

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ
РЕСПУБЛИКИ
КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
АКАДЕМИЯ им. И.К. АХУНБАЕВА
КЫРГЫЗСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИНСТИТУТ ПЕРЕПОДГОТОВКИ И ПОВЫШЕНИЯ
КВАЛИФИКАЦИИ**

Диссертационный совет Д 03.17.542

На правах рукописи

УДК: 616-093:002.5

АДАМБЕКОВА АСЕЛЬ ДОКТУРБЕКОВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ
ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА И РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМ В
УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ
ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВОГО ТУБЕРКУЛЕЗА В КЫРГЫЗСКОЙ
РЕСПУБЛИКЕ**

03.02.03 - микробиология

14.01.16 - фтизиатрия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Бишкек - 2018

Работа выполнена на базе Республиканской референс-лаборатории и лаборатории иммунологии Национального центра фтизиатрии Министерства здравоохранения Кыргызской Республики.

Научные консультанты: **Литвинов Виталий Ильич;**
академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Кадыров Абдуллат Саматович.
доктор медицинских наук

Официальные оппоненты: **Табаева Алия Абиловна**
доктор медицинских наук, профессор;

Белова Елена Сергеевна
доктор медицинских наук, профессор

Туйгунов Марсель Маратович
доктор медицинских наук, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Центральный научно
исследовательский институт туберкулеза»
отдел микробиологии (107564, г. Москва,
Яузская аллея, д. 2).

Защита диссертации состоится «31» октября 2018 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 03.17.542 при Кыргызской государственной медицинской академии имени И. К. Ахунбаева и Кыргызском государственном медицинском институте переподготовки и повышения квалификации Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева 92), в конференц. зале, код доступа к on-line защите в Zoom webinar – 243-356-1748.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках Кыргызской государственной медицинской академии имени И. К. Ахунбаева (720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева 92) и Кыргызского государственного медицинского института переподготовки и повышения квалификации Министерства здравоохранения Кыргызской Республики (720040, г. Бишкек, ул. Боконбаева 144-А), а также на сайтах kgma.kg, ksmi.kg.

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

И.Ш. Альджамбаева.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертации. Несмотря на определенные успехи, достигнутые во фтизиатрической практике, туберкулез остается угрозой для человечества, когда ежегодно заболевают и погибают от туберкулеза миллионы людей [Atarod Z. et al., 2011; Bhatti A. et al., 2012].

Часто фтизиатры встречаются с малосимптомным течением, что обуславливает развитие запущенных форм туберкулезной патологии и позднюю диагностику [Аксенова В. А., 2004; Аленова А. В. и соавт., 2013]. Диагноз туберкулез иногда ставят случайно или посмертно [Гарбуз А. Е. и соавт., 2013; Евстигнев Е. И., 2013; El. Barni R. et al., 2012].

В 2016 году в мире было зарегистрировано 10,4 млн. случаев заболеваний туберкулезом и около 1,7 млн. случаев со смертельным исходом. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), около трети населения планеты – два миллиарда человек – инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* и подвержены риску заражения. Согласно доклада ВОЗ в 2016 году во всем мире насчитывалось уже 10,4 миллионов новых случаев заболеваний туберкулезом. Из общего числа заболевших 5,9 млн. были мужчины с удельным весом - 56% и 3,5 миллиона женщины - 34%. Число заболевших детей до 14 лет составило 1,0 млн. с удельным весом - 10%. Среди всех новых случаев заболевания туберкулезом, ВИЧ инфекция составила 1,2 млн. (11%). Случаев смерти от туберкулеза по данным ВОЗ в 2016 году было зафиксировано 1,7 млн., из которых 0,4 млн. больных были ВИЧ инфицированы. [World Health Organization report, 2009, 2011, 2013].

В 2016 году в Кыргызской Республике зарегистрировано 5548 впервые выявленных больных туберкулезом – 91,3 на 100 тыс. населения, против 5684 в 2015 году (95,4). Однако, несмотря на тенденцию снижения уровня заболеваемости, ситуация осложняется распространением лекарственно-устойчивого туберкулеза и туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией [World Health Organization report, 2013].

В ходе эпидемиологического надзора за распространенностью лекарственно - устойчивых форм туберкулеза в Кыргызской Республике, проведенного в 2010 - 2011 годах Республиканской референс-лабораторией (РРЛ) Национального центра фтизиатрии (НЦФ) Министерства здравоохранения Кыргызской Республики при поддержке CDC, Атланта, (США), проекта ХОУП в Кыргызской Республике и Супра-Национальной референс - лаборатории, г. Мюнхен, (Германия), было выявлено, что бремя туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) чрезвычайно высоко в стране. Так, распространённость МЛУ ТБ среди новых случаев составила 26,4% и среди ранее леченных – 51,6% [World Health Organization report, 2014]. Именно с проблемой антибиотикорезистентности многие авторы связывают увеличивающуюся заболеваемость туберкулезом, в

частности тяжелыми прогрессирующими формами [Шилова М. В., 2010; Каминская Г. О. и соавт., 2014].

Актуальность проведенных исследований определена тем фактом, что согласно отчетам ВОЗ, Кыргызская Республика относится к одной из 27 стран в мире с высоким бременем туберкулеза с МЛУ ТБ. Так, по данным Национальной Туберкулезной Программы (НТП) за 2014 год количество выявленных МЛУ ТБ больных составило 1370, в 2013 - 1160 случаев. В то время как, за 2011 - 835, 2012 - 904, т.е. в стране сложилась ситуация с неуклонным ростом МЛУ ТБ.

В сложившейся ситуации особое значение приобретает внедрение и повсеместное использование быстрых методов диагностики туберкулеза, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, позволяющие в течение нескольких часов диагностировать как наличие самого комплекса *Mycobacterium tuberculosis*, так и генных мутаций, приводящих к развитию устойчивости к противотуберкулезным препаратам [World Health Organization report, 2011, 2016, Дорожкова И. Р. и соавт., 2012; Ghariani A. et al., 2015; Huang F., 2015].

В 2010 году ВОЗ одобрила новый, быстрый, автоматизированный тест амплификации нуклеиновых кислот (ТАНК), Xpert®MTB/RIF, (Cepheid, Sunnyvale, США), который может одновременно выявлять туберкулез и устойчивость к рифампицину [Аналитическая справка НЦФ МЗ КР, 2014]. ВОЗ рекомендует использование XpertMTB/RIF в качестве начального диагностического теста для лиц, с подозрением на МЛУ-ТБ или ВИЧ-ассоциированного туберкулеза [World Health Organization report, 2011]. С помощью GenoType®MTBDRs появилась возможность выявлять туберкулез и устойчивость микобактерий к препаратам второго ряда [Kiet V.S., et al., 2010; Huang W.L., et al., 2011].

В связи с актуальностью рассмотренных проблем для современной фтизиатрии, диссертационное исследование посвящено изучению применения быстрых методов диагностики ТБ и устойчивых к основным противотуберкулезным препаратам и их характеристика по сравнению с традиционными методами диагностики.

Связь темы диссертации с основными научно-исследовательскими работами, проводимыми научными учреждениями. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы Национального центра фтизиатрии при Министерстве здравоохранения Кыргызской Республики и проектами: «Профилактика, совершенствование методов диагностики и повышения эффективности лечения резистентных форм туберкулеза среди населения Кыргызской Республики», государственная регистрация №0005741 (2012 г.), «Совершенствование методов диагностики и повышение эффективности лечения резистентных форм туберкулеза среди населения Кыргызской Республики», государственная регистрация № 0007011 (2013 г.).

Цель исследования:

Снижение распространенности лекарственно устойчивых форм

туберкулеза в Кыргызстане, путем усовершенствования эпидемиологического надзора и внедрения молекулярно генетических методов лабораторной диагностики.

Задачи исследования:

1. Оценить эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в условиях реализации различных противотуберкулезных программ и систем эпидемиологического надзора.
2. Определить бремя болезни туберкулеза в Кыргызской Республики в условиях развития лекарственно-устойчивых и запущенных форм.
3. Провести сравнительный анализ эффективности традиционных методов диагностики и современных молекулярно-генетических исследований туберкулеза.
4. Изучить чувствительность и специфичность современных лабораторных методов определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* в сравнении с классическими методами диагностики.
5. Определить характер мутаций в генах, ведущих к развитию резистентности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину, изониазиду на территории Кыргызской Республики.
6. Усовершенствовать систему эпидемиологического надзора за лекарственно устойчивыми формами туберкулеза.

Научная новизна полученных результатов:

- Впервые проведена оценка эффективности реализации различных противотуберкулезных программ, системы эпидемиологического надзора и их влияние на эпидемический процесс при туберкулеза за период 1994 – 2016 гг.
- Впервые определено бремя лекарственно-устойчивых и запущенных форм туберкулеза в Кыргызской Республики в условиях внедрения ДОТЦ.
- Впервые проведена сравнительная оценка эффективности традиционных методов диагностики и современных молекулярно-генетических исследований с определением чувствительности, специфичности и положительной прогностической ценности.
- Впервые изучен характер мутаций в генах, ведущих к развитию резистентности *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину и изониазиду на территории Кыргызской Республики.
- Разработана система эпидемиологического надзора за лекарственно устойчивыми формами туберкулеза для оптимизации контрольных и профилактических мероприятий (первичная, вторичная и третичная профилактика).
- Впервые в современных условиях Кыргызской Республики изучено применение молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза, таких как GenoType MTBDR plus и Xpert MTB/RIF.
- Разработан алгоритм диагностики *Mycobacterium tuberculosis* и генных мутаций, ведущих к развитию устойчивости к противотуберкулезным

препаратам, который позволит повысить уровень выявления больных среди указанных заболеваний на первичном уровне здравоохранения.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Разработанный комплекс конкретных предложений и рекомендаций для практического здравоохранения по использованию молекулярно-генетических тестов GenoType MTBDR plus и XpertMTB/RIFc целью раннего выявления туберкулеза, будет способствовать дальнейшему улучшению выявления в эпидемиологическом плане опасного контингента больных туберкулезом легких. Раннее выявление туберкулеза лимфатических узлов предотвратит заражение резистентным возбудителем, обеспечит доступ к своевременной терапии противотуберкулезными препаратами второй линии, что сократит длительность существования источников инфекции и снизит уровень заболеваемости населения.

Совершенствование комплекса противотуберкулезных мероприятий в контексте раннего выявления МЛУ ТБ, поможет сократить финансовые затраты, связанные с лечением осложнений и окажет благоприятное воздействие на эпидемиологическую обстановку по туберкулезу в *Mycobacterium tuberculosis* в целом.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Уровень заболеваемости, смертности и распространенности по туберкулезу в республике в результате реализации противотуберкулезных программ в 1994 - 2015 гг. снизились на 49,4%, 52,5% и 44,2% соответственно по сравнению с годами высокой заболеваемости (2000 - 2001 гг). Однако, по критериям ВОЗ эпидемиологическая ситуация в стране остается неблагоприятной т.к. уровень заболеваемости превышает пограничные показатели в два раза.
2. Развитие лекарственно-устойчивых и запущенных форм туберкулеза в республике повысило бремя болезни.
3. Современные молекулярно-генетические методы диагностики имеют высокую чувствительность и специфичность по сравнению с традиционными методами выявления туберкулеза и сокращают время исследования.
4. Изучение характера мутаций в генах, ведущих к развитию резистентности микобактерий туберкулеза к рифампицину, и изониазиду, поможет определить останутся ли мутации устойчивости в бактериальной популяции в отсутствие антимикробной терапии на территории Кыргызской Республики.
5. Усовершенствование системы эпидемиологического надзора за туберкулезом с учетом лекарственно устойчивых форм позволит обеспечить раннее выявление лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, проведение адекватного и раннего лечения, своевременный учет случаев и противотуберкулезных мероприятий, направленных на предупреждение дальнейшего распространения этих форм.

Личный вклад соискателя. Соискатель лично проводила подбор, проработку литературных источников, планировала, организовывала и

принимала непосредственное участие в проведении диагностики туберкулеза с применением всех методов исследования.

Оценка полученных результатов исследования, проведение соответствующей группировки и статистической обработки числовых параметров проводился автором лично. Также автор принимала непосредственное участие в разработке новых образовательных программ, направленных на повышение уровня знаний о современных методах диагностики туберкулеза.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: научно-практической конференции «Физиология, морфология и патология человека и животных в условиях Кыргызстана» (Бишкек, 2013); юбилейной международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной и неинфекционной эпидемиологии в развитии концепции нового общественного здравоохранения в XXI веке» (Бишкек, 2013); международной конференции молодых ученых и студентов “Дни науки КГМА” (Бишкек, 2013); международной конференции “VIII Конгресса Евро-Азиатского респираторного общества IV Конгресса Кыргызского Торокального общества” (Бишкек, 2013); международной научно-практической конференции “90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси” (Минск, 2015); научной конференции “Проблемы и вызовы фундаментальной и клинической медицины в XXI веке” (Бишкек, 2017); научно-практической конференции по проблемам туберкулеза в странах Центрально-Азиатского региона и Китая (Иссык-Куль, 2016).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. По материалам диссертации опубликовано 34 научные статьи. Принимала участие в разработке и публикации следующих документов: руководство по обслуживанию лабораторного оборудования, рекомендации по внедрению платформы GeneXpert, рекомендации по развитию лабораторной диагностики туберкулеза в республике.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 216 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка из 251 источников использованной литературы. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 55 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе «Эпидемиологические и клинико-диагностические аспекты современного туберкулеза в мире (обзор литературы)» представлен обзор и анализ научных публикаций отечественных и зарубежных авторов по эпидемиологии туберкулеза, оценке оптимизации диагностики туберкулеза. Представлены данные о динамике показателей

заболеваемости, смертности и распространенности в мире, в странах СНГ; эффективности различных противотуберкулезных программ.

Во второй главе описаны «Материалы и методы исследования».

Объект исследования. Для проведения данной диссертационной работы использован метод сбора эпидемиологической и диагностической информации о микобактериях туберкулеза, особенностях культивирования, изменчивости, приводящей к лекарственной резистентности, изучение диагностической эффективности современных методов диагностики туберкулеза, динамики заболеваемости туберкулезом в республике в современных условиях.

Предметом исследования явились заболеваемость, распространенность, смертность от туберкулеза населения, частота встречаемости мутаций возбудителя и их распределение между старыми и новыми случаями пациентов, а также лекарственная чувствительность к изониазиду, рифампицину, дигидрострептомицину сульфату, этамбутолу гидрохлорида.

Выделение микобактерий проводили классическим бактериологическим методом на плотной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й), а также применяли жидкие питательные среды, такие как Миддлбрук 7Н9 и посева на плотную агаровую среду Миддлбрук 7Н11. Тесты на лекарственную чувствительность к изониазиду, рифампицину, дигидрострептомицину сульфату, этамбутолу гидрохлорид проводили в параллельных исследованиях, по следующей схеме:

- культуры МБТ, полученные на системе BDBASTECMGIT 960 исследовали на лекарственную чувствительность на системе BDBASTECMGIT 960;
- культуры МБТ, полученные на среде Левенштейна-Йенсена, на лекарственную чувствительность исследовали методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена;

Учет результатов посева проводили в течение всего периода инкубации, при максимальных сроках на питательной среде Левенштейна – Йенсена - 2,5 месяца и на системе BDBASTECMGIT 960 – 42 дня. На основе полученных данных были рассчитаны основные показатели теста лекарственной чувствительности на системе BDBASTECMGIT 960 по отношению к определению лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена. Чувствительность, специфичность и оценку эффективности рассчитывали по общепринятым формулам:

$$Se = (a/(a+c)) \times 100,$$

а – число штаммов с устойчивостью к препарату, подтвержденной обоими методами,

с – устойчивые по результатам Л-Й, но чувствительные по BDBASTECMGIT 960.

$$Sp = (d/(d+b)) \times 100,$$

d – число штаммов, чувствительных к препарату, по результатам обоих методов,

b – чувствительные по результатам Л-Й, но устойчивые по результатам BDBASTESMGIT 960.

Оценка эффективности = $(a + d)/\text{все исследования}$.

Для идентификации микобактерий туберкулеза использовались: морфологические и биохимические методы, а также высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и биологические микрочипы.

Окончательно вид НТМ устанавливали на основании результатов большинства примененных методов: 3 культуральных метода, ВЭЖХ, 2 молекулярно-генетических метода. В ряде случаев повторно исследовали ту же культуру, также учитывали результаты анализа повторного выделения культур (от одного и того же больного). В части случаев «окончательным» был результат секвенирования. Именно число идентифицированных таким образом культур каждого вида принимали за 100%, и по отношению к этому показателю высчитывали информативность использования каждого метода. Микроскопию клинического материала проводили обычным способом под иммерсионным объективом (x100) на наличие кислотоустойчивых микроорганизмов при окраске по Цилю-Нильсену или флюорохромами.

Культуральное выделение микобактерий проводилось параллельно путем посева на три различные питательные среды:

1. яичную среду Левенштейна-Йенсена (Л-Й),
2. жидкую среду Миддлбрук 7Н9 в автоматизированной системе BASTESMGIT 960 (MGIT 960)

3. на чашки с плотной агаровой средой Миддлбрук 7Н11, разделенные на 2 сектора: с антибиотиками/без антибиотиков (с антибиотиками – 7Н11 селективный агар – для подавления роста посторонней микрофлоры и получения чистой культуры микобактерий, без антибиотиков – для выделения штаммов микобактерий, рост которых могут ингибировать антибиотики). В качестве тест-штамма использовали лабораторный штамм *M.tuberculosis* H37Rv.

Лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза определяли на основе модифицированного метода пропорций, сравнивая скорость роста микобактерий туберкулеза в контрольной пробирке и в пробирках с лекарственными препаратами. Для определения чувствительности к стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу использовали обогащающие добавки и антибиотики, входящие в набор SIREkit. Для определения чувствительности к пипразинамиду использовали набор PZAKit.

В качестве исходного материала для выделения ДНК использовали образцы от пациентов с положительными и отрицательными результатами микроскопии и проводили тестирование XpertMTB/RIF. Анализ XpertMTB/RIF основан на полимеразно-цепной реакции (ПЦР) работающий в

режиме реального времени, предназначенный для выявления мутаций гена *groV*. Определение вида НТМ проводили при помощи теста «MAIS-диф», предназначенный для идентификации видов микобактерий комплекса MAIS (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*), некоторых других видов нетуберкулезных микобактерий (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. marinum*) и их дифференциации от *M. Tuberculosis* complex.

Статистический анализ. Статистические тесты, использованные для обработки данных в данном исследовании это отношение вероятностей, чувствительность, специфичность положительная прогностическая ценность (ППЦ), отрицательная прогностическая ценность (ОПЦ) вычислялись при использовании бесплатных статистических программ в EpiInfo, версия 3.7.

Вычисляли среднюю арифметическую, статистическую ошибку средней величины, среднеквадратическое отклонение, коэффициент вариации. Сравнение статистических выборок производили по критерию Стьюдента. Одновременно вычисляли коэффициенты корреляции изученных показателей между собой по Пирсону.

Коэффициент корреляции Пирсона : $\sum (d x x d y)$
 $r_{xy} = \sqrt{\sum dx^2 \times \sum dy^2}$

Оценка достоверности различия сравниваемых величин проводилось по критерию Стьюдента (t) и уровню вероятности безошибочного прогноза (P). Для расчета использовали следующие статистические показатели.

Соблюдение этических норм.

Данное исследование проводилось с соблюдением врачебных этических норм, с согласия Комитета по Этике Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Все данные от больных деидентифицированы, результаты тестов анонимизированы и врачебная тайна сохранена.

В третьей главе «Оценка эпидемиологической ситуации по туберкулезу в Кыргызской Республике» приведены данные ретроспективного анализа многолетней динамики заболеваемости, распространенности и смертности (1991-2016 гг) в Кыргызской Республике. За анализируемый период размах заболеваемости составил: 53,7 -192,4. Распространенность туберкулеза характеризуется умеренной тенденцией к снижению. Размах показателей составляет от 170,3⁰/₀₀₀₀ до 363,8⁰/₀₀₀₀. Соотношение между показателями заболеваемости и распространенности в разные периоды наблюдения были различны. В начале 90-х годов оно составляло 1:6,6, к началу внедрения программы ДOTS снизилось до 1:3,1 и после внедрения программы -1:1,4, что свидетельствует о эффективности проводимых лечебных мероприятий. Смертность от туберкулеза была в пределах от 5,6 до 27,0. В начале 90-х годов до внедрения программы Directly Observed Treatment, Short-course соотношение показателя заболеваемости к показателю смертности составляло 1:6,3. После внедрения программы ДOTS и стабилизации уровня заболеваемости (1997-2007гг) это соотношение составило 1:10,7, а в последние годы – 1:12 (рис. 1).

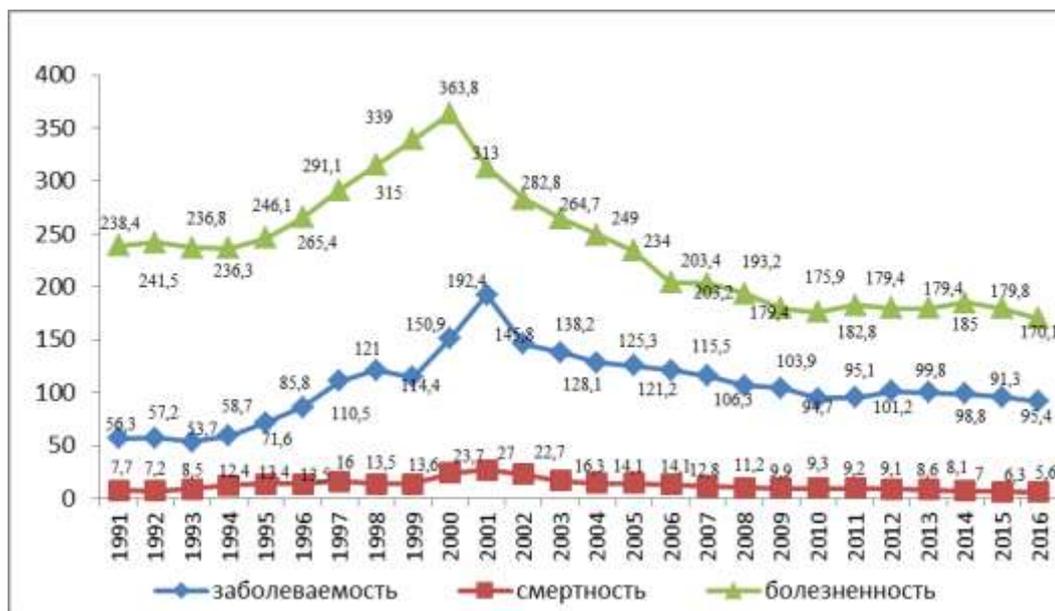


Рис. 1. Многолетняя динамика заболеваемости, распространенности и смертности от туберкулеза в Кыргызской Республике.

Туберкулез регистрируется повсеместно. Из общего числа выявленных больных 75% приходится на 4 административные территории: на Чуйскую область – 21,0%, Ошскую - 19,0, г. Бишкек – 19,0% и Жалалабатскую – 16,0%. По остальным регионам удельный вес варьировал по 4,0% в г. Ош и Таласской области и до 7,0% в Баткенской области.

По средним многолетним показателям заболеваемости лидируют Чуйская область и г. Бишкек, (119,8⁰/₀₀₀₀ и 117,3⁰/₀₀₀₀ соответственно), а в

Таласской области, где доля числа случаев туберкулеза незначительная (4%), средний интенсивный показатель составляет 105,1⁰/₀₀₀₀. По долевого участию в общем числе случаев туберкулеза Ошская область занимает 4 место, по уровню заболеваемости на 7 месте с показателем - 91,6⁰/₀₀₀₀. По остальным областям этот показатель был ниже республиканского и варьировал от 68,0±3,9⁰/₀₀₀₀ в Иссык-Кульской до 97,8±6,1⁰/₀₀₀₀ в Нарынской. Высокий показатель заболеваемости наблюдался в ГСИН (2105,0⁰/₀₀₀₀), обусловленный хорошей выявляемостью и снижением эффективности их лечения.

По средним многолетним данным заболеваемости достоверные различия в интенсивных показателях наблюдаются в Чуйской области и г. Бишкек по сравнению с остальными регионами. В областях южного региона, Иссык-Кульской, Нарынской и Таласской областях уровень заболеваемости одинаков и достоверной разницы не имеет. Размах ИП составил от 68,0±0,069⁰/₀₀₀₀ в Иссык-Кульской области до 119,8±0,015⁰/₀₀₀₀ в Чуйской.

В динамике за анализируемые годы размах показателя смертности (ПС) по республике составил от 5,6 в 2016 до 27,0 в 2001. Высокие ПС - выше 10 на 100 тысяч населения отмечаются с 2000г. по 2007 годы. В последующем идет снижение этого показателя в 1,5 раза с 9,9 в 2008 до 5,6 в 2016 году. ПС

выше республиканского уровня отмечены в г. Бишкек и Чуйской области. В г. Бишкек средний ПС составил $16,6^{0/0000}$ населения, с размахом от 5,9 до 22,4, снижением его в 3,7 раза. В Чуйской области средний показатель составил 16,1, размах варьировал от 10,5 до 21,4 снижением в 2 раза. Во всех остальных административных территориях средний показатель смертности за анализируемый период был ниже республиканского. В г. Ош средний ПС составил $11,1^{0/0000}$ населения. минимальный-6,2, максимальный – 13,9. В динамике наблюдается снижение в 2,2 раза. В Нарынской области средний ПС составил $9,6^{0/0000}$ населения, минимальный 5,9, максимальным 13,5, смертность снизилась в 2 раза. В Таласской области средний ПС составил $9,3^{0/0000}$ населения, минимальный – 5,6, максимальный – 11,7, снижение в 2 раза. В Ошской области средний показатель смертности составил $-7,8^{0/0000}$, минимальный - 4,7, максимальный – 11,9, снижение в 2,5 раза. Сравнительно большое снижение ПС произошло в Баткенской, Жалалабатской и Иссык-Кульской областях в 3,8, 3,7 и 3 раза соответственно. Средний ПС в Баткенской области составил $6,9^{0/0000}$ населения, минимальный 3,2 и максимальный - 12,2. В Жалалабатской области средний ПС составил $7,6^{0/0000}$ населения, минимальный -3,5 и максимальный 13,0. В Иссык-Кульской области средний ПС за анализируемый период составил $6,7^{0/0000}$ населения, минимальный -3,5, максимальный - 10,7.

Определены гендерные различия ПС: у мужчин этот показатель в 3 раза выше, чем у женщин ($P > 0,001$, средний ПС 23,8 и $6,6^{0/0000}$). Коэффициент соотношения умерших мужчин к женщинам составил 3:2.

Таким образом, в Кыргызской Республике, несмотря на снижение уровня заболеваемости, распространенности и смертности сохраняется эпидемиологическое неблагополучие по туберкулезу, в связи с превышением пороговой заболеваемости в 10 раз рекомендованной ВОЗ. Распространение туберкулеза по республике повсеместное, территорией риска являются Чуйская и Таласская области и г. Бишкек где средние многолетние показатели заболеваемости достоверно выше таковых по Кыргызской Республике ($P < 0,05$).

Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом детей за 2001- 2016 годы характеризуется выраженной тенденцией к снижению. В 2016 г. заболеваемость туберкулезом среди детей снизилась в 2,9 раза, ежегодный темп снижения составил –8,0%. Минимальный интенсивный показатель составил $-24,1^{0/0000}$, максимальный –82,2. Показатели заболеваемости в первые и последние годы наблюдения имели достоверное различие ($P < 0,05$).

Средний уровень заболеваемости туберкулезом подростков за анализируемые годы была в 1,7 раза выше средней заболеваемости детей ($76,7^{0/0000}$, $43,3^{0/0000}$ соответственно). В динамике за 2001-2016 годы отмечается стабильная тенденция с высоким уровнем заболеваемости. Максимальный интенсивный показатель заболеваемости подростков составил - $93,1^{0/0000}$, минимальный – $62,6^{0/0000}$. Достоверных различий в этих показателях за наблюдаемые годы не выявлено ($P < 0,05$), кроме 2006, 2010 гг.

Гендерное распределение заболеваемости туберкулезом за период с 2001 по 2016 годы характеризуется преимущественным поражением лиц мужского пола (73,8%) и во все годы наблюдения отмечается достоверное различие уровня заболеваемости между мужчинами и женщинами ($P < 0.05$).

Заболеваемость туберкулезом регистрируется во всех возрастных группах. При этом она регистрируется даже у детей от 0 до 6 лет и достоверно чаще у мальчиков $27,1 \pm 0,3$, чем у девочек этого же возраста – $17,4 \pm 0,2$ ($P < 0.05$). По мере взросления показатели заболеваемости также повышаются. Группой риска у мужчин являются лица от 18 до 54 лет, у которых показатель заболеваемости варьирует в пределах $160,1 \pm 0,6$ (18-24 лет) – $214,5 \pm 0,9$ (45-54 лет). У женщин группа риска лица от 15 до 34 лет с размахом показателя от $147,1 \pm 0,8$ (15-17 лет) до $153,4 \pm 0,6$. Отмечается высокий показатель заболеваемости у мужчин старше 65 лет – $143,4 \pm 1,0$ и женщин в возрасте 55-64 и старше 65 лет ($187 \pm 1,2$ и $105,5 \pm 0,7$ соответственно). Во всех возрастных группах мужчин и женщин кроме 7-14 лет и 18-24 года было достоверное различие этих показателей ($P < 0.05$).

За 2011-2016 годы туберкулезом заболело 252 медицинских работников, из которых 20 работали в противотуберкулезных организациях. В динамике за анализируемые годы число заболевших туберкулезом медицинских работников находилось в пределах от 23 в 2012 году до 49 в последние три года. При этом БК+ находили 19,9% выявленных больных.

На эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в республике влияет и миграция населения. Это, граждане Кыргызской Республики, заболевшие в России, Казахстане и других республиках СНГ, и прибывшие на лечение домой. Всего за последние 4 года заболело туберкулезом 2157 граждан Кыргызстана, прибывших из-за рубежа. За анализируемые годы вклад мигрантов в общую заболеваемость остается стабильным с размахом от 7,9% (2012 г.) до 10,4% (2013 г.). В 2015 году они составили 9,3% против 10,1% в 2014 г. Доля заболевших мигрантов из южных областей, составляет в среднем 59,1%, из которых 20,6% и 17,6% приходится на Баткенскую и Жалалабадскую области.

Значительный вклад в заболеваемость туберкулезом в Кыргызской Республике вносит и контингент ГСИН. Динамика заболеваемости за 2011-2016 гг. стабильна с высоким ее уровнем. За этот период было выявлено 1054 случая туберкулеза со средним интенсивным показателем $2408,8$ с размахом от $1590,0$ в 2016 г. до $3804,3$ в 2011 г. Умерло от туберкулеза в ГСИН 109 больных, средний ПС составил $281,7$ с размахом от $24,1$ в 2016 г. до $401,6$ в 2012 г.

Туберкулез является одним из основных ВИЧ ассоциируемых инфекций. Среди больных туберкулезом, доля обследованных на ВИЧ инфекцию в среднем составляет - 85,8%.

В Кыргызской Республике за период 2011-2015 гг. всего было зарегистрировано 1144 случая туберкулеза среди ВИЧ инфицированных. Удельный вес больных с ко инфекции составил 31,1%. Из всех случаев

зарегистрированных больных туберкулезом в республике прошли исследования на ВИЧ - 85,8%.

За 2011-2015 гг. наблюдается рост доли больных туберкулезом среди ВИЧ инфицированных, если в 2011 году удельный вес их составлял 25,7%, то в 2015 году он вырос до 34,0% и только в 2016 г он снизился до- 29,1%.

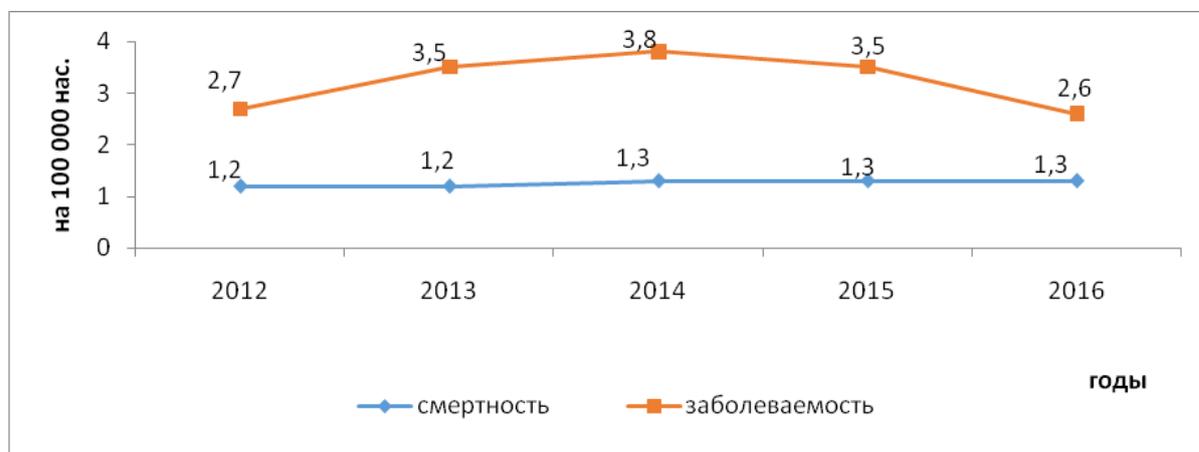


Рис. 2. Показатели заболеваемости и смертности от туберкулеза у ВИЧ - инфицированных 2012-2015 гг.

Показатель смертности от туберкулеза у ВИЧ-инфицированных за анализируемые годы оставался стабильным в пределах от 1,2 до 1,3, а соотношение между показателями смертности и заболеваемости менялось. Если в 2012 году это соотношение составляло 1:2,2, то в 2015 году оно равнялось 1:2,6, что свидетельствует об улучшении проводимых лечебных – диагностических мероприятий (рис 2).

Таким образом, эпидемический процесс при туберкулезе в республике характеризуется высоким уровнем заболеваемости подростков (76,7‰), мужчин (73,8%), вовлечением в эпидемический процесс медработников (252), контингента ГСИН (1054) и ВИЧ инфицированных (1144 случая).

В четвертой главе «Ретроспективный анализ особенностей туберкулеза в Кыргызской Республике по клиническим формам и лекарственной устойчивости за период 2000-2015 гг» приводятся данные о запущенных и лекарственно-устойчивых формах туберкулеза и оценки его бремени. Несмотря на позитивные сдвиги в заболеваемости туберкулезом, в развитии современного туберкулеза появились особенности. Сокращение охвата населения проф. осмотрами, что способствовало уменьшению доли больных туберкулезом выявленных на ранних стадиях его развития. Сформировались микобактерии туберкулеза, устойчивые к лекарственным средствам.

В Кыргызской Республике запущенные случаи туберкулеза в среднем составили 489 случаев от 33597 случаев впервые выявленного туберкулеза за 2011-2016 годы с удельным весом 1,5%. В динамике за анализируемые годы, доля запущенных случаев растет с 1,3% в 2011 г. до 1,7% и 1,67% в 2014 и 2016 гг. Высокая доля запущенных случаев туберкулеза наблюдается в

Нарынской области, с удельным весом - 3,4% и размахом от 1,4% в 2012 г. и 5,2 в 2014 г. Маленькая доля запущенных случаев наблюдается в Чуйской области – 0,5% с размахом от 0,5 до 1,7%. В Иссык-Кульской области этот показатель составил 2,1% с размахом 1,3% (2011) - 2,7% (2014). В городе Бишкек и Таласской области экстенсивный показатель запущенных случаев туберкулеза составляет 1,9% и 1,8% соответственно, при этом в г. Бишкек он варьирует от 1,2 в 2011 г. до 3,1% в 2014 г. а в Таласской области от 1,6% в 2015 г. до 4,0% в 2011 г. В Жалалабадской, Ошской и Баткенской областях и в городе Ош удельный вес запущенных случаев был сравнительно одинаков составляя 0,9%, 1,1%, 1,3% и 1,4% соответственно. В Жалалабадской области этот показатель колебался в пределах от 0,8% до 1,9%. В Баткенской области доля запущенных случаев имела тенденцию к росту с 0,9% до 2,0% в 2014 году. В Ошской области и г. Ош также наблюдается рост этого показателя с 0,6% до 1,6% и с 0,4% до 2,5% соответственно. По этим показателям можно судить об эффективности лечебно-диагностических мероприятий. Они свидетельствуют о поздней выявляемости болезни на уровне первичной медико-санитарной помощи, а также недостаточной информированности населения о туберкулезе и необходимости своевременного обращения за медицинской помощью в случае подозрения на заболевание.

Таким образом, в эпидемическом процессе при туберкулезе запущенные случаи являются дополнительным и длительным источником распространения возбудителя туберкулеза.

Лекарственная устойчивость к противотуберкулезным препаратам является одним из самых значимых проявлений изменчивости МБТ и появляется при прерывании лечения. Формирование рецидива, скорее всего, свидетельствует о лекарственно-устойчивой форме, поскольку он обычно развивается у тех, кто недостаточно хорошо пролечился. Выжившие в результате такого лечения палочки Коха приобретают устойчивость к лекарственным препаратам, поэтому их лечение требуют особых усилий.

В Кыргызской Республике отмечается рост заболеваемости лекарственно-устойчивым туберкулезом. Число больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом в 2015 году выросло в 2 раза по сравнению с 2010 г. и в 47 раз по сравнению с 2005 г. Отмечается выраженная тенденция роста доли лекарственно-устойчивого туберкулеза. В 2010 году экстенсивный показатель этой формы туберкулеза составлял 10,2%, а в 2015 году он вырос до 20,7%.

За анализируемый период всего лекарственно устойчивых форм туберкулеза лабораторно подтверждено - 5846 случаев, с удельным весом 17,4%. В среднем, ежегодно регистрировалось 974 случая, из них рифампицин устойчивые - 17,9%, множественно лекарственно устойчивые - 77,6% и широко лекарственно устойчивые - 4,5%. Территориально доля больных с лекарственной устойчивостью распределяется следующим образом: в Чуйской области – 23,2%, в г. Бишкек – 21,7%, Ошской области - 17,1% и Жалалабадской – 14,7%. Рост лекарственно устойчивых форм

туберкулеза отмечается в основном среди гражданского населения с размахом от 47,0% до 100%, что свидетельствует об организационных трудностях в контроле за соблюдением режима приема противотуберкулезных препаратов при амбулаторном лечении. Начиная с 2014 года, этот показатель имеет тенденцию к снижению. Об эффективности контроля приема противотуберкулезных препаратов свидетельствуют данные снижения лекарственно-устойчивых больных среди заключенных. Если с начала наблюдения (2007г.) доля больных с лекарственно устойчивым туберкулезом в ГСИН составляла 52,2% от общего числа таких больных, то к 2015 году их доля снизилась до 1,7% (рис. 3).

Распространенность ТБ в стране в 1990 году была в среднем на уровне 190⁰/₀₀₀₀. К 1999 году распространенность достигла пика, затем пошла на снижение. На фоне снижения заболеваемости отмечается неуклонный рост устойчивых форм ТБ. В динамике за 11 лет отмечается выраженная тенденция роста числа случаев МЛУ. Так если в 2005 году было выявлено всего 25 случаев МЛУ и все они были диагностированы среди гражданского населения, то в 2013 году они выросли в 42.4 раза. Значительный рост числа случаев МЛУ начинается с 2009 года и продолжается до 2013 года с последующим его снижением.

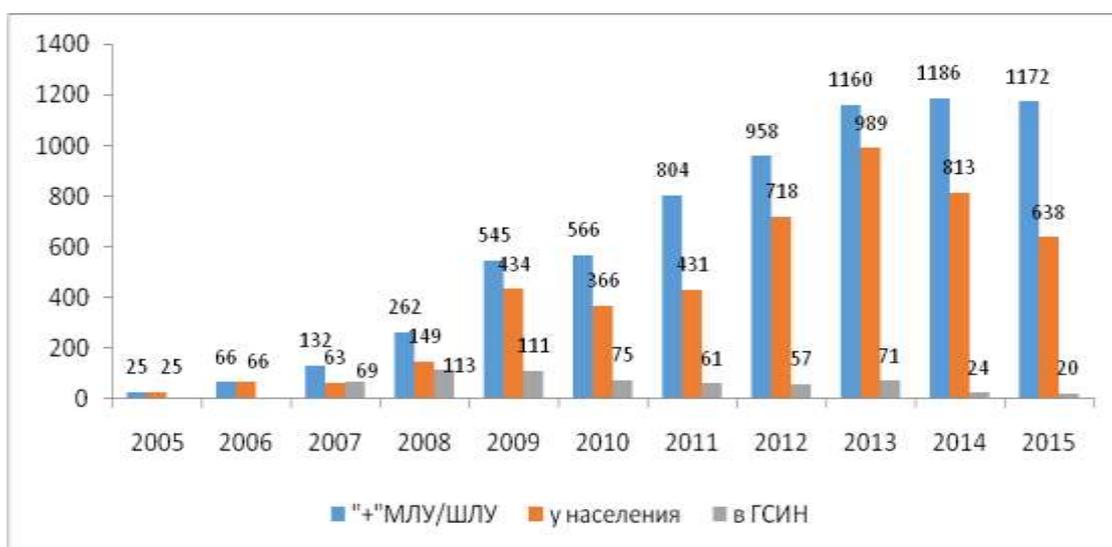


Рис. 3. Число, выявленных МЛУ/ШЛУ-ТБ в Кыргызской Республике за период 2005-2015 гг.

В 2013 году в Кыргызской Республике зарегистрировано 5710 впервые выявленных больных туберкулезом, против 5674 в 2012 году (с ГСИН при Правительстве Кыргызской Республики 5859 и 5851 случаев соответственно). Так по данным Национальной Туберкулезной Программы (НТП) за 2015 и 2014 количество выявленных МЛУ ТБ больных составило 1172 и 1186 соответственно. В то время как, за 2013 - 1160, 2011 - 804, т.е. в стране сложилась ситуация с неуклонным ростом ТБ с множественной лекарственной устойчивостью.

МЛУ-ТБ требует долговременного и дорогостоящего лечения, кроме того, если такие случаи не выявляются вовремя, больной становится источником инфекции для своей семьи, родных, соседей, друзей, коллектива устойчивыми формами возбудителя.

Кыргызская Республика входит в число 27 стран с высоким бременем МЛУ-ТБ. Бремя туберкулеза — это не только затраты и усилия системы здравоохранения страны, но и потеря трудоспособного и молодого населения.

Заболеваемость туберкулезом населения республики остается высоким, превышая в 2 раза предельный рекомендуемый ВОЗ уровень. При этом удельный вес заболеваемости туберкулезом детей и подростков варьирует от 16,2% до 26,3%, а показатель заболеваемости подростков всего на 17,7%, детей – 32,9% меньше общего показателя заболеваемости. Высокий уровень заболеваемости подростков наблюдается в Баткенской, Таласской, Чуйской областях и в г. Бишкек, где они у подростков одинаковы с общими показателями, а в г. Бишкек они даже на 15,3% выше.

Показатели заболеваемости туберкулезом детей и подростков свидетельствуют о том, что они чаще вовлекаются в эпидемический процесс в г. Бишкек и Чуйской области, где средние показатели составляют $56,1 \pm 0,3$ и $138,4 \pm 0,8$; $45,4 \pm 0,1$ и $118,4 \pm 0,07$ соответственно. Сравнительно низкая заболеваемость подростков отмечается в Иссык-Кульской области $38 \pm 0,3$, а в остальных областях они варьируют от $60,2 \pm 0,3$ в Нарынской области до $85,1 \pm 0,2$ в Баткенской. Высока заболеваемость детей в городах Ош, Бишкек и Чуйской области ($58,4 \pm 0,1$, $56,1 \pm 0,3$ и $45,4 \pm 0,1$ соответственно).

За 2000-2016 гг. средний показатель смертности по Кыргызстану составил $13,0 \pm 0,01$ ‰. Доля умерших от туберкулеза больных варьировала от 6,9% в Иссык-Кульской области до 12,7% в г. Бишкек. В Чуйской и Нарынской областях и в г. Ош доля умерших от туберкулеза больных были выше республиканских показателей, составляя 10,6%, 9,5% и 9,4% соответственно, в Ошской - 6,9% и Таласской - 8,2%.

Соотношение смертности к заболеваемости по среднемноголетним данным по республике составляет 1:11. Самый высокий показатель данного соотношения наблюдается в городе Бишкек, где среди 8 больных умирает один, в Чуйской области среди 9, а в г. Ош и Нарынской области среди 10. Сравнительно лучше эти показатели выглядят в Ошской, Жалалабатской, Баткенской и Таласской областях где один случай смерти отмечается среди 15, 14, 13, и 12 больных туберкулезом соответственно.

Уровень запущенных случаев в последние годы стабилен и составляет в 2013г. – 1,4% (в 2012г. - 1,3%). В результате поздней выявляемости на уровне ПМСП и недостаточной информированности населения о туберкулезе число запущенных случаев туберкулеза среди впервые выявленных больных увеличилось и более, чем в 2 раза превышает республиканский показатель в г. Бишкек - 3,1%. Выше республиканского уровня число запущенных случаев в Нарынской и Иссык-Кульской областях (по 2,5%).

В Кыргызской Республике индекс ущерба по годам потенциально потерянной жизни (ГППЖ) из-за преждевременной смерти за 2001 год составил: среди детей-189, подростков – 110 и взрослых – 18 275 лет. В 2015 году, когда заболеваемость снизилась более 4-х раз индекс ущерба по ГППЖ среди детского населения составил 252 года, подростков-110 лет и взрослого населения 13050. В 2015 г. несмотря на снижение заболеваемости более 4-х раз наблюдается рост показателя смертности среди детей на 25%. В сумме за 2001 этот показатель был равен 18574 годам, а в 2015 – 13412 годам. Наибольший урон обществу туберкулез оказывает в популяции трудоспособного возраста, самый высокий уровень ГППЖ оказался среди возрастной группы от 20 до 50 лет -13800 лет в 2001 г. и 10050 в 2015 году.

Экономический ущерб зависит от вида назначенного лечения и клинических форм туберкулеза. В 2016 году 21,8% больных получали амбулаторное лечение. Лечение противотуберкулезными препаратами 2 –го ряда ПДУ-ТБ, РУ/МЛУ-ТБ и ШЛУ-ТБ обходится намного дороже. В 2016 г. на лечение больных с МЛУ-ТБ затрачено 4504,95 \$ США, ПЛУ-ТБ- 405997, ШЛУ-ТБ-297,45\$ США. Всего за 2016 год вместе с остальными больными экономический ущерб от туберкулеза составил 7464230,4\$ США. В понятие бремя туберкулеза мы включили заболеваемость, смертность, наличие запущенных случаев болезни, МЛУ, ШЛУ лекарственно-устойчивых форм туберкулеза (таблица1).

Таблица 1 - Оценка бремени ТБ в Кыргызстане за 2011-2015 год

Оценка бремени ТБ * 2011-2015 гг.	Показатели	95% ДИ
Средняя заболеваемость (вт.ч.ВИЧ+ТБ)	98,7±0,005‰/0000	98,6-98,71
Средняя смертность (безВИЧ+ТБ)	7,5±0,011‰/0000	7,48-7,52
Средняя заболеваемость детей	31.9±0,035‰/0000	31,83-31,97
Средняя заболеваемость подростков	85,4±0,063‰/0000	85,28-85,52
	%	95% ДИ
Запущенные случаи ТБ	1,38±0,1	1,11-1,58
ЛУ ТБ	17,8±1,2	15,5-20,1

Биологическое бремя туберкулеза в республике высокое превышающее показатели, рекомендуемые ВОЗ в два раза. Отмечается высокий уровень заболеваемости подростков, запущенные случаи и ЛУ туберкулез составляет по 1,38±0,1 и 17,8±1,2 соответственно.

Таким образом, в многолетней динамике ПС от туберкулеза среди населения Кыргызской Республики имеет выраженную тенденцию к снижению с темпом - 47,0%, что свидетельствует об эффективности проводимых диагностических, лечебных и профилактических мероприятий. Наиболее высокое биологическое бремя от туберкулеза наблюдается в Чуйской области и в г. Бишкек, где самый высокий удельный вес смертности у больных туберкулезом. Наиболее уязвимой возрастной группой с высоким

бременем туберкулеза от ГППЖ являются лица активного трудоспособного возраста 20-50 лет. В целом в 2015 году наблюдается снижение индекса ущерба от ГППЖ в 1,3 раза по сравнению с 2001 годом. Общий экономический ущерб от туберкулеза за 2014-2015 годы составил 7464230,4 \$ США.

В пятой главе «Сравнительная оценка современных и традиционных методов диагностики микобактерий туберкулеза и их лекарственной чувствительности» дается оценка современным и традиционным методам диагностики туберкулеза и их лекарственной чувствительности. Для сравнения эффективности выделения микобактерий образцы клинического материала были посеяны на три различные питательные среды: яичную среду Левенштейна-Йенсена (Л-Й), жидкую среду Миддлбука 7Н9 в автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 960 (MGIT 960) и на чашки с агаровой средой Миддлбрук 7Н11, разделенные на 2 сектора: с антибиотиками/без антибиотиков (с антибиотиками – 7Н11 селективный агар – для подавления роста посторонней микрофлоры и получения чистой культуры микобактерий, без антибиотиков – для выделения штаммов микобактерий, рост которых могут ингибировать антибиотики).

В Республиканской референс - лаборатории Национального центра фтизиатрии исследовано 2547 образцов в автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 960(АсВ 960), из которых 1113 образцов являлись мазок-положительными (табл. 2).

Таблица 2 – Распределение исследований по результатам посева на автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 960 в зависимости от результатов микроскопии

Результаты культивирования M.Tuberculosis	Результаты микроскопии		Всего
	Положительные	Отрицательные	
Положительные	920	397	1317
Отрицательные	116	742	858
Положительные, в присутствии посторонней микрофлоры	32	19	51
Рост посторонней микрофлоры не позволил провести идентификацию роста микобактерий туберкулеза	45	276	321
Итого	1113	1434	2547

При этом, было выделено 920 культур, 116 образцов не дали роста, в 32 случаях отмечался рост культуры в присутствии посторонней микрофлоры, а в 45 образцах рост посторонней микрофлоры не позволил провести идентификацию роста M.Tuberculosis. При исследовании 1434 микроскопически отрицательных образцов, был зафиксирован рост МТ в 397 образцах, 742 образца не дали роста, в 19 случаях был зафиксирован рост

культуры в присутствии посторонней микрофлоры и в 276 образцах рост посторонней микрофлоры не позволил провести идентификацию роста возбудителя.

На твердой питательной среде Левенштейна-Йенсена (с Л-Й) всего было культивировано 2488 образцов из которых 1051 (42,3%) дали положительный рост культур МТ, из них 777 (73,9%) были бактериоскопически положительными и 274 (26,1%) - отрицательными образцами (табл.4). Из 1223 (57,7%) отрицательных образцов 216 образцов были бактериоскопически положительными, а 1007 - отрицательными. Были контаминированы 214 образца, 90 из которых были микроскопически положительными и 124 образца негативными.

В ходе исследований выявлено, что среднее время детекции роста микобактерий на системе ВАСТЕСМГИТ 960 составляет 18,7 дня против 33,2 на стандартной плотной среде Левенштейна-Йенсена.

Таким образом, подтверждена высокая эффективность системы ВАСТЕСМГИТ 960 относительно плотной среды Левенштейна-Йенсена в отношении выявления микобактерий и сроков детекции.

Таблица 3 - Распределение исследований по результатам посева на среде Левенштейна-Йенсена в зависимости от результатов микроскопии

Результаты культивирования M.Tuberculosis	Результаты микроскопии		Всего
	Положительные	Отрицательные	
Положительные	777	274	1051
Отрицательные	216	1007	1223
Рост посторонней микрофлоры не позволил провести идентификацию роста МТ	90	124	214
Итого	1083	1405	2448

Для оценки лекарственной чувствительности на изониазид, рифампицин, стрептомицин, этамбутол и к множественной форме лекарственной устойчивости (HR) было проведено на 234 параллельных посевах штаммов МБТ, из них 117- на Левенштейна-Йенсена, 117 - на диагностическую тест-систему ВДВАСТЕСМГИТ 960 (ВВМ 960). В 87 случаях была определена устойчивость к изониазиду (Н) методом абсолютных концентраций на Левенштейна-Йенсена и в 85 случаях устойчивость подтверждена на ВВМ 960.

В 34 случаях определена чувствительность к Н методом абсолютных концентраций на Левенштейна-Йенсена, в 32 случаях чувствительность подтверждена, а 2 -х - не подтверждена ВВМ 960.

Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к изониазиду на тест-системе ВВМ 960

составили, соответственно 97,7% и 91,4%, эффективность теста – 96,6%. В 56 случаях была определена устойчивость к R методом абсолютных концентраций на Левенштейна-Йенсена и в 54 случаях устойчивость подтверждена на тест-системе VBM 960.

В 2 –х случаях устойчивость к R не подтверждена на MGIT. В 63 случаях определена чувствительность к R методом абсолютных концентраций на с Л-Й и в 61 случае чувствительность подтверждена на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960. В 2 –х случаях устойчивость не подтверждена на MGIT. Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к R на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960 составили, соответственно 96,4% и 96,8%, эффективность теста – 96,6%. Также в 50 случаях была определена устойчивость к этамбутолу (E) методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и в 43 случаях устойчивость подтверждена на VBM 960. В 7 случаях устойчивость к E не подтверждена на MGIT. В 81 случае определена чувствительность к E методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и в 74 случаях чувствительность подтверждена на тест-системе VBM 960. В 7 случаях чувствительность не подтверждена на MGIT.

Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к E на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960 составили, соответственно 86% и 91,3%, эффективность теста – 89,3%.

В 87 случаях была определена устойчивость к стрептомицину (S) методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена и в 86 случаях устойчивость подтверждена на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960. В 1 случае устойчивость к S не подтверждена на MGIT. В 29 случаях определена чувствительность к S методом абсолютных концентраций на питательной средой Левенштейна-Йенсена и в 30 случаях чувствительность подтверждена на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960. В 1 случае чувствительность не подтверждена на среде Левенштейна-Йенсена. Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к S на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960 составили, соответственно 98,8 и 103,4%, эффективность теста – 100%.

В 55 случаях была определена устойчивость к HR-комплексу ПТП, как множественная устойчивость, методом абсолютных концентраций на питательной с Л-Й и в 48 случаях МЛУ подтверждена на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960. В 7 случае МЛУ не подтверждена на MGIT. В 56 случаях определена чувствительность к МЛУ методом абсолютных концентраций на питательной с Л-Й и в 52 случаях чувствительность к HR-комплексу подтверждена на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960. В 4 случае чувствительность к HR-комплексу не подтверждена на MGIT. Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к HR-комплексу на тест-системе VDBASTЕСMGIT 960 составили, соответственно 87,3% и 92,9%, эффективность теста – 90,1%.

На определение лекарственной чувствительности МТ унифицированным методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах затрачивается 3-4 недели, на жидких средах данный тест длится, в среднем, 6,8 суток. Окончательный результат тестов на чувствительность МБТ с учетом детекции на автоматизированной системе клиницисты получают, примерно, на 21 сутки, а при использовании традиционных методов, более чем через 2 месяца.

Таким образом, тесты на лекарственную чувствительность МТ на диагностической тест-системе VDBASTECMGIT 960 имеют высокую чувствительность (86-97,7%), специфичность (91,3-103,4%) и эффективность (89,3 -100%), а также существенно сокращается время исследования (1 неделя и 3-4 недели, соответственно) по сравнению с исследованием на плотных питательных средах.

В основе тест-систем GenoType® MTBDRplus, производства HainLifescienceGmbH, Negren, Germany лежит ПЦР. Тест-система основана на уникальной DNA•Strip® технологии (гибридизация с ДНК-зондами) и позволяет проведение молекулярно-генетической идентификации комплекса МБТ и его устойчивости к рифампицину (RIF) и/или изониазиду (INH) в культивированных образцах или в положительных клинических образцах мокроты. Проведение ТЛЧ к рифампицину возможно при детекции наиболее значимых мутаций гена *rpoB*, (кодирующего бета субъединицу РНК полимеразы). Для определения высокого уровня устойчивости к изониазиду, исследуют ген *katG*, (кодирующий каталазу пироксидазу) и для определения низкого уровня устойчивости к изониазиду, изучается область промотора в гене *inhA* (кодирующего NADH эноил АСР редуктазы). Быстрое получение окончательного результата (минимум через 4-6 часов и максимум в течение 2- рабочих дней) является главным преимуществом данной тест-системы.

Из исследованных 568 образцов положительный результат был получен в 344 случаях (61%), отрицательные результаты выявлены в 188 (33%) и 36 (6%) анализов были с не интерпретируемыми результатами. Суммарная доля штаммов с различными видами устойчивости составила 67%, среди которых 38% были штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ).

Заслуживает внимания факт низкого выявления штаммов с монорезистентностью к рифампицину – 2%, что совпадает с результатами тестирования лекарственной чувствительности M.Tuberculosis традиционными методами. Так по данным РРЛ за последние десять лет, при проведении ТЛЧ методом пропорций на среде Левенштейна-Йенсена доля монорезистентных к рифампицину штаммов составила менее 2%. Такие данные важны с точки зрения более широкого использования молекулярно-генетических методов определения резистентности МБТ для раннего назначения соответствующих схем лечения.

При проведении теста у 1% штаммов M.Tuberculosis, при наличии ДНК, резистентность не детерминирована. То, что доля отрицательных

результатов составила 33%, скорее всего, является свидетельством того, что при назначении данной тест-системы клиницистами не проводится оценка рисков.

Клинические образцы от подозреваемых на туберкулез тестировались при помощи Хайн теста (версия 2), а также традиционными методами на среде Левенштейна-Йенсена и в жидкой среде MGIT/ВАСТЕС 960. Было взято 1626 образцов мокроты, 230 образцов плевральной жидкости, 29 образцов гноя, 25 образцов спинномозговой жидкости и 10 образцов асцитической жидкости. В исследование включались как ранее не леченные пациенты (новые случаи), так и пациенты с предшествующей историей лечения (повторные случаи). Новые случаи составили 1624 (84,6%), тогда как больных с предшествующей историей ТБ лечения было обследовано 296 (15,4%).

Как показал анализ, из 1920 пациентов 1478 (77%) составляли мужчины, средний возраст составил 38,3 лет. 442 (23%) составляли женщины со средним возрастом 28,9 лет. Культуральное исследование всех 1920 образцов дало положительные результаты на рост комплекса МТу 1689(88%) пациентов. Образцы от 154(8%) пациентов оказались отрицательными, а у 77(4%) пациентов культуры были контаминированы.

Результаты ТЛЧ на с Л-Й были получены для всех 1689 пациентов с положительной культурой на GenoType MTBDR plus (Тест Хайна). По итогам, большинство пациентов получили интерпретабельные результаты Хайн теста по сравнению с культурой (95% по сравнению с 88%, p -value<0.01). Среди 154 пациентов с отрицательной культурой, 110 (71.43 %) получили положительный результат теста Хайна, из 77 контаминированных образцов 55 (81 %) также имели положительный результат теста Хайна. Вторая версия теста Хайна дала положительные результаты для 561 (29%) клинического образца с отрицательным результатом микроскопии мазка (p -value 0.012). Среднее время получения результатов ТЛЧ с момента забора материала составило 71 день (от 21 до 148 дней). Для сравнения, среднее время получения результатов Хайн теста составило 6 дней (от 1 до 13 дней). Из 1843 образцов с положительными результатами Хайн теста, 1077 (58%) оказались МЛУ, 72 (3,9%) показали устойчивость к рифампицину, 215 (12,1 %) были устойчивы к изониазиду и чувствительны к рифампицину, и 479 (26%) были чувствительны к обоим препаратам.

Все образцы, имевшие положительный результат по культуре (1678 изолятов), были протестированы на лекарственную чувствительность на твердой среде Левенштейна-Йенсена и жидкой среде ВАСТЕС/MGIT 960. Из них 916 (54.6%) показали устойчивость одновременно к изониазиду и рифампицину, то есть являлись множественно-лекарственно устойчивыми (МЛУ); 67 изолятов (4%) оказались устойчивыми только к рифампицину и чувствительными к изониазиду; 343 (20,4%) были устойчивы к изониазиду и чувствительны к рифампицину и наконец, 352 (21%) показали чувствительность к обоим препаратам.

Для определения частоты основных мутаций в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, приводящих к устойчивости к рифампицину и изониазиду в изолятах МЛУ-МТБ анализу подверглись частота мутаций в локусе *rpoB*. Оценивались следующие зоны реакции: *rpoB*. Контроль Локуса *rpoB*; 8 проб дикого типа - *rpoB* проба дикого типа 1 (*rpoBWT1*), *rpoB* проба дикого типа 2 (*rpoBWT2*), *rpoB* проба дикого типа 3 (*rpoBWT3*), *rpoB* проба дикого типа 4 (*rpoBWT4*), *rpoB* проба дикого типа 5 (*rpoBWT5*), *rpoB* проба дикого типа 6 (*rpoBWT6*), *rpoB* проба дикого типа 7 (*rpoBWT7*), *rpoB* проба дикого типа 8 (*rpoBWT8*). Также оценивались мутантные пробы: мутантная проба 1 (*rpoBMUT1*), мутантная проба 2А (*rpoBMUT2A*), мутантная проба 2В (*rpoBMUT2B*) и мутантная проба 3 (*rpoBMUT3*).

Пробы дикого типа охватывают важнейшие участки устойчивости каждого гена. Если все пробы дикого типа одного гена показывают положительный сигнал, значит в нуклеотидной последовательности не зафиксировано ни одной мутации. Это свидетельствует о том, что тестируемый штамм чувствительный к антибиотикам.

Анализ мутаций будет касаться только тех 1678 образцов, которые имели результаты культурального исследования на лекарственную чувствительность одновременно с результатами Хайн теста. Из указанного количества образцов, протестированных методом GWH и показавших устойчивость к рифампицину, и изониазиду, подтверждение этих результатов тестированием на чувствительность культуральным методом, получили 916 (54.6 %). Вся устойчивость к рифампицину была подтверждена в 983 (58%) случаях, а вся устойчивость к изониазиду в 1259 (75%) случаев.

Устойчивость к рифампицину, возникшая в результате мутации S531L в гене *rpoB*, была обнаружена в 1169 (69.7%) случаев; она была самой распространенной (табл.5.2.1). Устойчивость, возникшая в результате мутаций H526Y, H526D, и D516V в том же гене была обнаружена в 59 (3.5%), 35 (2.1%) и 94 (5.6%) случаев соответственно.

Устойчивость к изониазиду, возникшая в результате мутации S315T в гене *katG* была обнаружена в 1457 (86.8%) случаев; возникшая в результате мутации C(-15)T в гене *inhA* – в 413 (24.6%); а в результате мутации T(-8)C гена *inhA* – в 15 (0.9%). Следовательно, самой распространенной мутацией, вызывающей устойчивость к рифампицину, оказалась *rpoBS531L* (1169 /69.7%), а самыми распространенными мутациями, дающими устойчивость к изониазиду, были S315T (1457/86.8%) в гене *katG* и C (-15) T (413/24.6%) в гене *inhA*.

Мутация S531L в гене *rpoB* встречалась в 1137 (82.3%) случаев у новых больных, а у ранее леченных - в всего в 167 (56.3%) случаев. Мутация S315T в гене *katG*, ответственная за устойчивость к изониазиду, у нелеченных больных встречалась в 1313 (95%) случаев, тогда как у повторных - в 223 (75.5%). Остальные мутации (*rpoBH526Y*, *rpoBH526D*, *rpoBD516V*, *inhAT* (-8)C показали следующие уровни соответственно: 28 (2.0%), 21 (1.5%), 94 (6.8%), 8 (0.6%) у нелеченных и 9 (3.0%), 3 (1.2%),

12(4.1%) и 4 (1.5%) у ранее леченных больных. По данным мутациям не было отмечено статистически значимых различий между новыми и повторными случаями.

Мутация S531L в гене *rpoB*, обеспечивающая устойчивость к рифампицину, была обнаружена в 69.7% всех случаев МЛУ-ТБ. Напротив, соотношение мутаций в кодонах 526 (2.1%) и 516 (5.6%) гена *rpoB* оказалось значительно ниже.

Мутация S315T в гене *katG* была обнаружена у 86.8% изолятов МЛУ-ТБ. Предполагается, что мутация S531T является ведущим фактором в возникновении устойчивости к изониазиду в клинической практике, при этом являясь благоприятной для микобактерий. Данная гипотеза совпадает как с моделью вирулентности на животных, так и с кластерными исследованиями молекулярной эпидемиологии.

Мутации, ответственные за формирование устойчивости к противотуберкулезным препаратам, в частности, *rpoBS531L* и *katGS315G* и S315T, были обнаружены в гораздо большей степени у ранее леченных случаев по сравнению с новыми.

Часто встречающимися сочетаниями мутаций в МЛУ-изолятах МТБ выделенных в КР были следующие сочетания: *rpoBS531L* + *katGS315T* (311/53.1%) и *rpoBS531L* + *katGS315T* + *inhAC(-15)T* (285/17.0%). Остальные сочетания встречались не чаще, чем в 4 % случаев. Сочетание *rpoBS531L* + *katGS315T* встречалось в 734 новых случаях (61.3%), тогда как в повторных случаях оно встречалось в 118 случаях (40 %).

При изучении сочетаний мутаций, наибольшие изменения нуклеотидов наблюдались в кодоне S531L гена *rpoB* и кодоне S315T гена *katG*. Это сочетание чаще наблюдалось у новых случаев. В данном исследовании у 87.4% ($n = 1201$) всех изолятов комбинации мутаций (там, где они были) включали в себя замену нуклеотидов в кодонах 531 (TCG→TTG), и фенотипическая лекарственная устойчивость к рифампицину имела высокую степень (минимальная ингибирующая концентрация (MIC) ≥ 100 $\mu\text{g/ml}$). Комбинации мутаций, включающие в себя мутацию S315T гена *katG* составили 97% ($n=1315$) всех сочетаний, включающих изониазид.

Распределение единичных мутаций между новыми и повторными случаями показало, что все типы основных мутаций преобладали среди новых случаев ТБ. Эти данные, показывающие, что трансмиссия происходит в большей степени между новыми случаями, могут означать, что некоторые мутации лекарственной устойчивости, в частности, *rpoBS531L* и *katGS315T*, являются полностью благоприятными для микобактерий туберкулеза.

Таким образом, результаты исследования показывают, что распределение мутаций лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* в Кыргызской Республике сходно с данными, приводимыми в публикациях по иным географическим регионам. Это имеет важное значение для отбора данных быстрых тестов генотипа и идентификации лекарственно-устойчивых случаев, что позволит улучшить ситуацию с лечением пациентов

с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза. Использование подобных тестов потребует постоянного наблюдения за местными типами профилей мутаций для определения принадлежности микобактерий к тому или иному генетическому семейству и их лекарственной устойчивости.

Исследование различий между новыми и повторными случаями показало, что все типы самых распространенных мутаций (*rpoBS531L* и *katGS315T*) чаще встречались среди пациентов, ранее не получавших лечение.

Зонды ДНК, используемые в тесте Genotype®MTBDR*plus* позволяют обнаружить большинство мутаций, ответственных за устойчивость к рифампицину, среди изолятов МТБ, выделенных в КР. Небольшой процент исследованных штаммов показал отсутствие сигнала дикого типа наряду с отсутствием сигнала мутации при фенотипической резистентности к рифампицину. Это свидетельствует о возможности существования не описанных ранее мутаций, ответственных за устойчивость к рифампицину, у штаммов МТБ, циркулирующих в стране. Требуется дальнейшие исследования, включающие секвенирование генома таких изолятов, которые позволят определить существование единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP, single nucleotide polymorphism), благодаря которым возникли мутации, обеспечившие устойчивость к рифампицину.

Наибольшее количество мутаций гена *rpoB* выявлено в пробах дикого типа *rpoBWT8* – 181. Мутации в данной дикой пробе сопровождались мутациями в *rpoBMUT3* в 155 случаях. И в 26 случаях мутации пробы не были сопряжены с изменением нуклеотидной последовательности мутантных проб. В 50 случаях тестируемые штаммы показали наличие мутации в *rpoBWT7*, в большинстве -35 образцов - не сопровождались наличием мутаций в *rpoBMUT* пробах. Также отмечены мутации в диких пробах: в *rpoBWT1* -1; *rpoBWT2* - 14; *rpoBWT3* -22; *rpoBWT4* – 17; *rpoBWT5* и *rpoBWT6* по 2 мутации.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что циркулирующий на территории КР штамм комплекса *M. Tuberculosis* имеет мутации гена в пробе дикого типа *rpoBWT8* – 181; в пробе мутантного типа *rpoBMUT3* – 159 и в 155 случаях данные мутации сопряжены между собой. В 290 случаях были выявлены штаммы с сохраненной чувствительностью к изониазиду (49%). Пробы дикого типа охватывают важнейшие участки устойчивости каждого гена. Если все пробы дикого типа одного гена показывают положительный сигнал, значит в нуклеотидной последовательности не зафиксировано ни одной мутации. Это свидетельствует о том, что тестируемый штамм чувствителен к антибиотикам. Наибольшее количество мутаций гена *katG* и *inhA* выявлено в пробах дикого типа *katGWT1 S315T* – 96. Мутации в данной дикой пробе сопровождались мутациями в *katGMUT1* в 57 случаях, с типом мутации *S315T1*. В наших исследованиях, определено наибольшее количество изменений нуклеотидной последовательности в пробе мутантного типа 21

случаях katGMUT2 - S315T2. Мутации в гене inhA с исследованными положениями аминокислот в inhAWT1 выявлены в 36 случаях и в inhAWT2 в 5. Замена C15T в гене inhAMUT1 обнаружена в 27 штаммах, inhAMUT2 A16G - в 74, inhAMUT1 T8C - в 92, inhAMUT1 T8A- в 24 случаях.

Анализ Xpert®MTB/RIF, был проведен с образцами патологического материала у 5839 лиц с подозрением на ТБ из категории «Вновь выявленный случай» и 1377 лиц относились к категории «Ранее леченый». 244 образцов патологического материала были собраны и доставлены в лаборатории от лиц с подозрением на ТБ, у которых категория не была определена клиницистами. Из них в 107 случаях была выявлена ДНК МБТ. В то же время, количество отрицательных результатов тестирования (ДНК МБТ не выявлена) составило 4380 случаев - 61%, что является свидетельством того, что оценка рисков по МЛУ ТБ среди лиц с подозрением на туберкулез должна быть пересмотрена с целью более оптимального использования данного дорогостоящего исследования. У 2560 лиц ДНК МБТ была выявлена (ДНК МБТ+), т.е. лабораторный результат был положительный. Из них, в 956 случаях (37,3%) штамм *M.tuberculosis* имел мутации в гене *rpoB*, ведущих к развитию устойчивости к рифампицину (устойчивый к рифампицину). Если по результатам XpertMTB/RIF выявлен ТБ с устойчивостью к рифампицину, то таким пациентам должно быть начато лечение от лекарственно-устойчивого ТБ, в то время как дополнительные образцы мокроты должны быть отправлены на культуральное подтверждение и должен быть проведен ТЛЧ к ПТП 1-го и 2-го ряда. В 1604 случаях выявлена ДНК МБТ без мутаций в *rpoB* гене, что свидетельствует о чувствительности штамма *M.Tuberculosis* к рифампицину, что составило 62,7% от общего числа положительных результатов теста.

Первичная изоляция МТВС на плотных и жидких средах проведена в 782 случаях. Идентификация МТВС проводили при помощи экспресс тестов SDBIOLINETBAgMPT 64 Rapid (SDdiagnostic, SouthKorea). В 716 случаях из 782 был выявлен рост МТВС (91,5%). Нетуберкулезные микобактерии выросли в 6 случаях, что составило менее 1%. В 42 случаях из 782 (5,3%) были получены отрицательные результаты первичной изоляции МТВС по сравнению с XpertMTB/RIF. Данный факт, по-видимому связан тем, что исследования в некоторых случаях проводили из разнотипного образца мокроты.

Для определения чувствительности и специфичности теста XpertMTB/RIF был проведен посев на плотные и жидкие среды для первичной изоляции МТВС. Данные, полученные в ходе внедрения нового, быстрого метода выявления ТБ и определения резистентности к рифампицину в условиях КР позволяют сделать следующее заключение: применение теста XpertMTB/RIF подтверждает его более высокую чувствительность по сравнению с прямой микроскопией мазка мокроты.

Платформа CeneXpert должна устанавливаться в наиболее доступных для пациента уровнях ЛПО. В ходе дальнейшего расширения использования вышеуказанного метода необходимо придерживаться строгого отбора

пациентов с подозрением на ТБ, с особым вниманием на оценку рисков по МЛУ ТБ, учитывая его стоимость.

Также, можно сказать, что тест XpertMTB/RIF демонстрирует высокую способность выявлять ДНК МТВС как из легочных, так и из внелегочных образцов. Для получения достоверного и качественного результата необходимо повышать требования к сбору патологического материала,

Высокая чувствительность и высокая специфичность для XpertMTB/RIF при обнаружении устойчивости к рифампицину означает, что данный метод может быть использован в качестве начального диагностического теста для определения устойчивости к рифампицину.

В 32 образцах мокроты, где был выявлен рост *M. Tuberculosis*, выявили 100% чувствительность теста XpertMTB/RIF. В 44 случаях, в мазках с отрицательным результатом мокроты по микроскопии, чувствительность теста составила 81% (21/26) и специфичность – 89% (16/18).

Таким образом, данные наших исследований, констатируют высокую чувствительность теста XpertMTB/RIF, что подтверждено результатами культурального исследования, который до сих пор остается «золотым стандартом» в диагностике туберкулеза. Данный тест можно шире использовать во фтизиатрической практике в лабораториях, к которым не предъявляются строгие требования по биологической безопасности, для улучшения доступа пациентов к современным методам диагностики заболевания и улучшения мер инфекционного контроля при туберкулезе.

В главе шестой «Сравнительная оценка современных и традиционных методов диагностики нетуберкулезных микобактерий и их лекарственной чувствительности» дана оценка современным и традиционным методам диагностики нетуберкулезных микобактерий и их лекарственной чувствительности. Для сравнения эффективности выделения микобактерий образцы клинического материала были посеяны на три различные питательные среды: яичную среду Левенштейна-Йенсена (Л-Й), жидкую среду Миддлбрука 7Н9 в автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 960 (МГИТ 960) и на чашки с агаровой средой Миддлбрук 7Н11, разделенные на 2 сектора: с антибиотиками/без антибиотиков (с антибиотиками – 7Н11 селективный агар – для подавления роста посторонней микрофлоры и получения чистой культуры микобактерий, без антибиотиков – для выделения штаммов микобактерий, рост которых могут ингибировать антибиотики).

Из проведенных 2029 посевов, было выделено 227 (10,2%) культур микобактерий, из них 41 (18,1%) были нетуберкулезными микобактериями (НТМ): *M.AC* – 17 культур, *M.kansasii* – 8 культур, *M.xenopi* – 6 культур, *M.fortuitum* – 10 культур., а 186 культур (82,3%) отнесено *M. Tuberculosis complex* (МТС). Автоматизированная система ВАСТЕСМГИТ 960 более эффективна в выделении микобактерий, чем плотные питательные среды. Из 186 культур МБТ, выделенных на всех трех средах, 90,9% было получено на жидкой питательной среде. На среде 7Н11

процент выделения был 85,5%, а на Л-Й – только 45,7%. Что касается НТМ, то большинство культур было также получено на жидкой питательной среде (ВАСТЕСМГИТ 960) – 85,4% и на плотной агаровой 7Н11 80,5%, в то время, как на среде Л-Й было выделено только 58,5% НТМ.

Установлено, что в большинстве случаев микобактерии (как МБТ, так и НТМ) выделяли на двух (чаще 7Н9 и 7Н11) – МБТ – 74 (39,8%), НТМ – 10(24,4%) и всех трех средах – МБТ – 71 (38,3%) и НТМ – 18 (43,9%) и лишь в единичных случаях только на одной среде: Л-Й – 3 (1,6%) и 1 (2,4%); 7Н9 – 17 (9,2%) и 4 (9,7%); 7Н11 – 10 (5,4%) и 2 (4,9%) соответственно. Обнаружение роста в системе ВАСТЕСМГИТ 960 в среднем происходит на 1-2 недели раньше, чем на агаровой среде Миддлбрук 7Н11 и на 2-3 недели раньше, чем на яичной Л-Й и составляет 13 дней, по сравнению с 21 днем на среде 7Н11 и 29 днями на среде Л-Й. Таким образом, время, которое требуется для изоляции культуры микобактерий на жидкой питательной и проведения биохимических тестов для ее идентификации, примерно такое же, как и для выделения микобактерий на плотных питательных средах.

Контаминация среды Левенштейна -Йенсена была самой высокой (11,2%), в то время как самой низкой была контаминация среды 7Н11 (5,3%), 7,2% образцов было контаминировано в среде 7Н9. Из проведенного исследования, очевидно, что ни на одной из питательных сред невозможно выделить из клинических образцов 100% культур микобактерий.

При использовании системы ВАСТЕСМГИТ 960 достигается увеличение частоты выделения культур микобактерий на 20% и более в сравнении с обычными плотными средами (в частности Л-Й), при этом средний период определения роста составляет 8-14 дней в сравнении с 3-5 неделями на плотных средах. Высокая эффективность системы ВАСТЕСМГИТ 960 обусловлена использованием жидкой среды, которая достоверно превосходит плотную в отношении частоты выявления микобактерий и сроков детекции.

Вместе с тем, благодаря простому химическому составу агаровая среда Миддлбрук 7Н11 менее подвергается контаминации, а наличие в ее составе гидролизата казеина обеспечивает рост штаммов, наиболее требовательных к условиям культивирования, что объясняет рост на ней дополнительно около 10% клинически значимых штаммов микобактерий. Дополнение среды 7Н11 к ВАСТЕСМГИТ 960 обеспечивает более полное выделение микобактерий и дает возможность изучения морфологии и чистоты полученных культур.

Всего в Централизованной микробиологической лаборатории, с января 2009г. по май 2012г. включительно, было выполнено 145766 посевов, выделено 11748 (93,4%) культур микобактерий, из них к *M.tuberculosis complex* отнесено 11139 (94,8%) культур и 609 – к НТМ, что составило 5,2%.

Полученные культуры кислотоустойчивых (по данным микроскопии) микроорганизмов на плотных питательных средах по культурально-морфологическим свойствам, скорости роста, пигментообразованию, а также по способности роста на среде с салициловым натрием предварительно

делили на 2 группы: *M. tuberculosis complex* и НТМ. Культуры нетуберкулезных микобактерий идентифицировали по способности роста при разных температурах и биохимическим свойствам (способность к восстановлению нитратов, теллурита калия, гидролиз твина-80, амидазная, арилсульфатазная, каталазная активность, и др.).

Число выделенных микобактерий за период 2009-2012 гг., изменялось мало (2009 г. – всего 3468 (9,1%) – МБТ – 3366 (97,1%) НТМ – 102 (2,9%); 2010 г. – всего 3350 (8,2%) – МБТ – 3239 (96,7%) НТМ – 111 (%); 2011 г. – всего 3689 (8,4%) – МБТ – 3436 (93,1%) НТМ - 253 (6,9%); за шесть месяцев 2012 г. – всего 1850 (8,2%) – МБТ – 1707 (92,3%) НТМ – 143 (7,7%)). Количество выделенных НТМ, начиная с 2010 г. увеличилось, а МБТ – уменьшилось (за счет идентификации части из них как нетуберкулезных).

Низкий показатель выделения НТМ в начале работы по идентификации (конец 2009, начало 2010 годов) был связан с отсутствием необходимых навыков у врачей-бактериологов из-за того, что организация данного вида исследований только начиналась. Не все выделенные культуры НТМ идентифицировали до вида, часть культур, полученных на жидких питательных средах, после дифференциации от микобактерий туберкулезного комплекса (без определения вида), не учитывали.

При анализе частоты обнаружения микобактерий в разные годы, можно было отметить, что общее количество выделенных микобактерий в последние 2 года существенно увеличилось, в основном за счет НТМ (2009 г. - всего 123, из них НТМ – 102 культуры, 2010- 150 и 111 соответственно, 2011 – 382 и 253 соответственно, 6 месяцев 2012 года – 186 и 143 соответственно), число МБТ также несколько увеличилось, благодаря более точной их идентификации.

Две трети выделенных НТМ относились к медленно растущим (по классификации Раньона), среди них основными были *MAC*, *M.kansasii* и *M.xenopi*, а среди быстрорастущих *M.fortuitum*; на долю других видов пришлось около 10%. Затем по частоте выделения следовали *M. kansasii*, которые обнаруживали только у больных с легочной патологией, и *M. xenopi*. У двоих больных *M. xenopi* были обнаружены в операционном материале, что может служить подтверждением постановки диагноза микобактериоза.

232 культуры микобактерий, поступивших на идентификацию как нетуберкулезные (по признакам первичной предварительной дифференциации) были отнесены к *M. tuberculosis*. Причинами ошибочной их дифференциации как НТМ было изменение морфологии колоний культур МБТ, выросших на среде Л-Й, выделенных от больных длительно получавших противотуберкулезную терапию.

На жидкой питательной среде ошибочно дифференцированы как НТМ были контаминированные культуры МБТ или содержащие смеси культур (МБТ + *M. fortuitum*, МБТ + *MAC*). При наличии контаминации МБТ изменяют морфологию клеток и не проявляют корд-фактор в виде характерных «кос» при микроскопии мазка.

Таким образом, при анализе частоты выделения НТМ на разных питательных средах сделано заключение о том, что более полное обнаружение происходит при одновременном использовании жидкой и плотной питательных сред (по данным настоящего исследования оптимальным для выделения НТМ является использование комбинации сред 7Н9 и 7Н11). Посевы на среду Миддлбрука 7Н9 в автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 960 наиболее эффективны в выделении как МБТ, так и НТМ. Следует подчеркнуть, что при использовании системы ВАСТЕСМГИТ 960 достигается увеличение частоты выделения культур микобактерий на 20% и более в сравнении с обычными плотными средами (в частности Л-Й), при этом средний период детекции роста составляет 8-14 дней в сравнении с 3-5 неделями на плотных средах. А дополнительное одновременное использование еще и плотной питательной среды повышает эффективность выделения микобактерий, в среднем еще на 10%.

Использование чашек с агаровой средой 7Н11 также позволяет получать культуры микобактерий в случаях обильного роста контаминантов, обнаруживать смешанные культуры и изучать их морфологию.

По данным исследований 2/3 выделенных культур микобактерий были медленно растущими НТМ (классификация Раньона), среди них основными были *MAC*, *M. kansasii* и *M. xenopi*, а среди быстрорастущих *M. fortuitum*.

На основе метода определения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена *hsp65* для идентификации видов нетуберкулезных микобактерий и дифференциации их от *M. tuberculosis complex* в центре была разработана тест-система «MAIS-диф». Идентификация микобактерий с её помощью проста, воспроизводима, для проведения исследования необходимо оборудование, которым оснащена любая диагностическая ПЦР-лаборатория. Данная тест-система предназначена для идентификации *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. Scrofulaceum* и дифференциации этих видов от *M. Tuberculosis complex* в течение 24 часов, но при этом с её помощью можно определить вид и некоторых других представителей рода *Mycobacterium*

С использованием тест-системы «MAIS-диф» были исследованы 319 культур кислотоустойчивых микобактерий, выделенных на плотных питательных средах Левенштейна-Йенсена и Middlebrook 7Н11 в Централизованной бактериологической лаборатории (ЦБЛ) МНПЦБТ. Полученные данные свидетельствуют, о совпадении распределения по частотам выявления для обоих методов исследования для клинически значимых видов микобактерий. Чаще выделяли культуры *MAC*, *M. fortuitum*/*M. chelonae*, *M. Tuberculosis complex*, *M. kansasii*, *M. xenopi*/*M. Gordonae*. Полученный процент совпадений (91,22%) отражает специфичность этого способа идентификации микобактерий и совпадает со специфичностью, заявленной авторами тест-системы «MAIS-диф».

Чипы «IMS-7» были разработаны в Институте молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта РАН при участии сотрудников МНПЦБТ. Биочипы «IMS-7» предназначены для идентификации *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M.*

avium, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. fortuitum* – по данным литературы и исследований, выполненных в МНПЦБТ, наиболее часто определяемых в диагностическом материале видов микобактерий.

С помощью биологических чипов «IMS-7» было исследовано 180 культур кислотоустойчивых микобактерий, выделенных на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена и плотной агаровой среде Middlebrook 7H11, из биологического материала больных с подозрением на микобактериальную инфекцию.

Исходя, из наших данных можно сказать, что для экспериментальной версии биочипов был получен достаточно высокий процент совпадения (87,22%). В анализ несовпадений не были включены результаты идентификации *M. Xenopi* (n=32) и *M. flavescens* (n=4), так как биочипы «IMS-7» не предназначены для определения этих видов микобактерий, исходя из чего отрицательный результат идентификации последних подтверждает специфичность этой методики.

В группе микобактерий, вид которых определить не удалось, были 10 культур, идентифицированных классическими методами как МАС. Было установлено, что 3 из них – *M. asiaticum*, а оставшиеся 7 – различные подвиды *M. avium* spp., для которых на этой версии чипа нет специфичных зондов, поэтому и был получен отрицательный результат идентификации. Также было проведено секвенирование 3 культур, идентифицированных «IMS-7», как *M. marinum*, так как микробиологическими методами не было выявлено ни одного представителя этого вида.

Оказалось, что эти культуры относятся к *M. intracellulare*, а ошибочная идентификация произошла из-за 100% идентичности анализируемой последовательности, что требует внести дополнительные олигонуклеотидные зонды на биочип «IMS-7». При секвенировании 3 культур *M. scrofulaceum* (по данным микробиологической идентификации), было показано, что одна из них – *M. gordonae*, что совпало с данными полученными с помощью «IMS-7». Также, как и для метода ПДРФ, были определенные сложности при идентификации смешанных культур, так как на данный момент экспериментальная версия биочипов «IMS-7» не предназначена для идентификации сразу нескольких видов микобактерий, представленных в одной культуре, что в свою очередь увеличивает процент несовпадений результатов идентификации.

Таким образом, испытанные в Московском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом молекулярно-генетические методы показали высокую информативность при идентификации нетуберкулезных микобактерий. Был определен большой процент совпадений их результатов с данными, полученными микробиологическими методами. При этом необходимо подчеркнуть, что наиболее перспективным является использование биологических микрочипов, т.к. этот метод является стандартным и автоматизированным, однако необходимо увеличить спектр нетуберкулезных микобактерий, идентифицируемых этим методом (добавить

на чип олигонуклеотидные зонды для детекции таких широко распространенных видов, как *M. chelonae*/*M. abscessus*, *M. xenopi*, *M. simiae* и др.).

В главе семь «Эпидемиологический надзор за туберкулезом» дана оценка противотуберкулезных программ и их влияние на заболеваемость. В связи со сложившейся неблагоприятной ситуацией по туберкулезу в республике были приняты ряд безотлагательных мер по стабилизации распространения туберкулезной инфекции среди населения. Были разработаны и внедрены: Приказ Министерства здравоохранения Кыргызской Республики № 285 от 30.08.2000 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию противотуберкулезной помощи населению Кыргызской Республики», где сроки и контингенты для флюорографического обследования остались прежними, но наблюдение за рентген положительными лицами было передано участковой сети поликлиник. В постановке туберкулиновых проб были определены критерии, по которым проводилась диагностика.

Разработаны и внедрены национальные программы «Туберкулез - 1,2,3,4», и при содействии ВОЗ начато внедрение стратегии Directly Observed Treatment, Short-course. В 2004 году в рамках реализации гранта Глобального фонда по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией начато внедрение программы по лечению лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, при содействии Международного Комитета Красного Креста и Миссии «Врачи без границ» начато лечение больных туберкулезом в пенитенциарном секторе КР.

В результате принятых мер и внедрения международных рекомендаций по борьбе с туберкулезом была улучшена инфраструктура, кадровые ресурсы и нормативная база, повысилось качество диагностики и лечение больных туберкулезом, уменьшился резервуар туберкулезной инфекции, снизились уровни заболеваемости и смертности от туберкулеза среди населения. Так, к 2016 г. Показатель заболеваемости туберкулезом был снижен до 91,3 смертности до 5,6 и распространенности до 170,3 против 192,4, 27,0 и 363,8 соответственно в 2000 г. (Рис. 4).

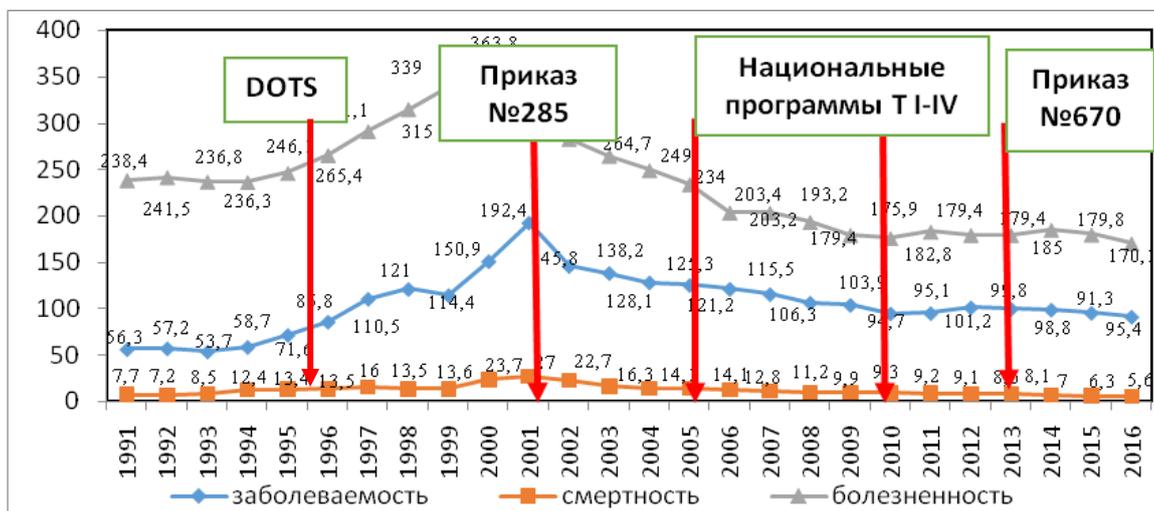


Рис. 4. Многолетняя динамика заболеваемости, распространенности и смертности от туберкулеза в Кыргызской Республике за период 1994-2015 гг.

В последующем был разработан и внедрен: Приказ Министерства здравоохранения Кыргызской Республики № 670 от 27.11.2013 года «О мерах по совершенствованию противотуберкулезной помощи населению КР», выделяется раздел эпидемиологического надзора за туберкулезом и расписываются противоэпидемические мероприятия в очаге, а также рекомендуется использование автоматизированной системы.

Средние многолетние данные смертности, заболеваемости и распространенности туберкулеза за 10 лет (1996 - 2005 гг.) действия противотуберкулезных программ составили 13,0; 131,2 и 291,7 соответственно. В последующие 11 лет (2006-2016 гг.) эти показатели были снижены на 36,2%, 26,5% и 36,7% составив 5,6, 85,4 и 170,3 соответственно. ВОЗ разработала масштабную глобальную стратегию на период после 2015 г. «Положить конец ТБ», которая была утверждена Всемирной ассамблеей здравоохранения. Основная цель этой стратегии – профилактика передачи и лекарственно-устойчивого ТБ за счет обеспечения всеобщего доступа к услугам по профилактике, диагностике и лечению ТБ и М/ШЛУ-ТБ. К 2020 г. должны быть достигнуты следующие цели, адаптированные из стратегии «Положить конец ТБ»: снижение смертности от ТБ на 35%; снижение заболеваемости ТБ на 25%; показатель успешности лечения больных МЛУ-ТБ на уровне как минимум - 75%. Как видим, у нас в республике эти цели уже достигнуты. Однако в течение последних лет наблюдается тенденция роста числа случаев туберкулеза с МЛУ-ТБ и ассоциация вируса иммунодефицита человека и туберкулеза. Количество пациентов с МЛУ-ТБ неуклонно растет ежегодно как в гражданском, так и в пенитенциарном секторе. Резистентные формы туберкулеза стали регистрироваться среди впервые выявленных больных. По данным Национальной референс лаборатории НЦФ, мультирезистентные штаммы микробактерий туберкулеза у впервые выявленных с 1997 по 2005 год лиц возросло с 8,8% до 20,2%, а среди ранее леченных больных с 30,9% до 63,2%. Поэтому, было разработано клиническое руководство по менеджменту лекарственно-устойчивого туберкулеза, в котором прописаны методики и алгоритмы выявления ЛУ-ТБ, принципы и схемы лечения больных.

Действующая система эпидемиологического надзора выполнила свои задачи на данный момент – добилась снижения смертности на 36,2%, заболеваемости на 26,5% и распространенности на 57,9% т.е. она выполнила задачи, поставленные программой ВОЗ «Стоп ТБ». Однако снизить уровень заболеваемости <50 на 100 тысяч населения, рекомендуемые ВОЗ как показатели низкой заболеваемости, не удалось. Кроме того, появились новые составляющие эпидемического процесса при туберкулезе: лекарственно устойчивый и СПИД ассоциированный туберкулез.

Таким образом, система эпидемиологического надзора выполняет поставленные на данный момент задачи: выявляет заболеваемость, реагирует на изменения в ходе эпидемического процесса, однако не отработан алгоритм действий по учету и отчетности за лекарственно устойчивым туберкулезом. В настоящее время эпидемический процесс при туберкулезе характеризуется появлением новых составляющих. Помимо типичного туберкулеза появился лекарственно устойчивый туберкулез и туберкулез в сочетании с ВИЧ инфекцией. Больные, относящиеся к этим группам, имеют более неблагоприятный прогноз. По данным исследователей более 50% этих больных погибают в первые годы после выявления в случае неполучения адекватного лечения, Кроме того их лечение вызывает большие трудности и значительные финансовые затраты. Особую группу составляют лица больные туберкулезом на фоне ВИЧ инфекции. В Республике число ЛУ форм туберкулеза и туберкулеза с ВИЧ инфекцией растет. Так, если в 2011 году среди впервые выявленных больных туберкулезом ЛУ ТБ составил 15,3%, то в 2016 г. удельный вес его вырос до 20,7%. Число больных туберкулезом среди ВИЧ инфицированных выросло с 153 в 2011 году до 210 в 2016 году. В среднем за анализируемые годы удельный вес МЛУ составил 15,6%, ШЛУ – 0,9%, а туберкулез среди ВИЧ инфицированных – 2,7%. Среди ЛУ больных туберкулезом МЛУ составляет- 80%, ШЛУ-4,9% и ВИЧ ассоциированный туберкулез – 14,2%.

Новая Программа «Туберкулез-V» на 2017-2021 годы предусматривает обеспечение раннего выявления туберкулеза в организациях здравоохранения путем повсеместного использования диагностического алгоритма для лиц с подозрением на туберкулез с тестированием XpertMTB/RIF и внедрение клинических протоколов по лечению внелегочного туберкулеза.

В результате улучшения выявления и лечения туберкулеза планируется добиться снижения уровня заболеваемости к 2021 году до 87,5 смертности 5,0 и долю вылеченных с лекарственной устойчивостью довести до 73%, вместо 93,4, 56,2 на 100000 населения и 56,2% в 2016 году.

В новой программе предусмотрена система мониторингования и оценки качества проводимых противотуберкулезных мероприятий. Если в 2017 году мониторинговыми визитами с целью контроля качества противотуберкулезной помощи населению в ЛПО было охвачено 78% от запланированных, то в ходе выполнения программы «Туберкулез-V» охват должен составить 100%, что несомненно скажется на качестве выполняемых мероприятий. Кроме того, усовершенствованная система учета и отчетности путем внедрения электронного регистра TS/TB-KG на всех уровнях оказания противотуберкулезной помощи населению позволит оценивать полноту и объем выполнения противотуберкулезных мероприятий.

В новой программе «Туберкулез-V» большое внимание уделяется улучшению взаимодействия с гражданским населением по вопросам

активного вовлечения организаций гражданского общества на борьбу с туберкулезом.

Таким образом, разработанная противотуберкулезная программа «Туберкулез-V» составляет основу эпидемиологического надзора за туберкулезом и должна устранить существующие слабые стороны противотуберкулезных мероприятий в республике:

1. Низкую выявляемость в ряде регионов (Нарынская, Баткенская области) тубинфицированных детей (высокий удельный вес сомнительных реакций пробы Манту – от 10 до 52,2%).

2. Низкую выявляемость ТБ методом флюорографии среди обследованных (Баткенская, Нарынская, области и г. Ош) (от 0,4 до 1,6 по КР 2,2 %) и микроскопическим методом (Иссык-Кульская 4,6, Нарынская – 4,9%, Баткенская – 5,2%, КР-6,8%).

3. Низкую доступность молекулярно-генетических экспресс методов диагностики ТБ и МЛУ ТБ.

4. Низкую эффективность лечения МЛУ ТБ (58,0%);

5. Низкий уровень адвокации, коммуникации и социальной мобилизации.

6. Дезинтегрированность ПМСП и ПТО.

7. Недостаточную психосоциальную помощь больным ТБ на амбулаторном этапе лечения.

Таким образом, для достижения рекомендаций ВОЗ по снижению уровня заболеваемости, распространенности и смертности туберкулеза, снижения передачи резистентных возбудителей. Необходимо своевременное выявление МЛУ, ШЛУ, запущенных форм туберкулеза и туберкулеза среди групп риска (контингент ГСИН и ВИЧ инфицированные) на основе внедрения современных молекулярных методов диагностики, увеличения охвата культуральными исследованиями и тестированием на лекарственную чувствительность, эффективное лечение, мониторинг и оценка противотуберкулезных мероприятий.

ВЫВОДЫ

1. Благодаря внедрению противотуберкулезных программ уровень заболеваемости снизился в 2 раза (170 и 91,3‰, 2001 и 2016 гг., соответственно) и установилась стабильная тенденция уровня заболеваемости. Однако, эпидемиологическая ситуация в республике остается неблагоприятной, т.к. добиться снижения заболеваемости <50 на 100 000 населения не удалось.
2. Высокие показатели заболеваемости населения ($91,3 \pm 0,005$), в том числе детей ($31,9 \pm 0,035$) и подростков ($85,4 \pm 0,063$), смертности ($5,6 \pm 0,011$), доли запущенных ($1,38 \pm 0,1\%$) и лекарственно устойчивых форм ($17,8 \pm 1,2\%$) туберкулеза, определяет высокое бремя туберкулеза в КР.
3. При использовании системы ВАСТЕСMGIT 960 достигается увеличение частоты выделения культур микобактерий на 20% и более в сравнении с

обычными плотными средами (в частности Л-Й). Время исследования на системе VASTESMGIT 960 существенно сокращается с 3-4 недель на первичную изоляцию МБТ на плотных средах до 6,8 суток в среднем, на жидких средах. Окончательный результат ТЛЧ МБТ на автоматизированной системе клиницисты получают на 21 сутки, а при использовании традиционных методов, более чем через 2 месяца.

4. Устойчивость к рифампицину, возникшая в результате мутации S531L в гене *groV*, была самой распространенной (n=1169, 69.7%)/ Устойчивость к изониазиду, возникшая в результате мутации S315T в гене *katG* была обнаружена в 1457 (86.8%) случаев.
5. Высокая чувствительность и высокая специфичность для XpertMTB/RIF при обнаружении устойчивости к рифампицину означает, что данный метод может быть использован в качестве начального диагностического теста для определения устойчивости к рифампицину, а в условиях низкой распространенности монорезистентности к рифампицину может служить маркером МЛУ ТБ.
6. Посевы на среду Миддлбука 7Н9 в автоматизированной системе VASTESMGIT 960 наиболее эффективны в выделении как МБТ, так и НТМ.
7. Изменение свойств возбудителя туберкулеза на современном этапе, привело к формированию МЛУ/ШЛУ и запущенных форм, которые сохраняют эпидемиологическое неблагополучие, и требует усовершенствования существующей системы эпидемиологического надзора, для своевременного выявления указанных форм и проведения противотуберкулезных мероприятий.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Использовать GenoType MTBDR plus тест для сокращения времени диагностики туберкулеза, определения устойчивости к рифампицину и изониазиду, что значительно ускорит назначение правильного курса лечения для пациентов.

Молекулярные методы диагностики позволяют также дифференцировать мутации, ответственные за высокую или низкую степень устойчивости к рифампицину и изониазиду. Данный факт позволяет разработать генетическую диагностику с определением терапевтических доз при лечении лекарственно-устойчивого туберкулеза. Филогенетический анализ вместе с изучением географического распределения позволит получить важные данные для эпидемиологического отслеживания распространения лекарственно-устойчивого туберкулеза в стране и регионе.

Исследование теста XpertMTB/RIF целесообразно включить в объем

диагностического минимума обследований для больных туберкулезом легких. Учитывая тот факт, что анализ можно проводить в лабораториях, к которым не предъявляются строгие требования по биологической безопасности, данный тест можно шире использовать во фтизиатрической практике с целью улучшения доступа пациентов к современным методам диагностики заболевания и улучшения мер инфекционного контроля при туберкулезе.

Использовать алгоритм по использованию XpertMTB/RIF на всех уровнях оказания медико-санитарной помощи с целью доступа лиц с подозрением на туберкулез к быстрым методам выявления.

Внедрить учет и регистрацию МЛУ/ШЛУ форм туберкулеза в Автоматизированную информационную систему (АИС) для своевременного проведения противоэпидемических мероприятий и вторичной, третичной профилактики.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Адамбекова, А. Д.** Нетуберкулезные микобактерии и их классификация [Текст] / А. Д. Адамбекова // Известия Вузов.- 2010. - №7.- С. 39 - 42.
2. **Адамбекова, А. Д.** Эпидемиология микобактериозов [Текст] / А. Д. Адамбекова // Известия Вузов.- 2010. - №7. - С. 30 - 33.
3. **Адамбекова, А. Д.** Внедрение системы Внешней оценки Качества (ВОК) микроскопических исследований в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Г. И. Калмамбетова // Наука и новые технологии. - 2011. - №9.- С. 45 - 49.
4. **Адамбекова, А. Д.** Выделение, идентификация микобактерий, диагностика микобактериозов [Текст] / А. Д. Адамбекова // Известия Вузов.- 2012.- №3 - С. 71 - 74.
5. **Адамбекова, А. Д.** Патогенность туберкулезных микобактерий, пути заражения [Текст] / А. Д. Адамбекова // Известия Вузов.- 2012. - №3.- С. 82 - 85.
6. **Адамбекова, А. Д.** Заболеваемость внелегочными формами туберкулеза в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Н. К. Мойдунова // Здоровоохранение Кыргызстана.- 2012. - №3 - 4 . - С. 8-9.
7. **Адамбекова, А. Д.** Тест GenoTypeMTB DRplus в лабораторной диагностике туберкулеза и его доступность в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков // Известия Вузов.- 2012. - №7.- С. 58 - 60.
8. **Адамбекова, А. Д.** XpertMTB / RIF-быстрый, автоматизированный тест амплификации нуклеиновых кислот и его применение в фтизиатрической практике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков // Известия Вузов.- 2012. - №7.- С. 45 - 48.

9. **Адамбекова, А. Д.** Совершенствование микробиологических методов диагностики туберкулеза [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, А.Ш. Алишеров // Медицина Кыргызстана.- 2013. - №3.- С. 14 - 16.
10. **Адамбекова, А. Д.** Абдоминальный туберкулез и применение теста XpertMTB / RIF [Текст] / А. Д. Адамбекова, Н. К. Мойдунова // Вестник КРСУ.- 2013.- Том 13, №11.- С. 25 - 28.
11. **Адамбекова, А. Д.** Внелегочной туберкулез – эпидемиологическая ситуация в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология.- 2013.- №2. - С. 49 - 52.
12. **Адамбекова, А. Д.** Применение теста XpertMTB /RIF-в лабораторной диагностике туберкулеза в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова // Вестник КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова .- 2013. - №2.- С. 281-283.
13. **Адамбекова, А. Д.** Эффективность ускоренного метода выявления и определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза [Текст] / А. Д. Адамбекова // Вестник КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова.- 2013. - №2.- С. 277 - 280.
14. **Адамбекова, А. Д.** Анализ XpertMTB / RIF для выявления *Mycobacterium tuberculosis* и определение резистентности к рифампицину и его сравнение с классическими методами выявления [Текст] / А. Д. Адамбекова, А. Ш. Алишеров.// Респираторная медицина .- 2013.- №1.- С. 55 - 59.
15. **Адамбекова, А. Д.** Характеристика мутаций гена *groV*, вызывающего развитие резистентности к рифампицину на территории Кыргызской Республики [Текст] / А. Д. Адамбекова // Вестник КРСУ.- 2013.- Том 13, №11.- С. 22 - 25.
16. **Адамбекова, А. Д.** Эффективность ускоренного метода выявления и определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам [Текст] / А. Д. Адамбекова, А. Ш. Алишеров, З. К. Гончарова, А. М. Мусаева. // Здоровоохранение Кыргызстана .- 2013. - №1.- С. 13 - 18.
17. **Адамбекова, А. Д.** Применение молекулярно-генетического исследования для идентификации комплекса *Mycobacterium tuberculosis* и определение его устойчивости [Текст] / А. Д. Адамбекова // Медицина Кыргызстана. - 2013.- №3.- С. 12 - 14.
18. **Адамбекова, А. Д.** Анализ XpertMTB / RIF в диагностике внелегочных форм туберкулеза в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, Г. И. Калмамбетова. // Вестник КГМА.- 2013.- №2. - С. 31 - 33.
19. **Адамбекова, А. Д.** Результаты внедрения XpertMTB /RIF для быстрой диагностики туберкулеза и определение резистентности к рифампицину, как маркера туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в Кыргызской Республике [Текст] /А. Д. Адамбекова // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология.-2013.- №2.- С. 53 - 56.

20. **Адамбекова, А. Д.** Мутации генов *inhA* и *katG*, вызывающих развитие резистентности к изониазиду и их характеристика [Текст] / А. Д. Адамбекова, А. Ш. Алишеров. // Респираторная медицина . – 2013 - №1.- С. 50 - 55.
21. **Адамбекова, А. Д.** Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, А. С. Кадыров. // В кн: Эффективность гигиенического контроля за состоянием окружающей среды и здоровьем населения в Кыргызстане. - Бишкек, 2013.– 290 с.
22. **Адамбекова, А. Д.** Анализ *XpertMTB / RIF* на основе автоматизированной полимеразно- цепной реакции в лабораторной диагностике туберкулеза [Текст] /А. Д. Адамбекова, А. Ш. Алишеров, Г. И. Калмамбетова. // Вестник КГМА .- 2013. - №3.- С. 5 - 8.
23. **Адамбекова, А. Д.** Распространенность туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью в Кыргызской Республике [Текст] /А. Д. Адамбекова, А. С. Кадыров, К.Т. Исманов // Медицина Кыргызстана. - 2014. - №6.- С. 25 - 28.
24. **Адамбекова, А. Д.** Тест *XpertMTB / RIF* для диагностики туберкулеза и устойчивости к рифампицину – результаты внедрения в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, В. И. Литвинов. // Туберкулез и болезни легких. - 2014. - №1.- С. 34 - 36.
25. **Адамбекова, А. Д.** Ультразвуковая диагностика плевритов туберкулезной этиологии [Текст] / А. Д. Адамбекова, Н. К. Мойдунова. // Известия Вузов. - 2013. - №3.- С. 76 - 78.
26. **Адамбекова, А. Д.** Роль ультразвукового исследования в диагностике туберкулезного перикардита [Текст] / А. Д. Адамбекова Н. К. Мойдунова. // Известия Вузов. - 2013. - №3.- С. 93 - 95.
27. **Адамбекова, А. Д.** Сравнительная характеристика теста *GenoTypeMTBDRplus* и традиционных методов диагностики *M. Tuberculosis* в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, А. С. Кадыров, Д. А. Адамбеков, В. И. Литвинов. // Гигиена, эпидемиология и иммунобиология.- 2015. - №2.- С. 50 - 56.
28. **Адамбекова, А. Д.** Quality assessment of AFB microscopy in tuberculosis laboratories in Kyrgyzstan [Текст] / А. Adambekova, A. Kadyrov, G.Kalmambetova. // 45th Union World Conference on Lung Health, Geneva. - 2014. - p. 31 - 33.
29. **Адамбекова, А. Д.** Сравнительная характеристика традиционных и современных молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза в Кыргызской Республике (монография) [Текст] / А. Д. Адамбекова // Бишкек. - 2015.- 235 с .
30. **Адамбекова, А. Д.** Результаты национального исследования по определению распространенности лекарственной устойчивости возбудителей туберкулеза в Кыргызстане [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, А. С. Кадыров // 90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси; Сб. статей. – Минск, 2015. – С. 20 - 25.

31. **Адамбекова, А. Д.** Внедрение теста XPERT MTB/RIF в Кыргызской Республике, результаты, уроки, дальнейшее развитие [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, А. С. Кадыров. // 90 лет в авангарде микробиологической науки Беларуси. Сб. статей. - Минск, 2015. – С.15 - 20.
32. **Адамбекова, А. Д.** Эпидемиологические аспекты туберкулеза в Кыргызской Республике (2011 - 2015 гг) [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, В. С. Тойгомбаева, А. С. Кадыров // Вестник КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова . - 2016. - №4. - С. 455 - 459.
33. **Адамбекова, А. Д.** Бремя туберкулеза в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков , В. С. Тойгомбаева, А. С. Кадыров // Вестник КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова . - 2017. - №1. - С. 286 - 289.
34. **Адамбекова, А. Д.** Частота встречаемости мутаций и их сочетаний в генах, ответственных за множественную лекарственную устойчивость M.TUBERCULOSIS в Кыргызской Республике при исследовании GENOTYPEMTBDR PLUS [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, А. С. Кадыров // Здоровоохранение. Минск, 2017. - №2. - С. 14 - 17.
35. **Адамбекова, А. Д.** Оценка эффективности алгоритма диагностики туберкулеза с использованием теста XPERT MTB/RIF в Кыргызской Республике [Текст] / А. Д. Адамбекова, Д. А. Адамбеков, А. С. Кадыров // Здоровоохранение. Минск, 2017. - №3.- С. 53 - 56.
36. **Адамбеков Д. А., Адамбекова А. Д., Кадыров А. С.** Имплементация теста XPERT MTB / RIF в Кыргызской Республике, результаты, уроки, дальнейшее развитие [Текст] / Д. А. Адамбеков, А. Д. Адамбекова, А. С. Кадыров // Theoretical & Applied Science. 2018. - № 6 (62). С. 52 - 55.
37. **Адамбеков Д. А., Адамбекова А. Д., Кадыров А. С.** Результаты национального исследования по определению распространённости лекарственной устойчивости в Кыргызстане [Текст] / Д. А. Адамбеков, А. Д. Адамбекова, А. С. Кадыров // Theoretical & Applied Science. 2018. - № 6 (62). С. 56 - 60.

Адамбекова Асель Доктурбековнанын «Кыргыз Республикасында дарылык-туруктуу кургак учуктун жогорку деңгээлде жайылуу шарттарында жана анын резистенттик формаларын заманбап молекулалык-генетикалык ыкма менен аныктоону колдонуунун натыйжалуулугу» темасындагы диссертациясынын 03.02.03 – микробиология жана 14.01.16 – фтизиатрия адистиктери боюнча медицина илидеринин доктору илимий даражасын изденип алуу үчүн жазылган диссертациясынын кысынча

КОРУТУНДУСУ

Негизги сөздөр: кургак учук, аныктоо ыкмалары, GenoTypeMTBDRplus жана XpertMTB/RIF молекулалык-генетикалык ыкмалар, эпидемиология.

Изилдөөнүн объектиси. Микобактерий микробунун нык азык заттарында өсүшүн, дары дармектерге болгон туруктуулугуна алып келүүчү өзгөргүчтүгүн, заманбап ыкмаларын натыйжасынын эффективдүүлүгүн жана республикадагы кургак учук оорусунун таралышы болуп эсептелинет.

Изилдөөнүнүн предмети. Калк арасындагы кургак учук оорусунун, таралышынын жана өлүм көрсөткүчтөрү, козгогучтун мутациясынын кездешүү жыштыгы жана алардын эски жана жаңы бейтаптар арасындагы бөлүштүрүлүшү, мындан тышкары изониазида, рифампицин, дигидрострептомицин сульфат, гидрохлорид этамбутол дарыларына сезгичтиги талдоого алынган.

Изилдөөнүн максаты: эпидемиологиялык көзөмөлдү жакшыртуу жана лабораториялык аныктоонун молекулалык генетикалык ыкмасын кийирүү жолу менен Кыргызстанда кургак учуктун дарылык туруктуу формасынын жайылуусун төмөндөтүү.

Изилдөөнүн ыкмалары. Автоматизациялоо системасынын жардамы аркылуу бактериологиялык ыкмасы (BASTECMGIT 960), полимердик чынжырлуу реакциясы жана гендик ыкмалар, дары дармектерге болгон туруктуулугун аныктоодо сериялуу бири бирине куюлчуу ыкмасы жана заманбап системасы GenoTypeMTBDRplus и XpertMTB/RIF.

Алынган жыйынтыктар жана алардын жаңылыгы. Кыргыз Республикасында жаш өспүрүмдөрдүн оорууга чалдыккандыгынын жогорку деңгээли (76,7%), эркек кишилердин чоң бөлүгү (73,8%), эпидемиялык процесске медициналык кызматкерлердин (211 учур), ЖАМКнын контингентинин (922 учур) жана АИВ чалдыккандардын (934 учур) катышуусу менен эпидемиологиялык кырсыктуулук сакталып келет. Жашоонун маанилүү бөлүгүн ээлеген жылдарга кургак учуктун түйшүгүнө туш келген жашташ алсыз топко активдүү эмгекке жөндөмдүү 20-50 жаштын ортосундагы адамдар киргендиги аныкталды. 2014-2015-жылдары кургак учуктун түйшүгүнүн экономикалык чыгымдарынын суммасы 7 464 230,4 АКШ долларын түздү.

BDBASTECMGIT 960 аныктоочу тест-система тыгыз азыктандыруучу чөйрөдөгү изилдөөлөр менен салыштырмалуу жогорку сезимдүүлүккө (86-97,7%), өзгөчөлөнгөндүгүнө (91,3-103,4%) жана натыйжалуулукка (89,3 - 100%) ээ, жана ошондой эле изилдөөнүн мөөнөтүн маанилүү деңгээлде кыскартат (1 жума жана тийиштүү түрдө 3-4 жума). Кыргыз Республикасында жайылган M. Tuberculosis комплексинин штаммы жапайы тибинин үлгүсүндө гендин мутациясына ээ.

Кургак учукка каршы дармектерге туруктуулукту өрчүтүүгө алып келген ТБ жана гендик мутациянын алгоритми иштелип чыгып, рифампицин жана изониазидке МБТнын резистенттигинин өрчүүсүнө жана кургак учукту аныктоо үчүн GenoTypeMTBDRplus жана XpertMTB/RIF молкулалык-

генетикалык ыкмаларын колдонууга алып келген гендердеги мутациялардын мүнөзү, өзгөчөлүгү изилденди.

Колдонуу чөйрөсү: фтизиатрия, микробиология, коомдук саламаттыкты сактоо.

РЕЗЮМЕ

диссертации Адамбековой Асель Доктурбековны на тему:
«Эффективность применения современных молекулярно-генетических методов диагностики M.Tuberculosis и резистентных форм в условиях высокой распространенности лекарственно-устойчивого туберкулеза в Кыргызской республике» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 03.02.03 – микробиология и 14.01.16 – фтизиатрия

Ключевые слова: туберкулез, методы диагностики, молекулярно генетические методы GenoTypeMTBDRplus и XpertMTB/RIF, эпидемиология.

Объект исследования: особенности микобактерий туберкулеза, культуральные свойства, изменчивость, приводящая к лекарственной резистентности, изучение диагностической эффективности современных методов диагностики туберкулеза, динамики заболеваемости туберкулезом в современных условиях.

Предметом исследования явились заболеваемость, распространенность, смертность от туберкулеза населения, частота встречаемости мутаций возбудителя и их распределение между старыми и новыми случаями пациентов, а также лекарственная чувствительность к изониазиду, рифампицину, дигидрострептомицину сульфату, этамбутолу гидрохлорида.

Цель исследования: Снижение распространенности лекарственно устойчивых форм туберкулеза в Кыргызстане, путем усовершенствования эпидемиологического надзора и внедрения молекулярно генетических методов лабораторной диагностики.

Методы исследования. Бактериологический метод, культуральный с помощью автоматизированных систем (ВАСТЕСМГИТ 960), методы полимеразной цепной реакции в различных модификациях, генодиагностика, определение лекарственной резистентности методом серийных разведений и с помощью современных систем GenoTypeMTBDRplus и XpertMTB/RIF.

Полученные результаты и их новизна. В Кыргызской Республике сохраняется эпидемиологическое неблагополучие по туберкулезу, с высоким уровнем заболеваемости подростков (76,7‰), долей мужчин (73,8%), вовлечением в эпидемический процесс медицинских работников (211 случаев), контингента ГСИН (922 случая) и ВИЧ инфицированных (934 случая). Наиболее уязвимой возрастной группой с высоким бременем туберкулеза от потенциально потерянных лет жизни являются лица активного работоспособного возраста 20-50 лет. Экономическое бремя от туберкулеза составило за 2014-2015 годы 7464230,4 долларов США.

Диагностическая тест-системе BDBASTЕСМГИТ 960 имеют высокую чувствительность (86-97,7%), специфичность (91,3-103,4%) и эффективность

(89,3 -100%), а также существенно сокращается время исследования (1 неделя и 3-4 недели, соответственно) по сравнению с исследованием на плотных питательных средах. Циркулирующий в Кыргызской Республике штамм комплекса M. Tuberculosis имеет мутации гена в пробе дикого типа.

Разработан алгоритм диагностики ТБ и генных мутаций, ведущих к развитию устойчивости к противотуберкулезным препаратам, изучен характер мутаций в генах, ведущих к развитию резистентности МБТ к рифампицину и изониазиду и применения молекулярно-генетических методов GenoTypeMTBDRplus и XpertMTB/RIF для диагностики туберкулеза,

Область применения: фтизиатрия, микробиология, общественное здравоохранение.

SUMMARY

of Adambekova Asel Dokturbekovna on the topic: "The effectiveness of modern molecular genetic methods of diagnosis of M. tuberculosis and resistant forms in conditions of high prevalence of drug-resistant tuberculosis in the Kyrgyz Republic" for the degree of Doctor of Medical Sciences in Social Sciences 03.02.03 - Microbiology and 14.01.16 - phthisiology

Key words: tuberculosis, diagnostic methods, molecular genetic methods GenoTypeMTBDRplus and XpertMTB / RIF, epidemiology.

Object of the research: samples of MB tuberculosis from patients morbidity, prevalence, mortality from tuberculosis population.

Aim of the research: to reduce the prevalence of drug-resistant forms of tuberculosis in Kyrgyzstan by improving epidemiological surveillance and introducing molecular genetic methods for laboratory diagnosis.

The results obtained and their novelty. In the Kyrgyz Republic, there is an epidemiological problem of tuberculosis, with a high incidence of adolescents (76.7% of patients), men (73.8%), involvement in the epidemic of medical workers (211 cases), a contingent of the GSIN (922 cases) and HIV-infected (934 cases). The most vulnerable age group with a high burden of tuberculosis from potentially lost life years are persons of active working age of 20-50 years. The economic burden of tuberculosis amounted to 7464230.4 US dollars for 2014-2015.

The diagnostic test system BDBACTECMGIT 960 has a high sensitivity (86-97.7%), specificity (91.3-103.4%) and efficacy (89.3-100%), and the study time (1 week and 3-4 weeks, respectively) compared with the study on dense nutrient media. Circulating in the KR strain of the M. tuberculosis complex has gene mutations in a wild-type sample.

An algorithm for the diagnosis of TB and gene mutations leading to the development of resistance to anti-TB drugs has been developed, the character of mutations in the genes leading to the development of MBT resistance to rifampicin

and isoniazid and the use of genetic methods GenoTypeMTBDRplus and XpertMTB / RIF for the diagnosis of tuberculosis.

Field of application: phthisiology, microbiology, public health.

Объем 3 уч. изд.л.

Тираж 40 экз.

**Отпечатано в типографии «Блиц»
г. Бишкек, ул. Байтик Баатыра 65 А**