

17. National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, World Health Organization. Global Initiative for Asthma. Bethesda: NIH/NHLBI, 1998: Publication number 96-3659B.
18. Palmqvist M., Persson G., Lazer L. et al. Inhaled dry-powder formoterol and salmeterol in asthmatic patients: onset of action, duration of effect and potency // Eur. Respir. J.— 1997.— Vol.10.— P.2484—2489.
19. Pauwels R.P., Lofdahl C-G., Postma D.S. et al. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma // Now. Engl. J. Med.— 1997.— Vol.337.— P.1405—1411.
20. Ringdal N., Derom E., Pauwels R. Onset and duration of action of single doses of formoterol inhaled via Turbuhaler in mild to moderate asthma // Eur. Respir. J.— 1995.— Vol.8.— Suppl.19.— P.68S.
21. Rott Z., Bocskai C., Poczi M. et al. On the relative therapeutic index between formoterol turbuhaler and salbutamol pressurized metered dose inhaler in asthmatic patients // Ibid.— 1998.— ERS-98.
22. Steffensen I., Faurschou P., Riska H. et al. Inhaled formoterol dry powder in the treatment of patients with reversible obstructive airway disease. A 3-month, placebo-controlled comparison of the efficacy and safety of formoterol and salbutamol, followed by a 12-month trial with formoterol // Allergy.— 1995.— Vol.50.— P.657—663.
23. van der Molen T., Turner M.O., Postma D.S. et al. For the Canadian and the Dutch D2522 Investigators. An international multi-centre randomized controlled trial of formoterol in asthmatics requiring inhaled corticosteroid // Eur. Respir. J.— 1995.— Vol.8.— Suppl.19.— P.2S.
24. Vilsoik J., Ankerst J., Palmqvist M. et al. Duration of protection of formoterol against exercise-induced bronchoconstriction during regular treatment with formoterol turbuhaler b.i.d. in adult asthmatics // Ibid.— 1999.— ERS-99.

Поступила 09.11.99.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1998

УДК 616.24-002.5-074/078

В.И.Гольшевская, Л.Н.Черноусова, Е.Ф.Шашкина, О.О.Коваленко,
Е.Е.Ларионова

СОВРЕМЕННАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

ЦНИИТ РАМН, Москва

По данным ВОЗ, с середины 1980-х годов во всем мире нарастает эпидемия туберкулеза. Основным эпидемиологическим показателем, характеризующим случай активного туберкулеза, является наличие у больного бактериовыделения. Однако микробиологическая диагностика туберкулеза имеет относительно низкую чувствительность и сопряжена с рядом трудностей: процесс деления *M.tuberculosis* более длителен (составляет 24 часа и более) по сравнению с другими гноеродными бактериями (максимум от 15 минут до 3 часов). В связи с этим верификацию диагноза при туберкулезе провести значительно труднее, чем при любой другой бактериальной инфекции. До настоящего времени "Gold"-методом, по данным зарубежных и отечественных исследований, продолжает оставаться бактериоскопическая и культуральная диагностика туберкулеза. Специфические микробиологические методы для идентификации *M.tuberculosis* широко используются с тех пор, как в 1882 году Кох объявил Берлинскому Физиологическому Обществу, что он наблюдал при бактериоскопии возбудитель туберкулеза [48]. Исследование мазков мокроты на кислотоустойчивые бактерии — наиболее быстрый способ получить доказательство туберкулезной инфекции. Однако не у всех инфицированных можно обнаружить микобактерии туберкулеза в мазке, кроме того, по мазку нельзя отличить *M.tuberculosis* от условно-патогенных кислотоустойчивых микобактерий. Посевы на селективные питательные среды более чувствительны, но требуют длительного времени из-за низкой

скорости роста микобактерий. В связи с этим в последнее время получили развитие высокочувствительные методы микобактериальной диагностики туберкулеза: биохимические, радиометрические и другие. Однако использование традиционных методов не позволяет во всех случаях активного туберкулезного воспаления выявить микобактерии туберкулеза из диагностического материала. В настоящее время значительные достижения получены в результате молекулярно-генетических исследований. В диагностике туберкулеза разработана и внедрена амплификационная тест-система. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — быстрый и действенный метод для получения *in vitro* миллионов копий специфического фрагмента ДНК. Эта методика, разработанная в 1985 г. Saiki et al., позволила проводить идентификацию ДНК, прямое клонирование и секвенирование как ДНК, так и РНК [35]. Так как этот метод позволяет быстро обнаруживать и определять количественно несколько копий ДНК, его можно считать наиболее важным достижением последних лет для идентификации инфекций. ПЦР дает экспоненциальное увеличение ДНК мишени и с эффективностью реакции 100% 20 ПЦР-циклов приводят к увеличению исходной ДНК в 1 миллион раз. Продукт ПЦР единичной молекулы ДНК, т.е. ДНК единичной *M.tuberculosis*, можно обнаружить фотографическим, радиометрическим или колориметрическим методами.

Как показала практика, обычное использование ПЦР в клинических лабораториях нуждается в повы-

шении и чувствительности, и специфичности. Чувствительность ПЦР может быть повышена через увеличение числа циклов. Кроме того, чувствительность и специфичность можно повысить добавлением второй ПЦР, то есть проведением так называемой "nested" ПЦР, когда используются праймеры, внутренние к первым праймерам, то есть амплификации подвергаются продукты первой ПЦР. Эта методика использовалась, чтобы амплифицировать малое число копий ДНК, ДНК из старых образцов. Так, в 1994 году *W.L.Salo et al.* обнаружили ДНК *M.tuberculosis* в ткани легкого 1000-летней мумии, используя "nested" ПЦР с праймерами инсерционной последовательности IS6110 [37]. Необходимо отметить, что самые простые методы детекции — электрофорез и фотографирование в ультрафиолетовых лучах, сравнительно малочувствительны. Разработан более чувствительный и специфичный метод детекции — гибридизация продуктов ПЦР с радиоактивными зондами, но он не всегда подходит для клинических лабораторий. В 1989 г. *R.K.Saiki et al.* предложили модификацию этой методики с использованием неизотопной метки с биотиновыми зондами [36].

Дальнейшие усилия были направлены на объединение амплификации ДНК с неизотопной детекцией и автоматизацией учета результатов. В 1990 г. *J.Wahlberg et al.* опубликовали метод с использованием модифицированных праймеров, с помощью которых адсорбируются продукты ПЦР на 96-луночные планшеты с последующей визуализацией иммуоферментным методом [46].

В 1991 г. *G.Mantero et al.* описали метод обнаружения продуктов ПЦР по гибридизации с олигонуклеотидными зондами, внутренними к амплифицированной ПЦР последовательности [27]. Такой метод ДНК-иммуоферментного анализа с автоматизированным учетом разработан для коммерческого использования (*Serin Biomedica*).

Чрезвычайно высокая чувствительность ПЦР в то же время представляет собой опасность для специфичности реакции. Контаминация экзогенной ДНК может исходить из клинических образцов, из бактериальных культур, используемых как положительный контроль. Чаще всего проблема является результатом накопления в лаборатории ампликонов ПЦР. Малое количество (10^{-6} мкл) продуктов ПЦР может содержать до 10^5 потенциально контаминирующих ампликонов, которые работают как ПЦР-субстраты. Для исключения ложноположительных результатов необходимо принять ряд определенных предосторожностей: изоляцию пред- и постамплификационного процесса, использование одноразовых материалов (перчатки, стерильные аэрозользащищенные наконечники), предварительное разаликвочивание реагентов, использование отдельных комплектов пипеток. В 1990—1991 гг. были описаны два метода стерилизации ампликонов — ферментативный и фотохимический [26,10].

Чувствительность и специфичность ПЦР обуславливаются и правильным подбором праймеров. Из литературы известно, что в качестве мишеней использовалась последовательность ДНК гена, кодирующего

белок 38 kDa (антиген b), комплексно-специфического гена *M.tuberculosis*, который присутствует в единственной копии в микобактериальной хромосоме [38]. Затем инсерционная последовательность S6110, последовательность, повторяющаяся 10—16 раз в хромосоме [43], ген белка теплового шока 65kDa (HSP), высоко стабильный ген с генспецифичной и видоспецифичной последовательностями [17], а также рибосомальная РНК [9].

Как показали *Y.Miyazaki et al.* в 1989 г., ПЦР с использованием праймеров, комплементарных к последовательности гена, кодирующего 38 kDa, при проведении одного цикла амплификации из 35 циклов имела предел обнаружения 100 КОЕ/мл. Когда продукты первой ПЦР были еще раз амплифицированы (35 циклов) во второй "nested" ПЦР, предел обнаружения был в 1000 раз меньше (0,1 КОЕ/мл), чувствительность составила 97% [30].

Использование в качестве мишеней инсерционных последовательностей IS6110 и IS986, повысило чувствительность ПЦР, так как число мишеней на одну микобактерию больше. *K.D.Eisenach et al.*, *A.H.J. Kolk et al.* и другие получили чувствительность в пределах от 74 до 91%, при этом специфичность была от 72 до 100%, в зависимости от способа выделения ДНК, проведения амплификации и способа детекции [14,16,23].

Код гена для высококонсервативного 65 kDa белка (HSP65), относящегося к семейству протеинов теплового шока, содежит как высококонсервативные области, так и переменные области, последовательности ДНК в которых видоспецифичны. Представители рода микобактерий содержат идентичные последовательности ДНК в консервативных зонах. Используя праймеры, комплементарные стабильным областям гена, можно выявлять ДНК всех микобактерий, а дальнейшая амплификация продукта ПЦР с зондами, комплементарными к видоспецифичным последовательностям, позволяет отличить *M.tuberculosis* от микобактерий другого вида [17,32,33].

Методы РНК-амплификации были впервые применены в ПЦР для амплификации 16S рибосомальной РНК *M.tuberculosis*. Амплификация 16S гРНК как мишени для ПЦР имеет некоторые преимущества. Во-первых, 16S гРНК в избытке находится в микобактериальных рибосомах в большом числе копий (от 10^3 до 10^4 на клетку), что значительно облегчает детекцию. *B.Boddinghaus et al.* в 1992 г. показали, что при обратной транскрипции гРНК получается комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота (таким образом получается от 10^3 до 10^4 копий ДНК на клетку) для дальнейшей амплификации в 0,1 fg микобактериальной ДНК, то есть меньше, чем десятая часть микроорганизма (2×10^9 daltons), может быть легко обнаружена гибридизацией продукта ПЦР с ДНК-зондом [9]. Во-вторых, как и с HSP65 геном, присутствие высококонсервативной последовательности в гене 16S гРНК делает возможным ДНК амплификацию для "общей" диагностики микобактериальных инфекций. После амплификации с "общими" праймерами гибри-

дизация продуктов ПЦР с видоспецифичными 16S рРНК ДНК-зондами или проведение последовательной ПЦР позволяет "специфически" идентифицировать возбудитель микобактериальной инфекции [49]. Подобный метод использован в коммерческом наборе *Gen-Probe*.

Необходимо отметить, что одним из условий получения стабильных результатов ПЦР является и подбор оптимального способа выделения ДНК. В отличие от микобактерий из культур, для которых разработаны стандартные процедуры с использованием протеиназы К и лизоцима для разрушения бактериальной стенки и выделения ДНК, выделение ДНК из мокроты, крови или других образцов имеет ряд технических проблем и требует многих усилий, чтобы обеспечить чувствительность и специфичность.

Микобактерии и содержащий микобактерии клеточный материал необходимо отделить от слизи, разрушить бактериальные клетки и сделать ДНК доступной для полимеразы в амплификации. Выбранный метод должен также перед амплификацией устранить известные эндогенные или экзогенные ингибиторы ДНК-полимераз, такие как гемоглобин, антикоагулянты и детергенты. Были предложены некоторые методики быстрого лизирования клетки и выделения ДНК. Образцы мокроты наиболее часто обрабатываются с использованием N-ацетил-L-цистеина, дитиотреитола или других восстановителей.

В мокроте и других образцах могут находиться эндогенные ингибиторы. Для того, чтобы их устранить, для выделения и очистки ДНК используют фенол-хлороформную экстракцию и осаждение этиловым спиртом, выделение гуанидином и осаждение силикогелем [8,39].

Какова же роль молекулярной диагностики в клинической практике? Некоторые считают, что прогнозирующие возможности ее ненамного превосходят люминесцентную микроскопию и посева. Однако необходимо помнить, что повышается количество больных с ослабленным иммунитетом, с абациллярным туберкулезом. В этом контексте оценка эффективности ПЦР для диагностики туберкулеза должна включать клинические проявления, рентген, микроскопию мазка, посев и ответ на специфическое лечение (например, изониазид, рифампицин и пипразинамид).

Нами было оценена и изучена возможность использования ПЦР-набора "ПОЛИТУБ" фирмы "ЛИТЕХ" для диагностики туберкулеза. Было исследовано 38 проб мокроты от 34 больных с верифицированным диагнозом "туберкулез" и 11 — от больных с неспецифическими заболеваниями легких. Все образцы были исследованы традиционными микробиологическими методами (бактериоскопия и посев) и методом ПЦР. Результаты ПЦР, проведенной с использованием набора "ПОЛИТУБ", совпадали в 100% случаев с положительными результатами микроскопии и/или посева и выявляли ДНК микобактерий в 65% случаев у больных туберкулезом с отрицательным результатом микроскопии и посева (абациллярных больных), в группе больных неспецифическими заболеваниями лег-

ких результаты микроскопии, посева и ПЦР были отрицательными во всех случаях (10), кроме одного, у которого ПЦР была положительная. Проведенные исследования подтвердили высокую чувствительность и полезность применения метода ПЦР в клинической практике [4].

Одна захватывающая область исследования, которая открывается с возможностью ПЦР-диагностики — латентная инфекция *M.tuberculosis*. По современной концепции туберкулезной инфекции из 100 человек, контактирующих с *M.tuberculosis*, 90 могут быть инфицированы; но только у 10 развивается активная болезнь. У остальных 90% инфекция будет оставаться латентной длительное время из-за противотуберкулезного иммунитета. Не установлено, могут ли лица с латентной инфекцией *M.tuberculosis*, выявляемые при помощи кожной туберкулиновой пробы, выделять бактерии и могут ли они быть выявлены при помощи высокочувствительных молекулярных тестов. Однако в очень интересном исследовании с использованием IS6110 ПЦР *D.A.Walker et al.* показали, что 55% лиц, подвергавшихся бытовым контактам с *M.tuberculosis*, и 80% лиц, у которых был туберкулез без рентгенографических проявлений активного туберкулеза, имели положительные результаты ПЦР с отрицательными посевами мокроты и БАЛ. Таким образом, можно предполагать, что проведение ПЦР-исследований для групп населения с риском туберкулеза может идентифицировать пациентов с отрицательными результатами микроскопии и посевов с субклинической инфекцией *M.tuberculosis* [47].

Другая область исследования — роль микобактерий в хронических гранулематозных заболеваниях, таких как саркоидоз, хроническая гранулематозная болезнь, характеризующаяся образованием неказеозной туберкулоидной гранулемы, и отрицательная реакция кожи к PPD. Другой объект для изучения — болезнь Крона, хроническая гранулема кишечника, первичный цирроз печени, хроническая гранулема печени. *J.McFadden et al.* и *I.C.Mitchell et al.* в 1992 г. показали, что 44—50% лиц с легочным саркоидозом имели ДНК или РНК микобактерий в тканях легкого [15,29,34]. Нами показано, что при обследовании 314 больных саркоидозом измененные МБТ бактериоскопическим методом выявляются у 70%, у 14% высеваны культуры микобактерий, 77% которых были ПЦР-положительными с INS праймерами фирмы Ниармедик [6].

Изучение биологических свойств высеванных микобактерий показало высокую степень изменчивости, которая состояла в изменении тинкториальных свойств, переход в кокковидные формы, обеднение антигенной структуры, показанное *Western blott* с моноклональными антителами [3].

Необходимо остановиться на такой важной проблеме, как антибиотикорезистентность микобактерий. Микобактерия туберкулеза, естественно, резистентна к антибиотикам, особенно относящимся к β-лактамам, макролидам и тетрациклинам. Это объясняется особенностями липидного состава ее клеточной стенки, выступающей как эффективный барьер. Лекарства,

действующие на микобактерии туберкулеза, делятся на две группы: 1-й и 2-й линии. К основным относятся изониазид, рифампицин, пиперазид, этамбутол и стрептомицин. Лекарства второй группы, такие как фторхинолоны, менее эффективны и используются в случаях резистентности к основным препаратам. Рост заболеваемости туберкулезом связан в том числе и тем, что растет число микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью, особенно к изониазиду и рифампицину одновременно. Поэтому очень важно как можно раньше выявлять MDR-штаммы. Помимо традиционных способов выявления лекарственной устойчивости микобактерий методом культивирования на плотных питательных средах, а также на "ВАСТЕС" в жидких средах, в последнее время разрабатываются новые диагностические методы, позволяющие оценивать лекарственную устойчивость на уровне генотипа [45]. Работа по изучению молекулярных механизмов резистентности показала наличие генов-мишеней для различных препаратов. Мишенью для изониазида являются *kat G* и *inh A* гены, для рифампицина *groB*, для стрептомицина *S12* и *16S*, для этамбутола *emb1*, для фторхинолонов *gyrA* [11].

Доступность данных по молекулярной основе лекарственной устойчивости к противотуберкулезным средствам дает возможность разработки новых диагностических методов. Один из них ПЦР-SSCP (*single-strand conformation polymorphism*, полиморфизм однонитевых фрагментов ДНК) — тест, объединяющий стадию амплификации (ПЦР) и простое разделение при нагревании двух цепочек ДНК, которые затем складываются внутримолекулярно и принимают характеристики одноцепочечной конформации. Наличие единичной мутации дает измененную конформацию и приводит к различной электрофоретической подвижности разделенных сложенных цепочек или к конформационному полиморфизму отдельных цепочек [31].

ПЦР-SSCP был очень полезен в скрининге устойчивости к рифампицину, т.к. устойчивость к этому средству представляет суррогатный маркер для MDR-TB [11,41,42].

ПЦР-SSCP также можно использовать для скрининга генных мутаций, ответственных за устойчивость к другим лекарствам: изониазиду, стрептомицину и фторхинолонам [18,19,40].

Кроме того, для видовой идентификации и определения лекарственной устойчивости микобактерий в 1994 г. *V.Kapur et al.* успешно использовали автоматическое секвенирование [21,22].

Нами совместно с нью-йоркским институтом Национального Здоровья были проанализированы 44 пробы ДНК микобактерий, выделенных от 32 пациентов. Из них 15 культур микобактерий были чувствительны к основным противотуберкулезным препаратам, 16 были резистентны к одному или двум, но не к изониазиду и рифампицину одновременно, а 13 имели множественную лекарственную устойчивость. ДНК была охарактеризована по полиморфизму последовательности в генах *katG* и *gyrA*. Были обнаружены мутации в *katG* гене среди изониазидрезистентных штаммов,

причем для 17 образцов ДНК была показана 100% корреляция между мутациями *katG* и наличием резистентности к изониазиду. Изониазидчувствительные изоляты не имели мутаций в *katG* [25]. Хотел бы подчеркнуть, что микробиологическое определение лекарственной устойчивости было проведено ускоренным методом, позволяющим уже на пятый день получать результаты. Метод был разработан и используется в отделе микробиологии ЦНИИТ РАМН.

Точечные мутации в гене *groB*, ответственные за резистентность *M.tuberculosis* к рифампицину, открытые *A.Telenti et al.* [41], в России были изучены методом секвенирования ПЦР-фрагментов [2,5], что позволит, возможно, создавать тест-системы для выявления лекарственной устойчивости микобактерий прямо в диагностическом материале.

При нарастании эпидемии туберкулеза и, особенно, распространении MDR-штаммов особое значение придается молекулярной эпидемиологии, основанной на изучении генетического фингерпринта микобактерий из разных географических зон [12]. В России подобные работы были начаты в 1993 году совместно НИИЭиМ им.Н.Ф.Гамалеи и ЦНИИТ РАМН. Методом ПЦР-генотипирования было показано генетическое разнообразие клинических изолятов микобактерий, выделенных из разных географических зон России и стран СНГ [7]. Для определения источника инфекции и путей ее распространения как в Америке, так и в Европе создан банк генотипических вариантов ДНК клинических изолятов микобактерий туберкулеза, выделенных в различных странах мира. Была обнаружена высокая степень генетического полиморфизма штаммов *Mycobacterium tuberculosis* [20]. Недавно было сфокусировано внимание на инсерционной последовательности IS6110, которая, с одной стороны, является стабильным, характерным только для микобактерий туберкулезного комплекса элементом [28], а с другой — одним из мобильных генетических элементов, который присутствует в хромосоме в различном числе копий и в различной локализации [43,13]. В настоящее время обнаружено несколько вариантов полиморфизма по длине рестрикционного фрагмента IS6110. Было показано, что число копий и размер рестрикционных фрагментов, содержащих эти элементы, значительно отличаются [44]. С помощью молекулярного фингерпринта ДНК микобактерий на основе PvuII-IS6110 рестрикционных фрагментов был описан характерный для микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью профиль гибридизации [24]. Подобные работы начаты и в России. *А.Г.Хоменко* с соавт. совместно с нью-йоркским институтом Национального Здоровья было показано большое генетическое разнообразие клинических изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от пациентов, находящихся на лечении в ЦНИИТ РАМН. Фингерпринт, основанный на IS6110 выявил несколько штаммов, относящихся к ранее охарактеризованному семейству Пекинских W штаммов, идентифицированных в Китае и Нью-Йорке [25]. *М.А.Владимирским* и др. методом амплипринтинга было показано сходство ДНК-отпечатков культур *M.bovis*

из одного хозяйства, а также *M. tuberculosis*, от 5 из 8 детей Дмитровского района Московской области [1].

Таким образом, мелекулярно-генетические методы используются для повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулеза, обнаружения латентной инфекции, выявления этиологического фактора при патологических процессах, сопровождающихся развитием гранулем, а также для эпидемиологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирский М.А., Андросова М.В., Шипина Л.К. Применение ПЦР для геномной дактилоскопии микобактериальных штаммов // Всероссийская конф. "Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний", 2-я: Материалы — М., 1998.— С.106.
2. Генерозов Э.В., Альтшулер М.Л., Денисова Т.С., Владимирский М.А., Андросова М.Н., Черноусова Л.Н., Шапкина Е.Ф., Адамович Н.В., Говорун В.М. Выявление мутаций в гене *rpoB*, обуславливающих резистентность *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину // Там же. С.94—95.
3. Гольшевская В.И., Корнеев А.А., Черноусова Л.Н., Сафонова С.Г., Пузанов В.А., Гришина Т.Д. Микробиологическая диагностика туберкулеза // Вестн. Рос. АМН.— 1995.— № 7.— С.16—17.
4. Гольшевская В.И., Черноусова Л.Н., Шапкина Е.Ф., Ларионова Е.Е., Коваленко О.О., Денисова Т.С., Говорун В.М., Бочкарев Е.Г. Применение ПЦР для диагностики туберкулеза легких // Всероссийская конф. "Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний", 2-я, Материалы.— М., 1998.— С.93—94.
5. Панферцев Е.А., Митрофанова Г.Н., Степаншина В.Н., Шемякин И.Г. Использование ПЦР-секвенирования для экспресс-идентификации рифампицин-резистентности клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Там же.— С.107—108.
6. Хоменко А.Г., Гольшевская В.И., Шагинян И.А., Сафонова С.Г., Нестеренко Л.Н., Гришина Т.Д., Гинцбург А.Л., Прозоровский С.В. Является ли саркоидоз хронической персистирующей инфекцией // Журн. микробиол.— 1994.— Приложение.— С.64—68.
7. Шагинян И.А. Геномный полиморфизм в эпидемиологическом анализе бактериальных инфекций: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1995.— 48 с.
8. Amicosante M., Richeldi L., Trenti G., Paone G., Campa M., Bisetti A., Saltini C. Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin // J. Clin. Microbiol.— 1995.— Vol.33.— P.629—630.
9. Boddingtonhaus B., Rogall T., Flohr T., Blocker H., Bottger E. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA // Ibid.— 1990.— Vol.28.— P.1751—1759.
10. Cimino G.D., Metchette K.C., Tessman J.W., Hearst J.E., Isaacs S.T. Post-PCR sterilization: a method to control carry-over contamination for the polymerase chain reaction // Nucl. Acids Res.— 1991.— Vol.19.— P.99—107.
11. Cole S.T., Telenti A. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Eur. Respir. J.— 1995.— Vol.8, Suppl.20.— P.701s—713s.
12. Crawford J.T. Applications of molecular methods to epidemiology of tuberculosis // Res. Microbiol.— 1993.— Vol.144.— P.111—116.
13. Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis* // J. Clin. Microbiol.— 1988.— Vol.26.— P.2240—2245.
14. Eisenach K.D., Siford M.D., Cave M.D., Bates J.H., Crawford J.T. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction // Am. Rev. Respir. Dis.— 1991.— Vol.144.— P.1160—1163.
15. Fidler H.M., Rook G.A., Johnson N.M., McFadden J. *Mycobacterium tuberculosis* DNA in tissue affected by sarcoidosis // Br. Med. J.— 1993.— Vol.306.— P.546—549.
16. Forbes B.A., Hicks K.E.S. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction // J. Clin. Microbiol.— 1993.— Vol.31.— P.1688—1694.
17. Hance A.J., Gradchamps B., Levy-Frebault V. et al. Detection and identification specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction // J. Clin. Microbiol.— 1993.— Vol.31.— P.1688—1694.
18. Heym B., Honore N., Truffot-Penot C. et al. The implications of multidrug resistance for the future of short course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study // Lancet.— 1994.— Vol.344.— P.293—298.
19. Honore N., Cole S.T. Streptomycin and mycobacteria // Antimicrob. Agents Chemother.— 1994.— Vol.38.— P.238—242.
20. Hopewell P.C., Small P.M. Applications of molecular methods to epidemiology to the prevention, control and study of tuberculosis. Eds W.H.Rom, S.M.Garay // Tuberculosis.— Boston: Little, Brown, 1996.— P.113—127.
21. Kapur V., Hamrick M.R., Li L.-L. et al. Application of automated DNA sequencing strategies to problems of *Mycobacterium tuberculosis* speciation by characterization of polymorphisms in the gene (*hsp65*) encoding a 65 kilodalton heat shock protein, and a rapid and unambiguous identification of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Arch. Pathol. Lab. Med.— 1995.— Vol.119.— P.131—138.
22. Kapur V., Li L.-L., Iordanescu S. et al. Characterization by automated sequencing of mutations in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase B-subunit in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas // J. Clin. Microbiol.— 1994.— Vol.32.— P.1095—1098.
23. Kolk A.H.J., Schuitema A.R., Kuijper S. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system // Ibid.— 1992.— Vol.30.— P.2567—2575.
24. Kreiswirth B.N., Moss A. Genotyping multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in New York City // Tuberculosis / Eds W.N.Rom, S.M.Garay.— Boston: Little, Brown, 1996.— P.199—209.
25. Kurepina N., Ramaswamy S., Khomenko A.G., Golyshvskaya V.I., Chernosova L.N., Musser J.M., Kreiswirth B.N. Genetic characterization of *M. tuberculosis* cultures from Moscow, Russia. Public Health Research Institut, New York, NY; Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia; Baylor College of Medicine, Hoston, TX. // Symposium "Molecular and Cellular Biology".— Keystoun, 1998.— P.
26. Longo M.C., Berninger M.S., Hartley J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination on polymerase chain reactions // Gene.— 1990.— Vol.93.— P.125—128.
27. Mantero G., Zonaro A., Albertini A., Bertolo P., Primi D. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction // Clin. Chem.— 1991.— Vol.37.— P.422—429.
28. Mazurek G.H., Cave M.D., Eisenach K.D. et al. Chromosomal DNA fingerprint patterns with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis // J. Clin. Microbiol.— 1991.— Vol.29.— P.2030—2033.
29. Mitchell I.C., Turk J.L., Mitchell D.N. Detection of mycobacterial rRNA in sarcoidosis with liquid-phase hybridisation // Lancet.— 1992.— Vol.339.— P.1015—1017.
30. Miyazaki Y., Koga H., Kohno S., Kaku M. Nested polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples // J. Clin. Microbiol.— 1993.— Vol.31.— P.2228—2232.
31. Orita M., Iwagana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1989.— Vol.86.— P.2766—2770.
32. Pao C.C., Yen T.S.B., You J.B., Maa J.S., Fiss E.H., Chang C.H. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification // J. Clin. Microbiol.— 1990.— Vol.28.— P.1877—1880.
33. Pierre C., Lecossier D., Bousougant Y. et al. Use of a reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA // Ibid.— 1991.— Vol.29.— P.712—717.

34. *Saboar S.A., Johnson N.M., McFadden J.* Detection of mycobacterial DNA in sarcoidosis and tuberculosis with polymerase chain reaction // *Lancet*.— 1992.— Vol.339.— P.1012—1015.
35. *Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al.* Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia // *Science*.— 1985.— Vol.230.— P.1350—1354.
36. *Saiki R.K., Walsh P.S., Levenson C.H., Erlich H.A.* Genetic analysis of amplified DNA with sequence-specific oligonucleotide probes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 1989.— Vol.86.— P.6230—6234.
37. *Salo W.L., Aufderheide A.C., Buikstra J., Holcomb T.A.* Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy // *Ibid.*— 1994.— Vol.91.— P.2091—2094.
38. *Sjobering U., Mecklenburg M., Bengard Andersen A., Miorner H.* Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.*— 1990.— Vol.28.— P.2200—2204.
39. *Sritharan V., Barker R.H.Jr.* A simple method for diagnosing M. tuberculosis infection in clinical samples using PCR // *Mol. Cell. Probes*.— 1991.— Vol.5.— P.385—395.
40. *Takiff H.E., Salazar L., Guerrero C. et al.* Cloning and nucleotide sequence of the Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes, and characterization of the Mycobacterium tuberculosis gyrA and gyrB genes, and characterization of guinolone resistance mutations // *Antimicrob. Agent. Chemother.*— 1994.— Vol.38.— P.773—780.
41. *Telenti A., Imboden P., Marchesi F. et al.* Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis // *Lancet*.— 1993.— Vol.341.— P.647—650.
42. *Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Schmidheini T., Bodmer T.* Direkt, automated detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis // *Antimicrob. Agent. Chemother.*— 1993.— Vol.37.— P.2054—2058.
43. *Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D. et al.* IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex // *Nucl. Acids Res.*— 1990.— Vol.18.— P.188.
44. *Van Emden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T. et al.* Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // *J. Clin. Microbiol.*— 1993.— Vol.31.— P.406—409.
45. *Vareldzis B.P., Grosset J., de Kantor I. et al.* Drugresistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization Recommendations // *Tuberc. Lung Dis.*— 1994.— Vol.75.— P.1—7.
46. *Wahlberg J., Lundeberg J., Hultman T., Uhlen M.* General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of the positive samples // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 1990.— Vol.87.— P.6569—6573.
47. *Walker D.A., Taylor I.K., Mitchell D.M., Shaw R.J.* Comparison of polymerase chain reaction amplification of two mycobacterial DNA sequences, IS6110 and the 65 kDa antigen gene, in the diagnosis of tuberculosis // *Thorax*.— 1992.— Vol.47.— P.690—694.
48. *Wayne L.G.* Mycobacterial speciation // *The Mycobacteria: a Sourcebook. Part A* / Eds G.P. Kubica, L.G. Wayne.— New York: Dekker, 1984.— P.25—65.
49. *Wilson K.H., Blitchington R.B., Green R.C.* Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction // *J. Clin. Microbiol.*— 1990.— Vol.28.— P.1942—1946.

Поступила 10.06.98.

Рецензия

© КЛЯЧКИН Л.М., 1999

УДК [616.233+616.24]-022-092+[615.276+615.33]-03

Л.М.Клячкин

РЕЦЕНЗИЯ НА КНИГУ “МЕХАНИЗМЫ ВОСПАЛЕНИЯ БРОНХОВ И ЛЕГКИХ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ”¹

Болезни органов дыхания относятся к числу наиболее распространенных и тяжелых форм патологии человека, поэтому проблема борьбы с ними, которая еще далека от разрешения, привлекает постоянное внимание пульмонологов, как исследователей, так и практиков — клиницистов. Книга представляет собой плод коллективного труда большой группы авторов под редакцией профессора Г.Б.Федосеева — одного из наиболее авторитетных пульмонологов нашей страны.

Воспаление — универсальный патологический процесс, с которым связаны практически все болезни органов дыхания. Общебиологические представления о воспалении как патогенетической основе легочной патологии, сосредоточены в 1-й главе, оно рассматривается

с физиологических и патологических позиций как единство повреждения дыхательных путей и защиты от него. Для клиники важно, что общие биологические закономерности воспаления реализуются почти бесконечным многообразием гетерогенных клинических форм и вариантов.

Этиология воспаления обсуждается во 2-й главе с учетом причинной роли инфекционных факторов (вирусов, бактерий, грибов), профессиональных и физических факторов. К сожалению, среди профессиональных видов патологии не упоминаются важные виды воспалительной патологии (пневмокониозы и др.), а обсуждение физических факторов обходит проблему экстремальных термических воздействий (ожог, ознобление дыхательных путей). Почти ничего

¹ — Механизмы воспаления бронхов и легких и противовоспалительная терапия / Под ред. Г.Б.Федосеева. — СПб “Нордмед-Издат”, 1998. — 688 с.