение. Для основной же массы российских специализированных медицинских учреждений, оснащенных оборудованием для диагностики на твердых средах, экономия составляет более 70 рублей на каждый вложенный рубль.

Полученные оценки можно считать вполне корректными, поскольку при проведении расчетов не принимались допущения, завышающие экономический эффект. В частности, не учитывались, либо сознательно занижалось влияние прямых расходов и косвенных последствий, которые возникают при неправильном лечении больных туберкулёзом, у которых лекарственная чувствительность МБТ не была определена.

Не учитывались положительные эффекты, возникающие при своевременной диагностике больных с резистентностью МБТ к одному или нескольким противотуберкулёзным препаратам без МЛУ МБТ.

Также принималось, что один пациент, выделяющий МЛУ МБТ заражает только одного пациента с лекарственно-чувствительными МБТ и не учитывалась стоимость повторных анализов, необходимых при неэффективной терапии вследствие внутрибольничного заражения и т.д.

Не учитывались и косвенные экономические эффекты.

При проведении расчетов оценивались только краткосрочные положительные эффекты, наличие и масштабы которых уже подтверждены практикой действующих центров. Эти расчеты позволяют корректно и обоснованно сформулировать критерии бюджетной эффективности проекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Реальный инновационный потенциал технологии не исчерпывается первыми полученными результатами. Во-первых, регулярное самостоятельное (не дублирующее другие методы) применение новой технологии на всех стадиях лечения по разработанным регламентам существенно повысит эффективность лечения. Кроме того, в разработке находятся новые типы чипов, среди них:

- чипы для выявления туберкулеза, вызываемого другими типами микобактерий, в том числе – *M. bovis*. Культуральная диагностика и типирование этих возбудителей в настоящее время затруднены, что препятствует своевременному назначению адекватного лечения.

- чипы для выявления туберкулеза, устойчивого ко всем известным в настоящее время лекарственным препаратам. В настоящее время количество этих больных не велико, но их доля растет, что представляет серьезную опасность.

- чипы в виде картриджа, в которых происходит пробоподготовка, что кардинально снижает вероятность контаминации и заражения туберкулезом обслуживающего персонала, а также расходы на проведение анализа

Полученный опыт использования биочип-диагностики в практике лечения туберкулеза показывает высокую эффективность метода, крайнюю актуальность и необходимость его распространения в медицинских учреждениях. Быстрому и качественному его внедрению будет способствовать пропаганда его показателей среди подразделений и учреждений Минздравсоцразвития, анализ и обобщение положительного опыта его использования в действующих центрах, стимулирование его внедрения и освоения в региональных противотуберкулёзных учреждениях.

Приложение 1.

Временные затраты сотрудников на каждую операцию при определении лекарственной чувствительности МБТ к изониазиду и рифампицину с использованием тест-системы «ТБ-БИОЧИП» и к фторхинолонам с использованием тест-системы «ТБ-БИОЧИП-2».

№ операции	Наименование операции	Требуемое время на один образец ³
1	Регистрация полученного респираторного материала, маркировка пробирок	3 мин.
Обработка образцов		
2	Добавление раствора «Деконт» в пробирку, содержащую респираторный образец в соотношении 1:1	1 мин.
3	Разжижение и деконтаминация образцов в шейкере	30 мин. ²
4	Подготовка к центрифугированию (добавление промывочного буфера ПБ-1 в пробирки с образцом, уравнивание центрифужных пробирок, установка пробирок в центрифугу)	15 мин. ²
5	Центрифугирование пробирок при 3000 об./мин.	30 мин. ²
6	Перенесение полученного осадка в пробирки типа Эппендорф и их маркировка	1 мин.
7	Внесение в пробирки промывочного буфера ПБ-1	20 с.
8	Перемешивание на вортексе	20 с.
9	Установка пробирок в центрифугу	20 с.
10	Центрифугирование пробирок при 10000 об./мин.	10 мин. ²
11	Обработка осадка: внесение в пробирки с осадком промывочного буфера ПБ-2	20 с.
12	Перемешивание на вортексе	20 с.
13	Установка пробирок в центрифугу	20 с.
14	Центрифугирование пробирок при 10000 об./мин.	10 мин. ²
15	Повторение п.п. 13 и 14	11 мин. ²
Выделение ДНК		
16	Внесение в пробирку лизирующего буфера (ЛБ)	20 с.
17	Перемешивание на вортексе	20 с.
18	Прогревание образцов в термостате при 95°С	30 мин. ²
19	Охлаждение пробирок	5-10 мин. ²
20	Установка пробирок в центрифугу	30 с.
21	Центрифугирование при 11000 об./мин.	10 мин. ²
Проведение первой стадии ПЦР		
22	Приготовление реакционной ПЦР-смеси	10 мин. ²
23	Внесение надосадочной жидкости (матрицы ДНК) в каждую пробирку с реакционной ПЦР-смесью и их маркировка	15 с.
24	Установка пробирок в амплификатор, выбор программы	10 мин. ²
25	Амплификация по программе «MDR-1»	1 час 27 мин. ²
Оценка результатов ПЦР посредством горизонтального электрофореза в агарозном геле, окрашенном бромидом этидия		
26	Приготовление геля: взвешивание агарозы, ее расплавление и внесение этидиум бромида	40 мин. ²

27	Смешивание полученных ампликонов с буфером для электрофореза и внесение смеси в лунки геля	2 мин.
28	Проведение электрофореза образцов	20 мин. ²
29	Регистрация результатов проведения 1-й стадии ПЦР	5 мин. ²
Проведение второй стадии ПЦР		
30	Приготовление реакционной ПЦР-смеси	10 мин. ²
31	Внесение ампликонов ДНК, полученных после первой стадии ПЦР в каждую пробирку и их маркировка	15 с.
32	Установка пробирок в амплификатор, выбор программы	5 мин. ²
33	Амплификация по программе «MDR-2»	1 час 21 мин. ²
Оценка результатов ПЦР посредством горизонтального электрофореза в агарозном геле, окрашенном бромидом этидия		
34	Приготовление геля: взвешивание агарозы, ее расплавление и внесение этидиум бромида	40 мин. ²
335	Смешивание полученных ампликонов с буфером для электрофореза и внесение смеси в лунки геля	2 мин.
36	Проведение электрофореза образцов	20 мин. ²
37	Регистрация результатов проведения 2-й стадии ПЦР	5 мин. ²
Проведение гибридизации		
38	Приготовление пробирок для гибридизации, чипов и гибридизационного буфера (ГБ)	5 мин. ²
39	Внесение ГБ в каждую пробирку	1 мин.
40	Внесение 10 мкл ампликонов, полученных после 2-й стадии ПЦР в пробирки с гибридизационным буфером	1 мин.
41	Внесение гибридизационной смеси в камеры маркированных чипов	5 мин.
42	Инкубация чипов в термостате при 37°C	14-16 часов ²
Обработка чипов		
43	Промывание чипов в дистиллированной воде и их высушивание при комнатной температуре	2 мин.
44	Анализ чипов с использованием компьютерной программы ImageWare с шаблонами для «ГБ-БИОЧИП» или «ГБ-БИОЧИП-2» в чип-детекторе	5 мин.
45	Регистрация результатов в лабораторном журнале и заполнение бланка ответа	3 мин.

¹ Приготовление всех рабочих растворов осуществляется предварительно согласно рекомендации фирмы-производителя.

² Операция проводится для всех образцов одновременно. Указано время, затрачиваемое на данную операцию для всех анализируемых образцов.

³ По опыту сотрудников лаборатории МНПЦ БТ.

Исходя из вышеизложенного расчёта, возможно одновременно проводить обработку образцов, амплификацию и гибридизацию 18-20 образцов диагностического материала как минимум двумя сотрудниками лаборатории (врач-лаборант и лаборант). Однако при проведении большого числа анализов, с целью предотвращения контаминации материала, для проведения исследования может понадобиться большее число сотрудников.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инструкция по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулеза и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду методом гибридизации с флуоресцентным изображением на биологическом микрочипе (ТБ-БИОЧИП®)», Федеральная служба надзора в сфере здравоохранения и социального развития.// Москва. - 2004. - 35с.
2. Методические указания 3.5.5.1034-01 «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I-IV групп патогенности при работе методом ПЦР».
3. Методические указания 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами III-IV групп патогенности».
4. Методические указания 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патологическими биологическими агентами III-IV групп патогенности».
5. Мишин В.Ю. Оптимизация лечения впервые выявленных больных туберкулёзом легких на основе принципов доказательной медицины// Химиотерапия туберкулёза в современных эпидемиологических условиях. М., 2008. – С. 53-68.
6. Мороз А.М., Барский В.Е. Биочипы для решения задач диагностики туберкулёза//Здоров'я України, 2007.- № 10.- С. 62.
7. Мороз А.М., Носова Е.Ю., Галкина К.Ю., Краснова М.А. и др. Определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биочипов// Мет.рек. – М: МНПЦБТ. – 2008.
8. Носова Е.Ю., Галкина К.Ю., Антонова О.В., Гармаш Ю.Ю., Скотникова О.И., Мороз А.М. Молекулярно-биологический микрочип ТБ-БИОЧИП2 для определения чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью к фторхинолонам у больных с впервые выявленным и хроническим течением туберкулеза//ВЕСТНИК РАМН №3, 2008г. с.16-19.
9. Определение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью биочипов. Методические рекомендации. М., 2008.- 26 с.
10. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 45 от 07.02.2000 г. «О системе повышения качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
11. Приказ Министерства здравоохранения РФ № 109 от 23.03.2003 г. «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации».

12. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
13. Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., Roudinskii N., Donnikov M., S. Pan'kov, O. Markova, Kuz'min A Chernousova., L., Skotnikova O., Moroz A., Zasedatelev A. Mirzabekov A. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*// Clin Microbiol Infect. 2005 Jul;11(7) p.531-9.
14. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action // Current Option in Microbiology 1999; 2; 504-508.
15. Saint-Joanis B., Souchon H., Wilming M., Johnsson K., Alzari P.M., Cole S.T. Use of side-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis* // Biochem. J. 1999; 338; P. 753-760.
16. Ramaswamy S., Musser J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update.// Tubercle Lung Dis. - 1998. - v.79. - p.3-29.
17. Wengenack N.L., Uhl J.R., St. Amand A.L., et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG (S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid // J. Infect. Dis 1997; 176; P. 722-727.
18. Wilson T., de Lisle G.W., Marcinkeviciene J.A., Blanchard J.S., Collins D.M. Antisense RNA to *aphC*, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that *AphC* *Mycobacterium bovis* has virulence properties // Microbiology 1998; 144; P. 2687-2695.
19. Zhao B.Y., Pine R., Domagala J., Drlica K. Fluoroquinolone action against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: effects of a C-8 methoxyl group on survival in liquid media and in human macrophages // Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43; P. 661-666.