

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ  
РЕСПУБЛИКИ  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ФТИЗИАТРИИ**

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

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

**Научные консультанты:**

Академик РАН, д.м.н.,  
профессор Литвинов В.И.  
д.м.н. Кадыров А.С.

**Бишкек – 2018**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА I. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИКО- ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОГО ТУБЕРКУЛЕЗА В МИРЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....	13
1.1. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в мире.....	13
1.2. Влияние изменения свойств возбудителя туберкулеза на эпидемический процесс и клиническое течение.....	24
1.3. Туберкулез и ВИЧ инфекция.....	30
1.4. Эволюция возможностей лабораторной диагностики туберкулеза....	35
1.4.1. Микроскопия мазка мокроты для выявления кислотоустойчивых бактерий (КУБ).....	36
1.4.2. Первичная изоляция штаммов M. Tuberculosis (культуральное исследование) .....	38
1.4.3. Определение лекарственной устойчивости и чувствительности к противотуберкулезным препаратам.....	40
1.5. Система эпидемиологического надзора за туберкулезом.....	45
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	52
2.1. Объекты и объемы исследований.....	52
2.2. Лабораторные методы исследования .....	52
2.3. Статистический анализ полученных данных.....	87
2.4. Соблюдение этических норм.....	87
ГЛАВА III. ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ.....	89
3.1. Оценка показателей заболеваемости, смертности и распространенности туберкулеза.....	90
3.2. Подверженность туберкулезом в зависимости от возраста, пола и контингента .....	97
ГЛАВА IV. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ТУБЕРКУЛЕЗА в КР по КЛИНИЧЕСКИМ ФОРМАМ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЗА ПЕРИОД 2000-2015гг.....	106
4.1. Выявляемость туберкулеза рутинными методами диагностики в Кыргызской республике.....	106
4.2. Запущенные формы туберкулеза.....	108
4.3. Лекарственно-устойчивый туберкулез.....	112
4.4. Оценка бремени туберкулеза в КР.....	115
ГЛАВА V. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОВРЕМЕННЫХ И ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА И ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ	122

5.1. Исследование на автоматизированной системе Bactec MGIT 960....	122
5.1.1. Сравнительная оценка эффективности автоматизированной системы BACTESMGIT 960 и среды Левенштейна-Йенсена при первичной изоляции <i>M. Tuberculosis</i> .....	122
5.1.2. Сравнительная оценка эффективности автоматизированной системы BDBACTESMGIT 960 и среды Левенштейна-Йенсена при определении лекарственной.....	125
5.2. Исследование на GenoTypeMTBDRplus (Хайн тест) .....	130
5.2.1. Идентификация комплекса МБТ и определение его устойчивости к рифампицину (RIF) и/или изониазиду (INH).....	131
5.2.2. Сравнительная оценка теста GenoTypeMTBDRplus (Хайн тест) и традиционных методов выявления туберкулеза .....	133
5.2.3. Сравнительная оценка теста GenoTypeMTBDRplus (Хайн тест) и традиционных методов в изучении лекарственной устойчивости .....	135
5.2.4. Определение частоты основных мутации в генах <i>rpoB</i> , <i>katG</i> и <i>inhA</i> , приводящих к устойчивости к рифампицину и изониазидув изолятах МЛУ-МТБ.....	137
5.3. Исследование на GeneXpertDxSystem (тест система XpertMTB / RIF) .....	147
5.3.1. Оценка эффективности исследования на XpertMTB/RIF и традиционными методами.....	152
ГЛАВА VI. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОВРЕМЕННЫХ И ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ И ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ.....	154
6.1. Сравнительная характеристика различных методов диагностики нетуберкулезных микобактерий .....	157
6.2. Идентификация нетуберкулезных микобактерий молекулярно-генетическими методами.....	166
ГЛАВА VII. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ТУБЕРКУЛЕЗОМ.....	174
7.1. Оценка противотуберкулезных программ и их влияние на заболеваемость.....	174
7.2. Особенности эпидемиологического надзора за туберкулезом на современном этапе.....	181
ВЫВОДЫ.....	185
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	187
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	188

## ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

DOTS	Directly Observed Treatment, Short-course
FIND	Foundation for Innovative New Diagnostics
GFATM	The Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria,
KfW	Kreditanstalt für Wiederaufbau, Немецкий Банк развития
KNCV	Royal Netherlands Tuberculosis Association
МБТ/МБТ	Mycobacterium Tuberculosis
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
RIF, INH	Рифампицин, изониазид
UNITAID	Глобальная инициатива поддержки здравоохранения
USAID	Агентство США по международному развитию
БББ	Бокс Биологической Безопасности
ВИЧ	Вирус Иммунодефицита Человека
ВОЗ	Всемирная Организация Здравоохранения
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФТСМ	Глобальный фонд борьбы с туберкулезом, СПИД и малярией
ГСИН	Государственная система исполнения наказания
КУБ	Кислотоустойчивые бактерии
КОЕ	Колония образующих единиц
МЛУ/ШЛУ-ТБ	ТБ с множественной/широкой лекарственной устойчивостью
МГМ	Молекулярно-генетические методы
НСК	Национальный статистический комитет
НТП	Национальная Туберкулезная Программа
НЦФ	Национальный центр фтизиатрии
ОМРЛ	Ошская Межрегиональная Референс Лаборатория
ОЦБТ	Областной Центр по Борьбе с Туберкулезом
ОПЦ	Отрицательная прогностическая ценность

ПМСП	Первичная медико-санитарная помощь
ППР/ПВР	Препараты первой/второй линии
РРЛ	Республиканская Референс Лаборатория
РРНД	Полипропилен высокой плотности
СВБТ	Страны с высоким бременем туберкулеза
ПТО	Противотуберкулезная организация
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ТЛЧ	Тестирование на лекарственную чувствительность
ЦТР	Целей тысячелетия в области развития
ЭН	Эпидемиологический надзор

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы диссертации.** Несмотря на определенные успехи, достигнутые во фтизиатрической практике, туберкулез остается угрозой для человечества. В 2012 году в мире было зарегистрировано 8,6 млн. случаев заболеваний туберкулезом и около 1,3 млн случаев со смертельным исходом. По данным ВОЗ, около трети населения планеты – два миллиарда человек – инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* и подвержены риску заражения. Тенденция роста заболеваемости сохраняется до настоящего времени. Согласно докладу Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) 2015 году во всем мире насчитывалось уже 10,4 миллионов новых случаев заболеваний туберкулёзом. 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, имеющие ВИЧ инфекцию было 1,2 млн. (11%). [1. Случаев смерти от туберкулеза данным ВОЗ в 2015 году было зафиксировано 1,4 млн, из которых 0,4 млн. больных были ВИЧинфицированы. [1, 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12].

В 2015 году в Кыргызской Республике зарегистрировано 5853 впервые выявленных больных туберкулезом – 98,2 на 100 тыс. населения, против 5898 в 2014 году(101,1). Однако несмотря на тенденцию снижения уровня заболеваемости ситуация осложняется распространением лекарственно-устойчивого туберкулеза и туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией [13, 14].

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) при поддержке CDC, Атланта, США, проекта ХОУП в Кыргызской Республике и Супра-Национальной референс лаборатории, г. Мюнхен, Германия, было выявлено, что бремя ТБ 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% [13].

Актуальность планируемых исследований определена тем фактом, что согласно отчетам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), Кыргызская Республика относится к одной из 27 стран в мире с высоким бременем туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (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 ТБ с множественной лекарственной устойчивостью.

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 *M. Tuberculosis*, так и генных мутаций, приводящих к развитию устойчивости к противотуберкулезным препаратам.

Применение вышеуказанных методов диагностики привело бы к сокращению пребывания, зачастую заразного ТБ больного в обществе и скорейшему началу его лечения и, что крайне важно для общественного здравоохранения, - прерыванию трансмиссии возбудителя.

Учитывая данные, предоставляемые Национальной противотуберкулезной программой о распространённости внелегочных форм туберкулеза и трудностей, связанных с его диагностикой и принимая во внимание факт, что молекулярно-генетические методы исследования обладают высокой чувствительностью и специфичностью, планируется тестирование образцов патологического материала внелегочной локализации вышеуказанными методами и сравнение полученных результатов с данными традиционных методов выявления [13].

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 [14]. ВОЗ рекомендует использование XpertMTB/RIF в качестве начального диагностического теста для лиц, с подозрением на МЛУ-ТБ или ВИЧ-ассоциированного туберкулеза [5].

В связи с актуальностью рассмотренных проблем для современной фтизиатрии, представленное нами диссертационное исследование посвящено изучению ряда вопросов, касающихся применения быстрых методов диагностики ТБ и устойчивых к основным противотуберкулезным препаратам форм, и их характеристика по сравнению с традиционными методами диагностики. Разработка эффективных, рациональных алгоритмов использования быстрых методов в сложившихся социально-экономических условиях с целью улучшения менеджмента ТБ больных.

**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 (2013г.).

**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 (ЭН).
2. Определить бремя болезни туберкулеза в КР 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 МТ в сравнении с классическими методами диагностики.
5. Определить характер мутаций в генах, ведущих к развитию резистентности МБТ к рифампицину, изониазиду на территории Кыргызской Республики.
6. Усовершенствовать систему ЭН за лекарственно устойчивыми формами туберкулеза.

### **Научная новизна полученных результатов:**

- Впервые проведена оценка эффективности реализации различных противотуберкулезных программ, системы ЭН и их влияние на эпидемический процесс при туберкулезе за период 1994-2016 гг
- Впервые определено бремя лекарственно-устойчивых и запущенных форм туберкулеза в КР. 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 МБТ к рифампицину и изониазиду на территории Кыргызской Республики.

- Разработана система ЭН за лекарственно устойчивыми формами туберкулеза для оптимизации контрольных и профилактических мероприятий (первичная, вторичная и третичная профилактика).
- Впервые в современных условиях КР, изучены применения молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза, таких как GenoTypeMTBDRplus и XpertMTB/RIF.
- Разработан алгоритм диагностики ТБ и генных мутаций, ведущих к развитию устойчивости к противотуберкулезным препаратам, который позволит повысить уровень выявления больных среди указанных заболеваний на первичном уровне здравоохранения.

#### **Практическая значимость полученных результатов.**

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

#### **Экономическая значимость полученных результатов.**

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 КР в целом.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Уровень заболеваемости, смертности и распространенности по туберкулезу в республике в результате реализации противотуберкулезных программ в 2015 г. снизились на 49,4%, 52,5% и 44,2% соответственно по сравнению с годами высокой заболеваемостью (2000-2001гг). Однако по критериям ВОЗ

- эпидемиологическая ситуация в стране является 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 сокращает время исследований.
  4. Изучение характера мутаций в генах, ведущих к развитию резистентности МБТ к рифампицину и изониазиду, поможет определить останутся ли мутации устойчивости в бактериальной популяции в отсутствие антимикробной терапии на территории Кыргызской Республики.
  5. Усовершенствование системы ЭН за туберкулезом с учетом лекарственно устойчивых форм позволит обеспечить раннее выявление лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, проведение адекватного и раннего лечения и своевременный учет случаев позволит проводить противотуберкулезные мероприятия, направленные на предупреждение дальнейшего распространения этих форм.

**Апробация диссертации.** 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 коцепции 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).

**Личный вклад соискателя.** Личное участие соискателя охватывает подбор, проработку литературных источников и все исследования по теме диссертации. Личный вклад автора заключается в обучении персонала, планировании, организации и непосредственном проведении диагностики туберкулеза с применением всех методов исследования.

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

**Внедрение в практику.** Результаты исследования внедрены в деятельность. Центров семейной медицины,НЦФ МЗ КР, а также в учебный процесс кафедры фтизиатрии КГМА им. И.К.Ахунбаева, кафедры фтизиопульмонологииКГМИПиПК.

**Опубликованность результатов.** По материалам диссертации опубликовано 37 научно-практических работ. Разработаны и опубликованы следующие документы: Национальный План развития противотуберкулезной лабораторной службы, Руководство по обслуживанию ТБ лабораторного оборудования, Стратегический План внедрения платформы GeneXpert.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на213 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.

## ГЛАВА I.

### ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И КЛИНИКО- ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОГО ТУБЕРКУЛЕЗА В МИРЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

#### 1.1. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в мире.

Туберкулез – это инфекционное заболевание, вызываемое возбудителем *Mycobacterium tuberculosis*, которое является как наиболее распространенным, так и наиболее изученным в мире [6-12,15-19]. В настоящее время туберкулез является одной из важнейших проблем общественного здравоохранения во всем мире и признан второй ведущей причиной смертности от инфекционного заболевания после вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Изменения в эпидемиологической ситуации по туберкулезу неразрывно связано с развитием учения о туберкулезе. В древние века каждый случай заболевания завершался летальным исходом, Средние века характеризуются длительными эпидемиями туберкулеза в Европе, Северной Америке. Развитие новых экономических отношений и капитализма привели к резкому росту заболеваемости и смертности от туберкулеза населения крупных городов Европы, Америки и России [9,10]. Улучшению диагностики туберкулеза способствовали открытие Р.Кохом в 1882 году возбудителя туберкулеза путем бактериоскопии мокроты и посева на питательные среды. Создание Р.Кохом туберкулина дало возможность оценки инфицированности населения туберкулезом и эпидемиологической ситуации, на основе, которой были разработаны противотуберкулезные мероприятия. Определение специфических морфологических изменений наряду с микробиологическим методом выявления микобактерий туберкулеза стали основными методами выявления заболевания, применяющиеся и в настоящее время. Диагностика заболевания,

наблюдение за специфическими изменениями в легких и определение исходов заболевания – было новым шагом в контроле за туберкулезом [7,15,16,17].

Открытие вакцины БЦЖ учеными А. Кальмет и К. Гереном (1921, Франция) позволило снизить инфицирование и заболевание детей. В 1920 году в Париже был создан Международный союз борьбы с туберкулезом и легочными заболеваниями, который способствовал прогрессу в борьбе с туберкулезом. С открытием противотуберкулезных препаратов начался революционный этап в борьбе с туберкулезом: резко снизилась смертность, распространенность и заболеваемость туберкулезом.

Раннее выявление больных, химиотерапия и вакцинация детского населения позволило снизить заболеваемость в развитых странах Америки и Европы на уровень <10 случаев, а в развивающихся странах на уровне 100 случаев на 100 тысяч населения, что явилось значительным успехом в сравнении с до антибактериального периода [18, 19]. В начале XX века выявляются новые закономерности в эпидемиологии туберкулеза: нозокомиальное распространение, появление лекарственно устойчивого туберкулеза, ВИЧ ассоциированного туберкулеза [21, 22,23]. В конце XX и в начале XXI века эпидемиологическая ситуация по туберкулезу вновь ухудшается. Это связано с увеличением численности населения, их бедностью, миграционными процессами и недооценкой проблемы туберкулеза [7]. По оценкам экспертов ВОЗ в конце XX столетия 2 миллиарда населения были инфицированы МБТ, около 9 миллионов заболевают бациллярными формами туберкулеза, 16-20 миллионов населения имеют активные формы и 3 миллиона умирают от туберкулеза ежегодно. На долю развивающихся стран приходилось 95% заболевших и 98% умерших от туберкулеза, а на долю развитых стран 5% случаев заболевания и 2% случаев смерти [8]. Наиболее тяжелая ситуация по туберкулезу определена в странах Юго-Восточной Азии, где проживает 32-40% больных. Однако самые высокие показатели заболеваемости туберкулезом отмечаются в странах Африки с высоким уровнем заболеваемости, где ситуацию осложняет проблема ВИЧ/СПИД. В Европе значительный рост

случаев туберкулеза в большей мере связан с ухудшением эпидемиологической ситуации в бывших республиках союза [9, 10,11,20,21].

В 1993 году ВОЗ объявила туберкулез глобальной проблемой здравоохранения. В середине 90-х годов XX века по всему миру была внедрена и развернута стратегия лечения под прямым наблюдением (DOTS, DirectlyObservedTreatmentStrategy). В результате выполнения этой стратегии, за более чем 20 лет, смертность от туберкулеза на 100 000 населения снизилась на 45%, а уровень заболеваемости ТБ на 100 000 населения также имеет тенденцию к снижению во многих регионах мира [22]. За период с 1995 по 2012 годы успешно вылечено 56 миллионов человек и более 22 миллионов жизней было спасено рисунок 1.1.1.

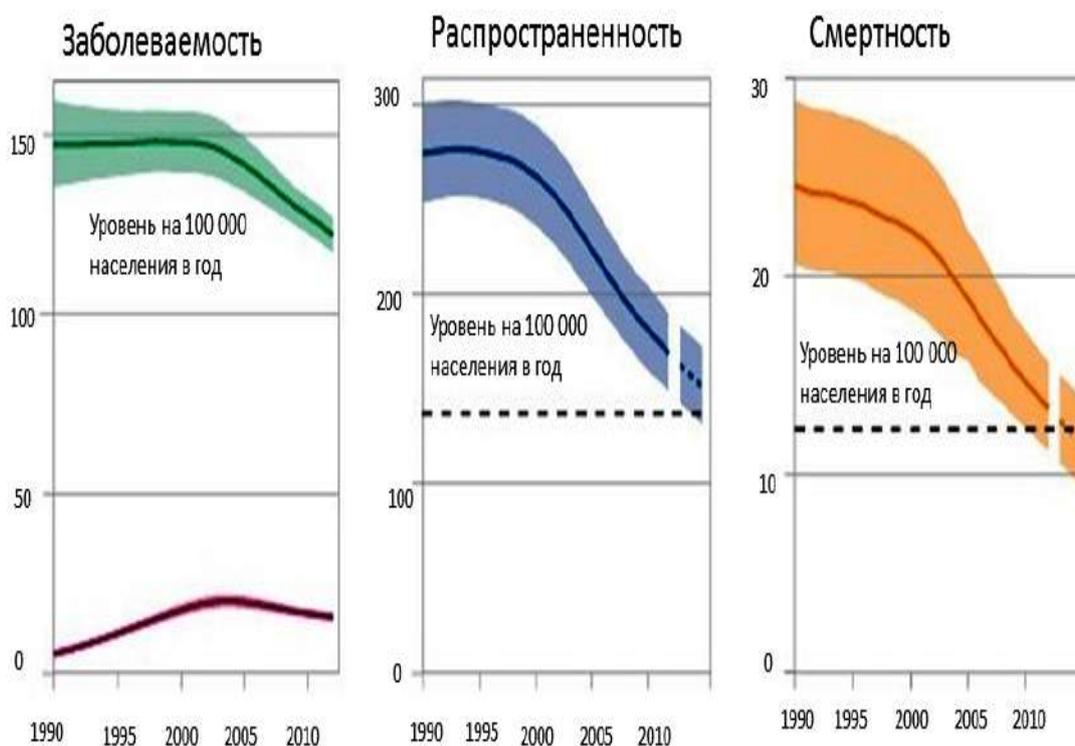


Рис.1.1.1. Глобальные тенденции заболеваемости, распространенности и смертности по ТБ

В графике заболеваемости зеленая кривая показывает заболеваемости среди ВИЧ-отрицательных случаев, красная ВИЧ-положительных случаев туберкулеза. Тенденции распространенности и смертности за период 1990-

2012гг и прогноз по распространенности и смертности туберкулеза к 2015 г сравнены с 1990-м.

Данные по смертности не включают в себя ВИЧ ко-инфицированные случаи туберкулеза (Рис.1.1.1). В 2012 году по распространенности было отмечено 12 миллионов случаев туберкулеза (диапазон 11-13 миллионов), что эквивалентно 169 случаям ТБ на 100 000 населения. К 2012 году уровень распространенности снизился на 37% по всему миру по сравнению с 1990 годом.

Для борьбы с туберкулезом также была развернута стратегия «Стоп ТБ». Ее главной целью являлось достижение к 2015 году определенных целей для уменьшения бремени туберкулеза в мире. Цели сформулированы в рамках Целей Тысячелетия в области Развития (ЦТР) Организации Объединенных Наций (ООН). Одна из этих — целей - это снижение к 2015 году уровня заболеваемости ТБ (ЦТР 6). Кроме этой цели, в ЦРТ включены четыре других индикатора: уровень болезненности, уровень выявления (выраженное в процентах количество зарегистрированных случаев за год, деленное на количество новых случаев за один и тот же год) и уровень случаев успешного исхода лечения (процент успешно вылеченных ТБ больных). Партнерство StopТВ наметило целью наполовину снизить уровни болезненности и смертности от ТБ к 2015 году по сравнению с 1990-м годом. Планы мероприятий, необходимых для достижения поставленной цели, были описаны в Глобальных планах Партнерства Стоп ТБ. Позднейший из них покрывает период с 2011 по 2015 гг. и оценен в 47 миллиардов долларов [23].

Бремя заболевания ТБ измеряется заболеваемостью туберкулезом (определенной как количество новых случаев и рецидивов за определенный период времени, обычно за год), распространенностью (определенной как количество случаев ТБ в определенное время) и смертностью (определенной как количество смертей, вызванных ТБ, за определенный период времени, обычно за год).

В 2015 году во всем мире было зарегистрировано 10,4 миллионов новых случаев заболевания туберкулёзом, из которых 5,9 млн. составили мужчины, 3,5 миллиона женщины и 1,0 млн. дети. Люди, имеющие ВИЧ, составляли 1,2 млн. всех новых случаев заболевания туберкулезом. По данным ВОЗ в 2015 году было зафиксировано 1,4 млн. случаев смерти от туберкулёза, среди которых 0,4 млн. человек имели ВИЧ[12].

Наибольшее число случаев заболевания туберкулезом регистрируется в Индии и Китае. В 2008 г. более 40% из всех новых случаев туберкулеза и рецидивов М+ в мире были зарегистрированных в этих странах. Высокий уровень заболеваемости туберкулезом наблюдается в странах Африки - 165,2 на 100 тыс. населения для всех форм заболевания и 73,9 - для новых случаев с М+, что составляет 47% уровень выявления. Наибольшие значения регистрируемой заболеваемости отмечены в Свазиленде и Южной Африке (744 и 692 на 100 тыс. населения соответственно). Высокий уровень регистрируемой заболеваемости отмечен также в странах Юго-Восточной Азии. В странах Америки уровень регистрируемой заболеваемости является самым низким [12,13].

Количество случаев заболеваемости туберкулезом на население (уровень заболеваемости) широко варьирует между странами. Самый низкий уровень преобладает в высокоразвитых странах, включающих Западную Европу, Канаду, Соединенные Штаты Америки, Японию, Австралию и Новую Зеландию. В этих странах уровень заболеваемости менее 10 случаев на 100 000 населения. В большинстве стран региона Америки уровень заболеваемости ниже 50 на 100 000 населения, это и обеспечивает его определение как региона с самым низким бременем туберкулеза в мире. В большинстве стран с высоким бременем туберкулеза (СВБТ) уровень заболеваемости колеблется в пределах 150-300 случаев на 100 000 населения. СВБТ со значительно меньшим уровнем – это Бразилия и Китай, тогда как в Южной Африке, Мозамбике и Зимбабве уровень заболеваемости выше 500 на 100 000 населения. Остальные страны из ведущей десятки по заболеваемости находятся преимущественно в Африке. В

Южной Африке и Свазиленде по самым оптимистическим оценкам как минимум 1 человек из каждых 100 (1000 или более на 100 000 населения)0 заболевает туберкулезом каждый год.[10,11,12,28,30]

Двадцать две страны были признаны странами с высочайшим уровнем бремени туберкулеза с 2000 года, в них отмечено более 81% всех зарегистрированных случаев туберкулеза в мире. Пять стран с самым высоким уровнем заболеваемости в 2012г. были Индия (2.0 миллиона-2.4 миллиона), Китай (0.9 миллиона-1.1 миллиона), Южная Африка (0.4 миллиона-0.6 миллиона), Индонезия (0.4 миллиона-0.5 миллиона) и Пакистан (0.3 миллиона-0.5 миллиона). Эти и еще 5 стран составляют ведущую десятку в плане количества случаев туберкулеза. Индия вместе с Китаем покрывают 26% и 12% всех случаев заболеваемости в мире соответственно[24,25]рис. №1.1.2.

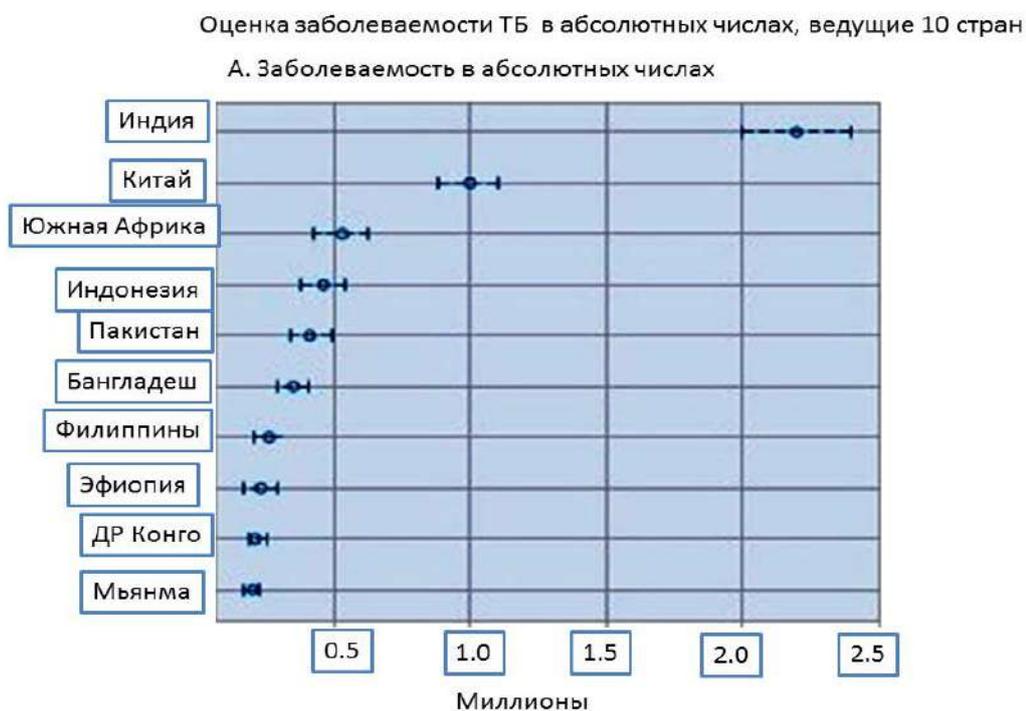


Рис. 1.1.2. Оценка заболеваемости туберкулезом в абсолютных числах, ведущие 10 стран, 2012 год.

Глобально уровни заболеваемости за период с 1990 до 2001гг остаются относительно стабильными, достигнув ЦТР задолго до намеченного срока в

2015г. Между 2011 и 2012 годами уровень снижения был 2%. Уровни заболеваемости по 6 регионам ВОЗ также снижаются, быстрее всего в Европейском регионе (6.5% в год) и медленнее всего в Восточно-Средиземноморском и Юго-Восточно-Азиатском регионах (менее 1% и 2% в год соответственно)

Уровни заболеваемости снижаются, начиная с середины 1990-х годов в Американском, Западно-Тихоокеанском, Восточно-Средиземноморском регионах и начиная с 2000г в Юго-Восточно-Азиатском регионе. Низкий уровень заболеваемости в Европейском регионе был достигнут в 1997 году, а в Африканском регионе - 2002 году. Последняя оценка ситуации показала, что уровни заболеваемости снизились в большинстве стран.

Текущие прогнозы по цели «Стоп ТБ» по снижению наполовину уровня распространенности к 2015 г по сравнению с 1990 годом, таковы, что цель эта не будет достигнута. В настоящее время уровни распространенности ТБ по регионам снижаются во всех 6 регионах ВОЗ[26] (Рис. 1.1.3).

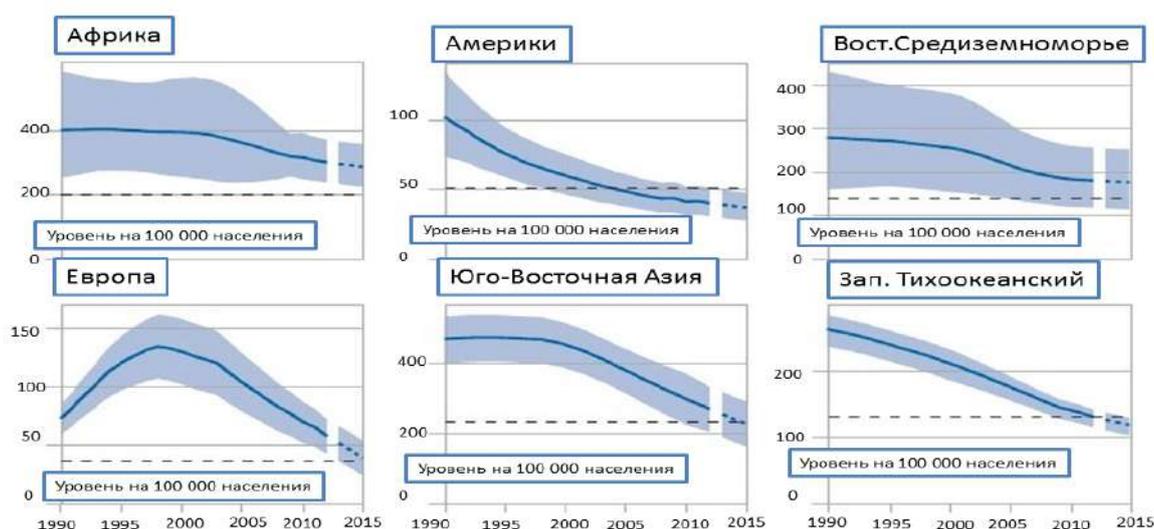


Рис.1.1.3. Тенденции в распространенности ТБ с 1990 по 2012гг и прогноз распространенности ТБ на 2013-2015гг по регионам ВОЗ.

Регион Америки снизил уровень распространенности наполовину уже к

2004 году, задолго до целевого 2015 года. Европейский и Западно-Тихоокеанские регионы показали достижение 50% уровня в 2012 году. В Африканском и Восточно-Средиземноморском регионах снижение заболеваемости туберкулезом до 50% отметки выглядят реальными, для Юго-Восточного Азиатского региона с относительно небольшим ускорением при текущем статусе прогресса, цель, скорее всего, не будет достигнута. Горизонтальная пунктирная линия показывает цель в 50% к 2015 году, остальные пунктирные линии показывают прогнозируемые тенденции. Смертность от туберкулеза может быть измерена при использовании данных системы записи гражданского состояния (СЗГС) стран при условии, что они имеют хорошее покрытие и фиксируют причину смерти специальным кодом, который приведен в Международной классификации инфекционных заболеваний (International classification of diseases (ICD-10)).

Также можно получить данные по исследованиям смертности, в случае, если национальные системы записи актов гражданского состояния несовершенно. В 2012 году в большинстве стран с высоким бременем ТБ данные СЗГС были несовершенно и исследования по смертности не проводились. В отсутствие таких данных смертность от ТБ вычисляется по заболеваемости, умноженной на уровень фатальности или путем экологического моделирования на основе данных по смертности из стран, где СЗГС работает хорошо. Смертность от ТБ ВИЧ-инфицированных больных очень сложно подсчитать, так как у них причиной смерти указывается ВИЧ/СПИД, а истинная причина, то есть туберкулез не фиксируется (Рис.1.1.4).

До 2008 года ВОЗ использовала данные СЗГС только для трех стран, в 2009 список расширился до 89, однако, все эти страны входят в Европейский и Американский регионы ВОЗ, на которые приходится менее 10% случаев ТБ в мире[27,28,29,30,31].

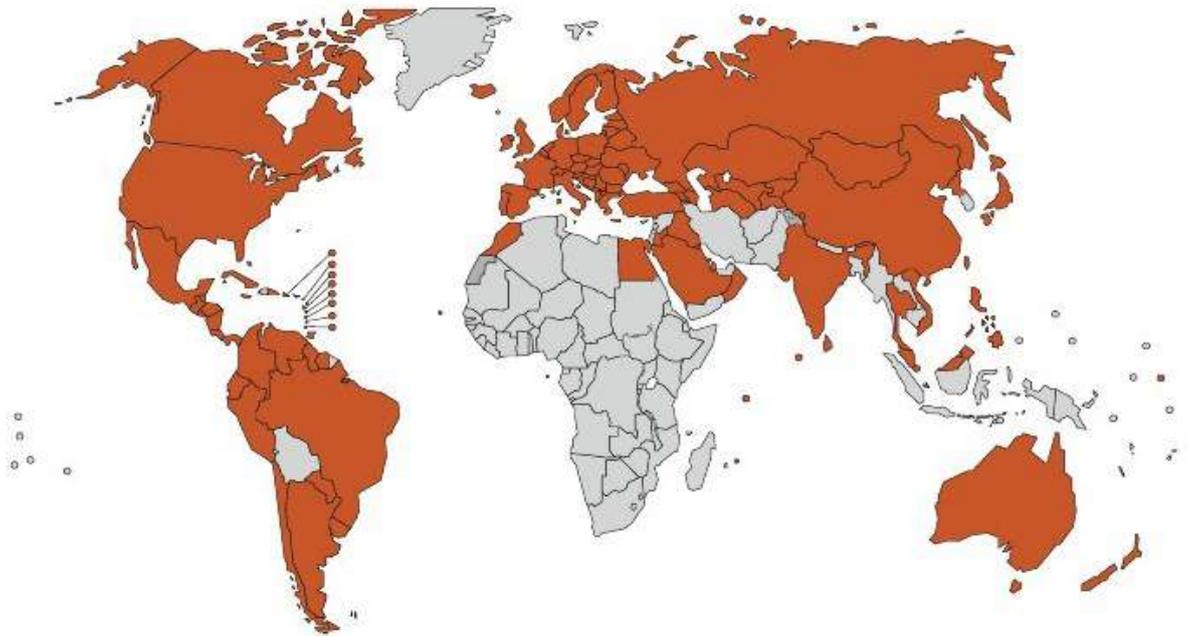


Рис. 1.1.4. Страны, в которых смертность от ТБ была оценена по данным СЗГС (оранжевым цветом) (121 страна); и по данным исследования смертных случаев.

Из 8.6 миллионов случаев заболеваемости в 2012 году 1-1.2 миллиона (12-14%) пришлось на ВИЧ-коинфицированных туберкулезных больных, 0.5 миллионов случаев туберкулеза среди детей и 2.9 миллиона случаев среди женщин. В 2012 году в мире отмечено 1.3 миллиона случаев смертности от туберкулеза: 900 000 среди ВИЧ-отрицательных и 320 000 среди ВИЧ-положительных. Эти случаи включали в себя 410 000 среди женщин и 74 000 среди детей. Приблизительно 170 000 смертных случаев отмечено по причине МЛУ-ТБ (диапазон 102 000-242 000) [32]. Высокая смертность наблюдалась в странах Африканского континента и Юго-Восточной Азии, где показатели смертности составляли от 10-19 до 20 - 39 на 100 тысяч населения. В странах Европейского и Американского регионов показатели смертности были низкими с колебаниями от 0-0,9 до 1,0- 3,9 на 100 тысяч населения. В Российской Федерации и Среднеазиатских республиках показатель смертности варьировал от 4,0 до 9,9 на 100 тысяч населения[31,33] рис. 1.1. 5.

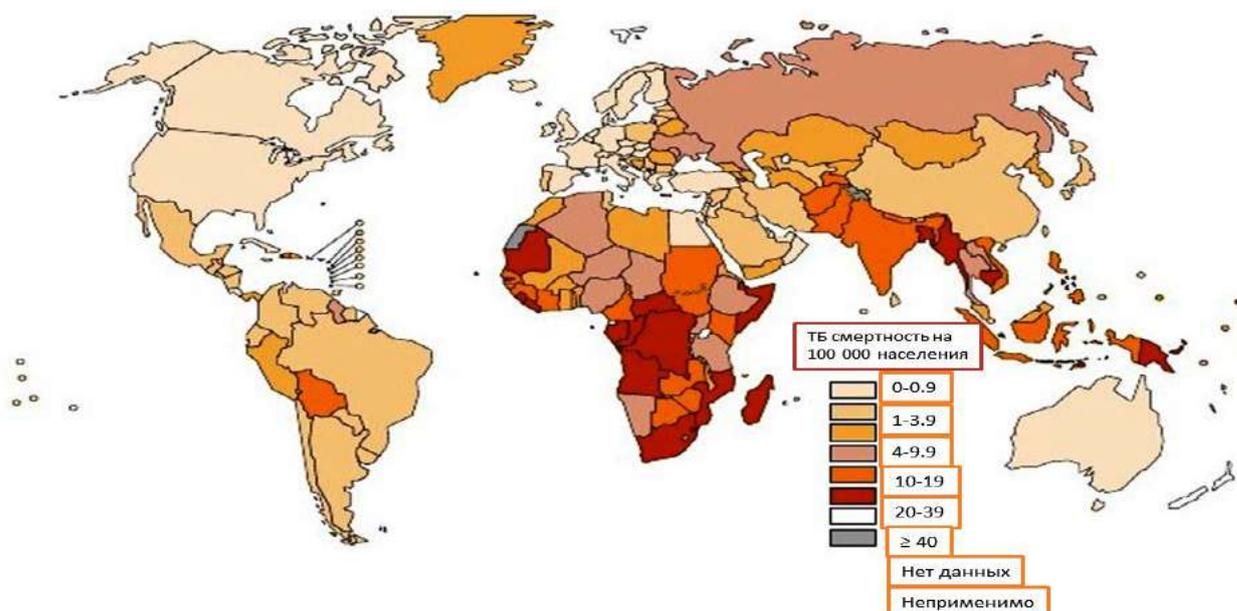


Рис. 1.1.5. Отмеченные случаи смертности, исключая случаи смертности от ТБ среди ВИЧ-инфицированных, 2012

В Российской Федерации в 2008 г. было зарегистрировано 90,7 новых случаев и рецидива М+ на 100 тыс. населения, или 2,2% от всех зарегистрированных случаев туберкулеза в мире и 2,8% от случаев туберкулеза, зарегистрированных в странах НБТС. В общем числе зарегистрированных новых случаев туберкулеза и рецидивов с М+ в странах Европейского региона ВОЗ доля Российской Федерации весьма существенна и составляет - 37,8%. Уровень выявления всех новых случаев заболевания составил в 2008 году - 85%, а новых случаев с М+ - 73% [27].

По критериям ВОЗ, Украина занимает 10-е место по уровню заболеваемости среди стран Европейского региона, второе место в Европе — по темпам роста мультирезистентного туберкулеза и четвертое место в мире — по его распространенности у впервые выявленных больных. Уже 18 лет Украина несет на себе тяжкое бремя эпидемии туберкулеза. За это время потеряно около 150 тыс. чел. Ежегодно около 30 тыс. заболевают туберкулезом, около 7 тыс. — умирают от него, и столько же становятся инвалидами вследствие этого заболевания. Так, в течение 2012 г. в Украине было выявлено

30 958 больных с активной формой туберкулеза, умерли от туберкулеза почти 7 тыс. человек[34].

В Республике Казахстан высокий уровень заболеваемости наблюдался в 60-е годы, с последующей стабилизацией в 80-е годы и резким ее подъемом с 1994 года. До 2002 года уровень заболеваемости в 4 раза превышал общий показатель заболеваемости Европейского региона[35].

Таджикистан по регистрируемой заболеваемости туберкулезом вышел на первое место среди республик СНГ - 168 больных на 100 тысяч жителей. Среднегодовые темпы роста заболеваемости по республике составляли около 14%. В настоящее время высокий уровень заболеваемости туберкулезом сохраняется. Самые высокие показатели заболеваемости туберкулезом по стране наблюдались в 2007 году - 85 случаев на 100 тыс. населения. Однако после поэтапного охвата всей республики программой ДOTS (2007) уже в 2008 году эти показатели имели тенденцию к снижению. Таким образом, уже в 2012 году число больных ТБ уменьшилось на 18%, что составило 70 случаев на 100 тыс. населения. Показатель смертности от туберкулеза также снизился - если в 2002 году было 9,7 случая на 100 тыс. населения, то в 2009 году этот уровень снизился до 6,3[36].

В настоящее время эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в республике Узбекистан остается напряженной. Отмечается рост заболеваемости и смертности от туберкулеза. Так за период 1992-2002 годы заболеваемость в целом по республике возросла на 64,9%, смертность выросла более чем в 2 раза. Рост заболеваемости и смертности от туберкулеза особенно высок в экологически неблагоприятных регионах республики. В республике Каракалпакстан заболеваемость выросла на 86,4%, Навоинской области -74,3%, Бухарской - 85,3% и Хорезмской -62,9%[37].

Таким образом, эпидемиологическая ситуация в мире по заболеваемости туберкулезом характеризуется эпидемическим распространением в странах Африканского и Юго-Восточного Азиатского регионов. В результате проводимых ВОЗ противотуберкулезных программ наметилась тенденция снижения заболеваемости туберкулезом в республиках СНГ и низкий уровень

заболеваемости наблюдается в странах Европейского и Американского регионов.

## **1.2. Влияние изменения свойств возбудителя туберкулеза на эпидемический процесс и клиническое течение.**

Противотуберкулезные средства используются на протяжении целого ряда десятилетий. В каждой стране, где проводятся исследования, зарегистрированы штаммы, устойчивые к одному или нескольким препаратам. Лекарственная устойчивость возникает при ненадлежащем применении противотуберкулезных препаратов, их неправильном назначении поставщиками медико-санитарной помощи, плохом качестве лекарств или преждевременном прекращении лечения пациентами.

Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) — форма туберкулеза, вызываемая бактерией, не реагирующей, по меньшей мере, на изониазид и рифампицин, два самых мощных противотуберкулезных препарата первой линии. МЛУ-ТБ можно лечить и излечивать, используя препараты второй линии. Однако такие варианты лечения ограничены и требуют проведения экстенсивной химиотерапии (лечения длительностью до двух лет) препаратами, которые отличаются высокой стоимостью и токсичностью [38,39,40,41].

Первичная, и приобретенная лекарственно-устойчивые формы туберкулеза становятся все более важной проблемой для развитых стран. В течение последних 5 лет в Соединенных Штатах отмечено несколько вспышек туберкулеза, вызванного штаммами, устойчивыми одновременно к нескольким препаратам, что осложняет ситуацию контроля над туберкулезом. Эти вспышки обусловлены резистенцией возбудителей, по крайней мере, к изониазиду и рифампицину. На ноябрь 1992 г. было идентифицировано 297 случаев туберкулеза, вызванного штаммами, устойчивыми одновременно к нескольким препаратам. Большинство этих случаев протекали у пациентов с ВИЧ-

инфекцией. Среди больных туберкулезом, вызванным штаммом, устойчивым к нескольким препаратам, уровень смертности составил приблизительно 70%, и средний интервал времени между постановкой диагноза и смертью составлял от четырех до шестнадцати недель[42].

Высокая распространенность случаев туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью вызывает озабоченность. Увеличение охвата тестированием на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) к препаратам второго ряда привело к росту почти втрое общего числа больных с широкой лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам (ШЛУ-ТБ), с 132 в 2008 г. до 344 в 2009 г. (преимущественно за счет восточных стран). Тем не менее, охват тестированием на ШЛУ-ТБ в странах, не входящих в ЕС/ЕЭП, остается низким. В 2009 г. доля МЛУ среди новых случаев ТБ несколько возросла - с 11,1% до 11,7%, а среди случаев ранее леченого туберкулеза уменьшилась с 46,9% до 36,6%[43].

Во Франции, в 1992 году, штаммы, устойчивые к нескольким препаратам выделялись в 42 (0,5%) из 8521 случая туберкулеза. В Англии и Уэльсе 0,6% из 5146 изолятов микобактерии туберкулеза в период с 1989 по 1991 гг. были резистентны к изониазиду и рифампицину [44,45].

Кризис, обусловленный туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью, продолжается, по оценкам, в 2013 году произошло 480 000 новых случаев заболевания. В глобальных масштабах около 3,5% всех людей, у которых в 2013 году развился туберкулез, имели эту форму болезни. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью сложнее лечить, и для него характерны значительно более низкие уровни излечиваемости. Несмотря на то, что, по оценкам, процентная доля новых пациентов, имеющих МЛУ-ТБ, в глобальных масштабах остается неизменной, в некоторых районах протекают тяжелые эпидемии, в частности в Восточной Европе и Средней Азии. Во многих районах мира показатели успешного лечения остаются тревожно низкими. Более того, на сегодняшний день в 100 странах

зарегистрирован туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью, лечение которого является еще более дорогим и сложным, чем лечение МЛУ-ТБ[46,47].

В некоторых случаях может развиваться более серьезная лекарственная устойчивость. Туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ) является более тяжелой формой МЛУ-ТБ, вызываемой бактериями, не реагирующими на самые эффективные противотуберкулезные препараты второй линии, при которой у пациентов нередко не остается никаких дальнейших вариантов лечения. По данным ВОЗ, в настоящее время примерно у 9,0 % больных МЛУ-ТБ определяется ШЛУ-ТБ, а в 2010 г. эта цифра была равна 5,4 % [48].

В 2015 году примерно у 480 000 людей в мире развился МЛУ-ТБ. Кроме того, примерно 100 000 человек приобрели устойчивость к рифампицину (самому эффективному препарату первой линии) и нуждались в лечении МЛУ-ТБ. Наибольшим бременем проблема МЛУ-ТБ ложится на три страны — Китай, Индию и Российскую Федерацию, — на долю которых в совокупности приходится почти половина всех случаев в мире. В 2015 году примерно у 9,5% пациентов с МЛУ-ТБ был ШЛУ-ТБ. Пропорции МЛУ-ТБ у новых и ранее леченых случаев на уровне стран показаны на рисунках 1.2.1. и 1.2.2.

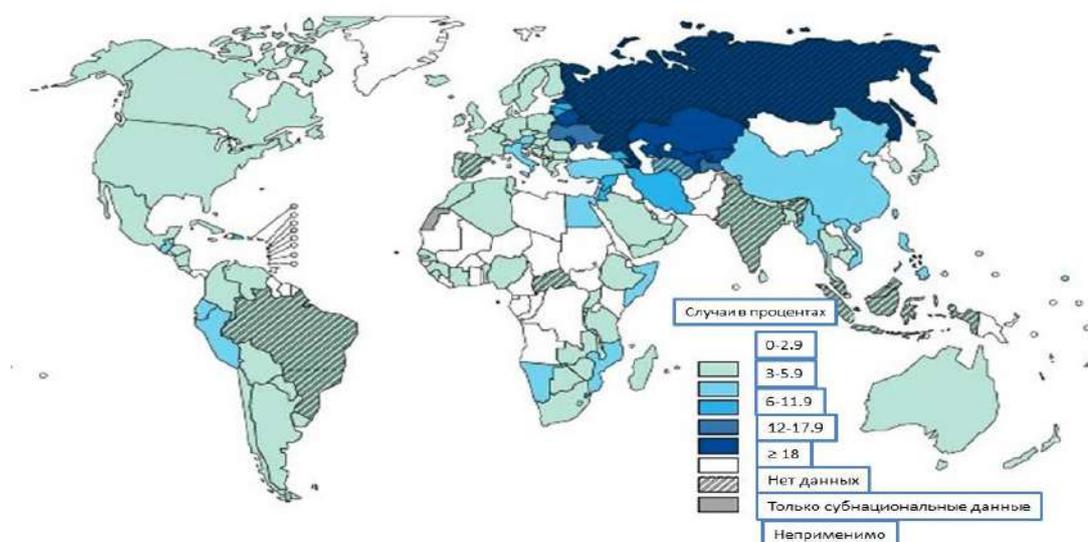


Рисунок 1.2.1. МЛУ-ТБ среди новых случаев

В Восточной Европе и в особенности, странах Центральной Азии, в том числе и в Кыргызстане по-прежнему отмечается самый высокий уровень МЛУ-ТБ. Среди новых случаев примеры включают Азербайджан (22.3% в 2007), Беларусь (34.8% в 2012), Эстонию (19.7% в 2012), Казахстан (22.95 в 2012), Кыргызстан (26.4% в 2011), Молдову (23.7% в 2012), Россию (в среднем 23.1% с самым высоким уровнем в Ямало-Ненецком округе: 41.9% в 2011) и Узбекистан (23.2% в 2011) [49,50,51,52,53,54].

Среди ранее леченных ТБ больных примеры включают Азербайджан (город Баку: 55.8% в 2007), Беларусь (68.6% в 2012), Эстонию (50.0% в 2012), Казахстан (55.0% в 2012), Кыргызстан (68.4% в 2012), Молдову (62.3% в 2012), Таджикистан (56.0% в 2012) и Узбекистан (62.0% в 2011). В Российской Федерации, при том, что средняя пропорция случаев МЛУ-ТБ не превышает 50%, в исследованиях, проведенных в разных федеральных субъектах пропорция намного выше 50% (с высочайшим уровнем в Ульяновской области: 74.0% в 2011 [13 29,34,35,36,37].

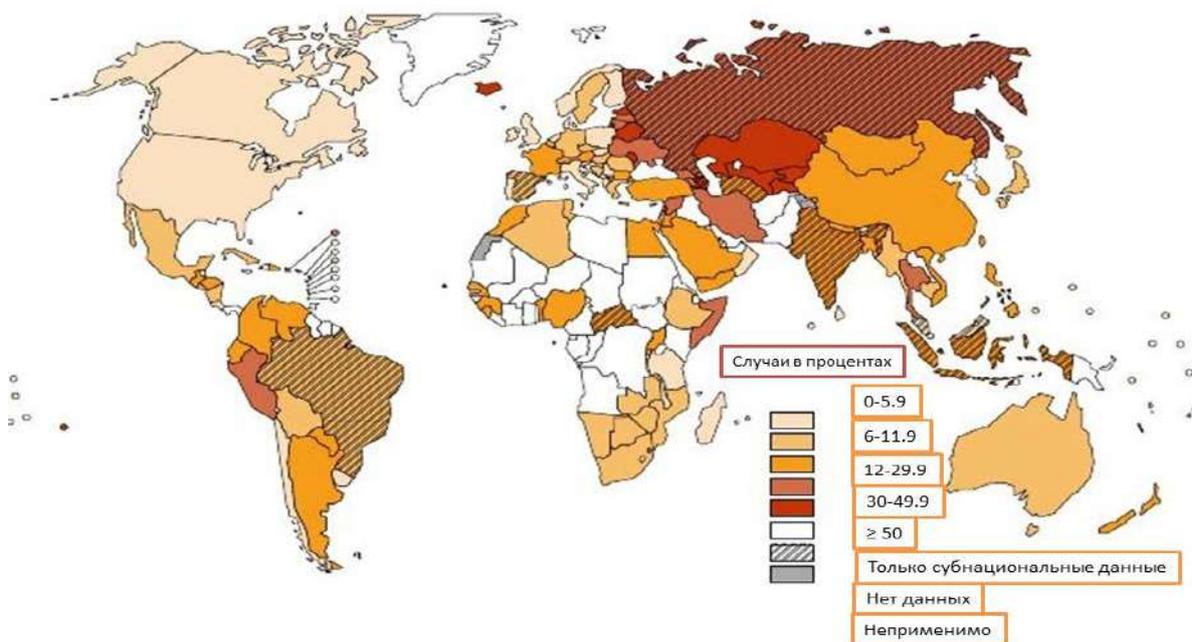


Рисунок 1.2.2. МЛУ-ТБ среди ранее леченых случаев

Уровень ЛУ среди новых случаев ТБ в других странах остается на низком уровне во многих частях мира, включая почти все страны в американском регионе, большинстве стран Африки, большинстве стран Юго-Восточно-Азиатского региона, большинстве стран Западной Европы и нескольких странах Западно-Тихоокеанского региона (включая Австралию, Камбоджу, Японию, Новую Зеландию и Вьетнам).

Данные ИЛУ позволяют оценить количество случаев МЛУ-ТБ среди зарегистрированных случаев легочного ТБ как глобально, так и по странам. Это те случаи МЛУ-ТБ, которые могут быть выявлены Национальными Программами по борьбе с туберкулезом (НТП), если все зарегистрированные пациенты будут тестироваться на резистентность к рифампицину и изониазиду с использованием рекомендованных ВОЗ диагностических тестов. Глобально в 2012 году было отмечено 300 000 (диапазон 220 000-380 000) случаев МЛУ-ТБ среди зарегистрированных ТБ пациентов[53,54,55].

Резистентность к противотуберкулезным препаратам второго ряда показана на рисунке 1.2.3.

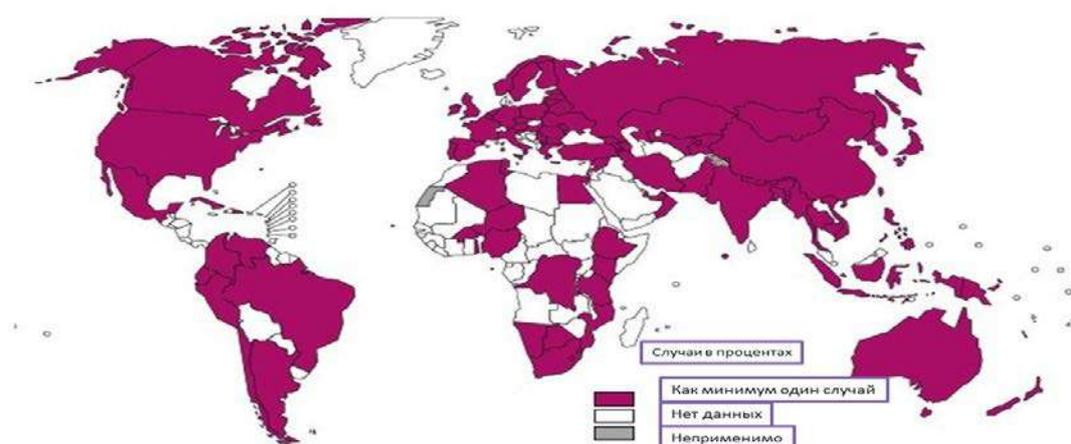


Рисунок 1.2.3. Страны, зарегистрировавшие как минимум один случай ШЛУ-ТБ в 2012г.

Случаи туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ)

отмечались к концу 2012 года в 92 странах мира. (Рис.8). Всего 75 стран и 4 территории предоставили репрезентативные данные продолжительного надзора или специальных исследований по пропорции случаев МЛУ и ШЛУ-ТБ. средняя пропорция случаев МЛУ-ТБ с ШЛУ составила 9.6% (КД 95%: 8.1-11%), эти данные сходны с данными 2011 года (9.0%). Тринадцать из этих стран доложили о более чем 10 случаях ШЛУ-ТБ. Среди этих стран Азербайджан (город Баку: 12.8%), Беларусь (11.9%), Латвия (16.0%), Литва (24.8%) и Таджикистан (город Душанбе и регион Рудаки: 21.0 %). Пропорция случаев МЛУ-ТБ с резистентностью к фторхинолонам и инъекционным препаратам второго ряда равнялась 16.5% (КД 95%: 12.3-20.7) и 22.7% (15.4%-30.0%) соответственно. Всего 32% (21.9%-42.1%) пациентов с МЛУ-ТБ имели дополнительную резистентность к фторхинолонам, инъекционным препаратам второго ряда, или и к тому, и к другому. Систематический обзор смертности от туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) и глобальная оценка бремени МЛУ-ТБ были дополнены в 2013 году. По самым оптимистическим оценкам в 2012 году в мире отмечалось 450 000 (диапазон 300 000-600 000) новых случаев МЛУ-ТБ. Эти случаи включают в себя первичный и приобретенный МЛУ-ТБ[56,57,58,59,60,61].

Таким образом, лекарственно-устойчивый туберкулез – это основная проблема общественного здравоохранения во многих странах. Она требует постоянного систематическом сбора и анализа данных для отслеживания тенденций лекарственной устойчивости во времени и надзора за туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью, основанного на рутинном тестировании лекарственной чувствительности пациентов с туберкулезом.

### **1.3. Туберкулез и ВИЧ инфекция.**

ВИЧ инфекция остается одной из основных проблем глобального общественного здравоохранения. На сегодняшний день он унес более 39

миллионов человеческих жизней. Проблемам сочетания ВИЧ-инфекции с туберкулезом посвящено много публикаций (Покровский В.В., 1994-2008, Алексеева Л.П., 2008, Рахманова А.Г., 2004-2015, Бабаева И.В., 2010, Пантелеев А.М., 2004-2015, Кравченко А. В., 2008-2012, Батыров Ф. А. 2006, Загдын З.М., 2013-2015, Баласанянц Г.С., 2008-2015, Галкин В.Б., 2008-2015, Богородская Е.М., 2007-2015, Зимина В.Н., 2004-2015 и др.), которые, в первую очередь, касаются туберкулеза органов дыхания. В 2014 году 1,2 (1,0–1,5) миллиона людей в мире умерли от причин, связанных с ВИЧ. Приблизительно 90% случаев ВИЧ-инфекции приходится на развивающиеся страны и большинство из них — на возрастную группу от 15 до 49 лет. Наиболее пораженным регионом является Африка к югу от Сахары — здесь в 2014 году проживало 25,8(24,0–28,7) миллиона человек с ВИЧ. На этот регион приходится также почти 70% глобального общего числа новых ВИЧ-инфекций [62,63].

ВИЧ и туберкулез представляют собой смертельное сочетание и ускоряют развитие друг друга. Сочетанное поражение населения ВИЧ-инфекцией и туберкулезом названо специалистами центра по контролю над болезнями (США) пандемией. На планете число лиц, живущих с ВИЧ-инфекцией, составляет 42 млн., из них 16 млн. больны туберкулезом (данные ВОЗ). 95% больных двойной инфекцией являются жителями развивающихся стран. В странах с широким распространением ВИЧ-инфекции 30-50% от числа лиц, имеющих СПИД, заболевают туберкулезом.

Распространение ВИЧ-инфекции привело к росту заболеваемости туберкулезом в большинстве стран мира, как экономически благополучных, так и слабо развитых. ВИЧ-инфекция нарушает функции иммунитета, что в свою очередь становится причиной заболевания туберкулезом. Туберкулез является наиболее ранним, частым и значимым осложнением СПИДА [64,65].

Одним из факторов, объясняющих закономерность преимущественного сочетания туберкулеза и ВИЧ-инфекции, являются особенности механизмов патогенеза обоих заболеваний. Доказано, что ВИЧ поражает и приводит к гибели преимущественно Т-лимфоциты, особенно популяцию Т-хелперов

(CD4+клетки), которые играют ключевую роль в противотуберкулезном иммунитете. Уменьшение их количества в организме человека серьезно нарушает клеточный иммунитет. Снижается выработка CD4+-лимфоцитами полонизирующих антител, интерлейкина-2, интерферона  $\gamma$ , что неблагоприятно отражается на реакциях других эффективных клеток. ВИЧ также влияет на альвеолярные макрофаги, моноциты и полинуклеары, снижая их способность мигрировать в легкие. ВИЧ-инфекция существенно влияет на состояние иммунореактивности при туберкулезе, вызывая абсолютное и относительное снижение количества CD4+-клеток, изменяя взаимоотношение в системе клеточного иммунитета, нарушая дифференцировку макрофагов и формирование специфической грануляционной ткани. В то время как на ранних стадиях ВИЧ-инфекции морфология туберкулезного воспаления существенно не изменяется, на поздней стадии СПИДа специфические гранулемы не формируются[66].

В то же время высокая инфицированность туберкулезом населения позволяет предполагать, что большинство случаев этого заболевания, развивающегося у ВИЧ-инфицированных, связано с реактивацией латентной туберкулезной инфекции. В пользу данного предположения свидетельствует частое обнаружение при вскрытиях ВИЧ-инфицированных старых фиброзных или обызвествленных туберкулезных изменений в легких и во внутригрудных лимфатических узлах, содержащих жизнеспособные микобактерии туберкулеза и явившихся источником реактивации туберкулеза. Установлено, что к середине 1994 г. 5,6млн человек во всем мире были инфицированы туберкулезом и ВИЧ одновременно. Большинство из них проживает на Африканском континенте южнее Сахары. Данные по другим регионам следующие: более 80 000 человек с сочетанной ВИЧ-инфекцией и туберкулезом проживают в Северной Америке; более 450 000 — в Латинской Америке и районе Карибского моря; 23 000 — в Северной Африке и на Среднем Востоке; 49 000 — в Западной Европе; более 9 000 — в Восточной Европе и бывшем Советском Союзе; 20 000 — в Восточной Азии и районе

Тихого океана; более 1,15 млн в Южной Азии; более 4 000 человек — в Австралии. Поскольку почти 2/3 популяции, инфицированной туберкулезом, проживает в Азии, то распространение ВИЧ-инфекции в Азиатском регионе может привести к увеличению случаев ВИЧ-ассоциированного туберкулеза. В Бомбее серопозитивность на ВИЧ среди больных туберкулезом возросла с 2% в 1988 г. до 9% в 1992 и 1993 г., в Чанг-Мэй на севере Таиланда с 5% в 1989 г. до 26% в 1992 г. В 1990 г. 4,2% всех случаев туберкулеза были связаны с ВИЧ-инфекцией. Однако эта зависимость наиболее ярко выражена на Африканском континенте южнее Сахары, где 20% случаев туберкулеза были связаны с ВИЧ-инфекцией. Более 40% больных туберкулезом во многих африканских странах серопозитивны на ВИЧ, в то время как в других регионах наблюдается меньшая распространенность ВИЧ-инфекции. Ежегодный риск развития активной формы туберкулеза среди лиц, инфицированных как ВИЧ, так и туберкулезом, составил от 5 до 15%, что зависит от степени иммунодепрессии. Число зарегистрированных случаев туберкулеза в 80-е годы резко увеличилось во многих странах Африки южнее Сахары (хотя до этого времени было снижение заболеваемости). С 1985 по 1991 гг. ежегодная заболеваемость в Замбии увеличилась в 3 раза, в Малави и Бурунди — более чем в 2 раза, а в Танзании число случаев туберкулеза увеличилось приблизительно на 76% [67].

По данным Европейского Бюро ВОЗ в 2005 году было зарегистрировано 14 тыс. случаев туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией. Это составило 5% от всех новых случаев туберкулеза. У больных ВИЧ-инфекцией он занял основную долю в структуре вторичных заболеваний. В частности, в Западной Европе его доля составила 22%, в Центральной - 24%, в Восточной - 52% [68].

В 2007 году всего в мире ВИЧ-инфекцию имели более 14 млн. больных туберкулезом. По данным ВОЗ из 9,27 млн. случаев заболевания туберкулезом в 2007 году в 15% (1,37 млн.) имела место и ВИЧ-инфекция. Из общего числа больных сочетанной инфекцией 79% зарегистрированы в Африке, 11% - в Юго-Восточной Азии (преимущественно в Индии). Причиной смерти больных ВИЧ-инфекцией в 23% является туберкулез.

В 2010 году из 34 млн. больных ВИЧ-инфекцией 1млн. 100 тыс. имели туберкулез и 350000 умерли от него. Основными причинами смерти были: не диагностированный туберкулез, не диагностированная ВИЧ-инфекция, оба заболевания диагностированы, но слишком поздно. В 2010 году 82% больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, в мире и 71% случаев смерти, связанных с сочетанной инфекцией, произошли в Африке к югу от Сахары [69].

В Восточной Европе наиболее высокая распространенность ВИЧ-инфекции среди больных туберкулезом была установлена в Украине (8%), Эстонии (7%) и Российской Федерации (6%). При этом Европейское Бюро ВОЗ отметило, что заболеваемость туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, на 20% выше распространена среди лиц, употребляющих наркотики[69].

Российская Федерация отнесена ВОЗ к числу стран Европы, для которых проблема туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией, стоит наиболее остро [28,29,30,31,49,50,51,52,53].

В материалах ВОЗ указывается на низкую активность противотуберкулезной помощи больным ВИЧ-инфекцией в мире. В частности, обследование на туберкулез в мире прошел только 1% больных ВИЧ-инфекцией (из 33,2 млн. - 314 тыс.). При обследовании туберкулез был обнаружен у каждого четвертого. Особенно негативное влияние ВИЧ-инфекция оказывает на ситуацию по туберкулезу в беднейших странах, что в целом ухудшает эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу в мире и существенно снижает эффективность противотуберкулезных программ в наиболее пострадавших странах мира [70,71,72,].

В связи с этим профилактика туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией становится чрезвычайно актуальной. В то же время проводить ее среди и гражданского населения очень сложно. При разработке профилактических мероприятий особое место отводится более детальному изучению социальных факторов с целью определения более адекватных подходов к созданию ее алгоритма[73].

Исследования контингента больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, показало, что риску заболевания как туберкулезом, так ВИЧ-инфекцией подвержены одни и те же группы населения: безработные, наркоманы, лица, находящиеся или прибывшие из мест лишения свободы, мигранты. Отсутствие надежных и доступных средств для подходов к организации профилактики и лечения сочетанной инфекции свидетельствует в пользу высокой актуальности установления путей ее совершенствования. [73,74,75,76,77]. Как показал опыт ряда исследований результаты лечения ВИЧ-инфекции, туберкулеза и наркотической зависимости лучше, когда специалисты, проводящие его, прошли подготовку по смежным областям и сотрудничают друг с другом.

Россия входит в число 22 стран мира с наиболее неблагоприятной эпидемической обстановкой по туберкулезу. В тоже время темп роста ВИЧ-инфекции в России является одним самых высоких в мире (UNAIDS, 2004 г.). Наконец 2007 г. в РФ зарегистрировано свыше 400 тыс. людей, живущих с ВИЧ-инфекцией, около 13 тыс. из них имеют туберкулез. Учитывая высокую инфицированность взрослого населения России микобактериями туберкулеза, можно предполагать, что, примерно у 1/2 ВИЧ-инфицированных в среднем через 7-8 лет на фоне иммунодефицита, вызываемого ВИЧ, разовьется туберкулез, что увеличит заболеваемость туберкулезом в стране более чем в 2 раза. К началу 2008 г. на учете состояло 613 больных двойной инфекцией.

Продолжают регистрироваться случаи сочетанной инфекции (туберкулез и ВИЧ) в Дагестане. Всего выявлено 248 ВИЧ-инфицированных с ко-инфекцией. Активная форма туберкулеза выявлена у 129 ВИЧ-инфицированных.

Двойная инфекция представляет собой угрозу распространения туберкулеза среди здорового населения. Проблема сочетанной инфекции требует скоординированной работы и принятия неотлагательных мер двух служб: противотуберкулезной и инфекционной.

В 2015 году от ВИЧ-ассоциированного туберкулеза умерли около 0,4 миллиона человек. В 2015 году примерно 35% случаев смерти среди людей с ВИЧ были вызваны туберкулезом. По оценкам экспертов ВОЗ, в 2015 году произошло 1,2 миллиона новых случаев заболевания туберкулезом среди ВИЧ-позитивных людей, 71% которых имели место в Африке. В 2015 году по меньшей мере одна треть людей с ВИЧ в мире были инфицированы туберкулезной бактерией. Вероятность того, что у людей, живущих с ВИЧ, разовьется активная форма туберкулеза, в 20–30 раз превышает аналогичный показатель среди людей, неинфицированных ВИЧ [78- 86].

Таким образом, эпидемический процесс при туберкулезе ширится и становится все более интенсивной и опасной за счет сочетания ее с ВИЧ инфекцией, которая способствует росту смертности, развитию лекарственно — устойчивых форм.

### **1.3. Эволюция возможностей лабораторной диагностики туберкулеза**

Доказательством этиологической связи между патологическим процессом и инфекционным агентом должно служить, согласно постулату Коха, выделение данного инфекционного агента от заболевшего пациента. Обнаружение микобактерий туберкулезного комплекса в клинических образцах является одним из основных диагностических подходов во фтизиатрии [70].

Микробиологические исследования играют в современных условиях важнейшую роль в выявлении, диагностике и дифференциальной диагностике туберкулеза, выборе рациональных схем лечения, оценке его эффективности и коррекции химиотерапевтической тактики, контроле диспансерных контингентов, а также в выявлении нозокомиальной туберкулезной инфекции и определении путей трансмиссии возбудителя. Для исследования на туберкулез используют разнообразный материал: мокроту, бронхиальные смывы, бронхоальвеолярный лаваж, материал, получаемый при бронхоскопии, транстрахеальной и внутрилёгочной биопсии, ларингеальные мазки, экссудаты,

спинномозговую жидкость, гной и т.д. Наличие туберкулезной палочки в клинических образцах выявляется несколькими методами.

Лабораторная диагностика обеспечивает выполнение главной задачи диагностики и лечения туберкулеза – выявление у больного МБТ [70,79]. В лабораторную диагностику на современном этапе входят следующие методики: сбор и обработка мокроты; микроскопическая идентификация МБТ в выделяемых субстанциях или тканях; культивирование; определение резистентности к препаратам; идентификация; выполнение новых молекулярно-биологических методов, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и проведение теста на лекарственную чувствительность.

Сбор мокроты для исследования на микобактерии туберкулеза – весьма ответственный этап диагностической процедуры, от четкости проведения, которого во многом зависит результат исследования. Необходимо иметь в виду, что в момент откашливания больным мокроты создается очень высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции. В связи с этим желательно, чтобы сбор мокроты производился в специально выделенном для этих целей отдельном хорошо вентилируемом помещении (пункте сбора мокроты), оснащенном бактерицидными лампами и средствами дезинфекции, или на открытом воздухе.

#### **1.4.1. Микроскопия мазка мокроты для выявления кислотоустойчивых бактерий (КУБ).**

Наличие туберкулезной палочки в клинических образцах выявляется несколькими методами. Из них традиционными являются бактериоскопия (световая и люминесцентная) [88]. Уже более 100 лет существует самый простой и быстрый метод выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУБ) - это микроскопия мазка. КУБ – микобактерии, способные оставаться окрашенными даже после обработки химически агрессивными кислотными растворами; они могут быть выявлены с помощью микроскопа в окрашенных образцах мокроты. Микобактерии отличаются от других микроорганизмов

характерным составом своей клеточной стенки, состоящей из миколоевых кислот, которые благодаря своим сорбционным свойствам обеспечивают способность окрашиваться по методикам, выявляющим КУБ. Резистентность к стандартным методам окрашивания и способность МБТ сохранять раннее окрашивание, является следствием высокого содержания липидов во внешней оболочке клетки. Вообще, грамм-положительные бактерии в своем составе, имеют приблизительно 5% липидов или воска, грамм-отрицательные организмы около - 20% и МБТ примерно 60%[89]. Метод бактериоскопии обладает низкой чувствительностью: для обнаружения микобактерий туберкулеза (МБТ) необходимо, чтобы 1 мл патологического материала содержал не менее 100 тыс. микробных клеток[90].

Количество микобактерий в мокроте определяется, прежде всего, характером туберкулезного процесса. Так, каверны диаметром около 2 см и с дренирующим бронхом могут содержать около 100 млн туберкулезных микобактерий. В то же время не кавернозные поражения такого же размера, но без признаков деструкции, содержат всего 100–1000 бактерий [91]. Мокрота больных кавернозными формами туберкулеза легких, в которой обнаруживаются отторгнутые некротические частицы, содержит огромное количество микобактерий, которые почти всегда обнаруживаются методом прямой бактериоскопии мазков. В отличие от этого мокрота больных с нодулярными инкапсулированными поражениями легких содержит весьма небольшое количество возбудителей, которые не удается обнаружить при бактериоскопии мазков. Данная зависимость была четко продемонстрирована в исследовании, проведенном Ким и соавторами [92].

К недостаткам бактериоскопии относится невозможность идентифицировать принадлежность микобактерии к тому или иному виду, а также определить чувствительность данного штамма к противотуберкулезным препаратам. При антибактериальной терапии обнаружение микобактерий туберкулеза имеет прогностическое значение. Поэтому бактериовыделение оценивается количественно. Также недостатками микроскопии являются

потребность в специализированном обучении и относительно низкая чувствительность, от 50% до 60% в среднем [93].

Преимуществами микроскопии мазка мокроты являются простота, низкая стоимость, скорость получения результатов, и высокая специфичность в странах с высокой распространенностью ТБ. Кроме того, при микроскопии мазка мокроты выявляются большинство инфекционных форм туберкулеза, опасных для окружающих. Микроскопия мазка мокроты может выполняться в лаборатории на уровне первичного звена здравоохранения. Люминесцентная микроскопия увеличивает чувствительность бактериоскопии на 10-30% [94,95,96].

Микроскопия мазка мокроты мало способствует диагностике педиатрического туберкулеза и не выявляет, по определению, ТБ с отрицательным мазком, которые могут составлять от 24% до 61% среди всех случаев легочного туберкулеза у людей, живущих с ВИЧ [97,98].

#### **1.4.2. Первичная изоляция штаммов *M. Tuberculosis* (культуральное исследование)**

*Бактериологическое (культуральное) исследование* включает в себя посев и проведение теста на лекарственную чувствительность. Посев — один из стационарных методов культивирования микроорганизмов на питательных средах, применяемый для культуральной диагностики в медицинской микробиологии, а также для исследования биохимических и биологических свойств в различных биотехнологических целях. В зависимости от содержания исследуемых бактерий в образце, проводят посев на плотные питательные среды (для получения изолированных колоний и определения чистоты культуры). Если в исследуемом материале содержание микроорганизмов незначительное, то посев проводят на жидкие среды обогащения.

Посев – самый высокочувствительный и достоверный метод диагностики туберкулеза в настоящее время. Он заключается в посеве биологического материала от пациента (мокроты, патологического отделяемого свищей и пр.)

на специальные питательные среды для выявления роста микобактерий. Возможность обнаружения кислотоустойчивых микобактерий (КУМ) при бактериоскопическом исследовании зависит от концентрации возбудителей в мокроте. При концентрации бактерий ниже 1 000 в 1 мл вероятность их обнаружения в мазках становится ниже 10%. В сравнении с этим посев позволяет обнаружить гораздо меньшее число КУМ, вплоть до 100 микроорганизмов в 1 мл мокроты[99].

Помимо простого подтверждения туберкулезной природы заболевания, бактериологическое исследование также позволяет точно установить тип возбудителя и выявить его чувствительность к противотуберкулезным препаратам. Культуральные исследования признаны золотым стандартом выявления микобактерий. Для посева патологического материала используют яичные среды: Левенштейна–Йенсена, среду Финна II, Петраньяни и др., а также на агаровые и бульонные среды: Миддлбрук, Огава, Школьниковой и др. [100,101]. Количество микобактерий (или колоний в пробирке при культуральном методе исследования) в процессе химиотерапии является ориентировочным показателем ее эффективности или косвенным свидетельством развития устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам. [102]. Бактериологический посев на специальные среды является более чувствительным методом, нежели бактериоскопия. Для высевания необходимо присутствие 20-100 жизнеспособных МБТ на 1 мл материала. Посев материала на среду Левенштейна–Йенсена проводят в бактериологической лаборатории. Рост первых колоний на классических средах отмечают через 4-8 нед. Современные методы с использованием высокоселективных агаровых и бульонных сред Миддлбрука позволяют выращивать культуры за 1-2 недели, но идентификация микроорганизма требует дополнительного времени. Современную технику посева считают очень информативной и в развитых странах в настоящее время не проводят биологические пробы с заражением морских свинок [103,104,105,106,107].

Продолжительность роста МБТ на твердой яичной среде Левенштейна-Йенсена ограничивает диагностические возможности клиницистов. МБТ выявляются лишь при 52-65% случаев активного туберкулеза легких, а в клинике внелегочного туберкулеза удельный вес их выявления еще ниже. При туберкулезных менингитах лишь в 3% случаев обнаруживается рост микобактерий на питательных средах. Незначительным является удельный вес высеваемости у больных туберкулезом мочеполовой системы. Частота высеивания микобактерий туберкулеза при туберкулезе почек варьирует от 26,7% до 73% случаев [108]. Наблюдаются случаи, когда больные после лечения выделяют значительное количество маложизнеспособных или мертвых МБТ. В таких случаях посеvy дают отрицательные результаты, и бактериоскопические методы являются единственными, с помощью которых удается обнаружить возбудителя туберкулеза. Значительные трудности представляет обнаружение микобактерий у лиц со скудным их выделением. Среди впервые выявленных больных у одной трети бактериовыделение является однократным [93]. С этой точки зрения применение агаровых и бульонных сред Миддлбрук представляет собой хороший дополнительный или альтернативный метод выделения культуры микобактерий туберкулеза. [89, 103, 106].

#### **1.4.3. Определение лекарственной устойчивости и чувствительности к противотуберкулезным препаратам.**

Важной проблемой сегодня является повышенная способность возбудителя к выживанию в среде обитания и все увеличивающееся число устойчивых к противотуберкулезным препаратам форм, в том числе одновременно к нескольким, особенно у впервые заболевших. Проблема резистентности микобактерий туберкулеза (МБТ) становится одной из важнейших в стратегии борьбы с этим заболеванием. По классификации ВОЗ выделяются следующие виды лекарственной резистентности МБТ:

- монорезистентные к 1 противотуберкулезному препарату;

- полирезистентные к 2 противотуберкулезным препаратам и более, но не к сочетанию изониазида и рифампицина;
- множественно лекарственно-устойчивые, (МЛУ, мультирезистентные, Multi-Drug Resistant) как минимум к сочетанию изониазида и рифампицина
- широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ в сочетании с устойчивостью к фторихинолонам и одному их инъекционных препаратов -аминогликозидов).

Всемирная Организация Здравоохранения приняла следующие критерии лекарственной чувствительности и устойчивости, а также определение поли-и мультирезистентности микобактерий туберкулеза [74,109]. Чувствительность микобактерий к противотуберкулезным препаратам определяется неспособностью штамма расти на среде, содержащий препарат, при стандартных условиях постановки опыта. Чувствительными к данному препарату считаются те штаммы микобактерий, на которые этот препарат в критической концентрации оказывает бактерицидное или бактериостатическое действие в соответствии с принятым критерием устойчивости. Устойчивость (резистентность) определяется как снижение чувствительности до такой степени, что данный штамм микобактерий способен размножаться при воздействии на него препарата в критической или более высокой концентрации.

Наряду с понятиями "чувствительность" и "устойчивость" к противотуберкулезным препаратам в настоящее время используются также термины, определяющие различные аспекты лекарственной устойчивости. Так, в случае наличия лекарственной устойчивости к двум или более лекарственным препаратам данный штамм микобактерий определяется как полирезистентный.

Особое место среди полирезистентных занимают микобактерии, у которых обнаруживается лекарственная устойчивость к двум основным противотуберкулезным препаратам (изониазиду и рифампицину). Штаммы, обладающие лекарственной устойчивостью одновременно к изониазиду и рифампицину, независимо от наличия устойчивости к другим

противотуберкулезным препаратам, обозначаются как штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (или штаммы с МЛУ, мультирезистентные штаммы). Уровень устойчивости данного штамма в целом выражается той максимальной концентрацией препарата (количество мкг в 1 мл питательной среды), при которой еще наблюдается размножение микобактерий (по числу колоний на плотных средах).

Лекарственно-устойчивые микроорганизмы способны размножаться при таком содержании препарата в среде, которое оказывает на чувствительной особи бактериостатическое или бактерицидное воздействие. Для различных препаратов установлена определенная критическая концентрация. Она имеет клиническое значение, так как отражает воздействие препарата на микобактерии туберкулеза в условиях макроорганизма [110, 111].

Критерием устойчивости микобактериальной популяции называют показатель роста микобактериального пула, выраженный в абсолютных (число КОЕ, колониеобразующих единиц) или относительных единицах (пропорция КОЕ), на питательной среде, содержащей противотуберкулезный препарат в критической концентрации, превышение которого считается наличием признака устойчивости микобактерий.

Противотуберкулезные препараты подразделяют на основные (первого ряда) и резервные (второго ряда). Основные препараты (препараты первого ряда): изониазид (H)- производное изоникотиновой кислоты (ГИНК), рифампицин (R)- полусинтетическое производное Рифамицина В, продуцируемый антибиотик широкого спектра действия *Amicolatopsis mediterranei*, пиперазид (Z), этамбутол (E)- синтетический препарат с активным действием только в отношении МБТ, стрептомицин (S)- антибиотик широкого спектра действия, продуцируемый *Streptomyces griseus*. Их назначают в виде отдельных или комбинированных лекарственных форм.

Степень лекарственной устойчивости микобактерий определяется в соответствии с установленными критериями, которые зависят как от противотуберкулезной активности лекарственного препарата, так и его

концентрации в очаге поражения, величины максимальной терапевтической дозы, фармакокинетики препарата и многих других факторов [112, 113].

Мультирезистентному ТБ уделяется особое внимание, так как лечение пациентов, у которых процесс вызван такими штаммами, представляет большие трудности [98]. Кроме того, некоторые штаммы с множественной лекарственной устойчивостью обладают повышенной способностью к распространению (трансмиссивностью) и вызывают тяжелые прогрессирующие формы заболевания. Резистентность создает эпидемиологически опасную ситуацию, когда здоровое население инфицируется и заболевает устойчивыми к лекарствам микобактериями [114]. Этим штаммам уделяется особое внимание, так как лечение пациентов, у которых процесс вызван такими штаммами, представляет большие трудности. Оно является длительным, дорогостоящим и требует использования препаратов резервного ряда, многие из которых дорогостоящие и могут вызывать тяжелые побочные реакции [115]. Кроме того, некоторые штаммы с множественной лекарственной устойчивостью обладают повышенной способностью к распространению (трансмиссивностью) и вызывают тяжелые прогрессирующие формы заболевания, нередко приводящие к неблагоприятным исходам [116].

За последние годы произошли важные изменения в диагностике туберкулеза. В 2008 г. быстрые молекулярные тесты на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР, тест Хайна) были рекомендованы ВОЗ для детекции РР-ТБ и МЛУ-ТБ в образцах с положительным мазком мокроты или в культурах. К 2010 году вторая версия теста Хайна вытеснила первую, так как имела определенные преимущества, а именно - способность выявлять туберкулез в образцах с отрицательным мазком мокроты. В 2010 году ВОЗ одобрила первый быстрый молекулярный тест, который может использоваться для одновременной диагностики легочного ТБ и резистентности к рифампицину, Xpert<sup>®</sup> MTB/RIF. Чувствительность теста гораздо более высокая, чем у микроскопии мокроты и сравнима с культурой на твердой среде [117].

Xpert<sup>®</sup>MTB/RIF быстро внедряется в странах. К концу июня 2013 года 1402 машины GeneXpert и 3.2 миллиона картриджей для них были поставлены в 88 из 145 стран по доступным ценам. Почти половина (49%) отчетов из стран и территорий с низким и средним уровнем доходов говорит о том, что технология была включена в национальные руководства[118,119]

Ранняя, точная и быстрая диагностика ТБ и лекарственной устойчивости опирается на правильно скоординированную и оснащенную лабораторную сеть. Лабораторное подтверждение ТБ и ЛУ имеет решающее значение для подтверждения того, что люди с признаками и симптомами туберкулеза правильно диагностированы и имеют доступ к правильному лечению в кратчайшие сроки[120].

Специальные исследования по-прежнему представляют самый распространенный способ получения данных о бремени ЛУ-ТБ в странах с ограниченными ресурсами, где рутинные тесты на лекарственную устойчивость (ТЛЧ) недоступны для всех пациентов из-за недостатка лабораторий или средств. За период с 2010 по 2012 гг. исследования по ЛУ были проведены в 16 странах: Афганистане (Центральный регион), Албании, Бангладеш, Беларуси, Бенине, Болгарии, Кыргызстане, Малави, Нигерии, Саудовской Аравии, Сомали, Таджикистане, Тунисе, Уганде, Узбекистане и Йемене. Дополнительно к этому, Египет, Бразилия, Непал и Замбия закончили повторное исследование.

Возможности лабораторий для проведения ТЛЧ остаются низкими и их проведение недостаточно быстро, чтобы обеспечить диагностикой всех пациентов с МЛУ-ТБ. С 2009 по 2012 гг. процентное соотношение новых и ранее леченных случаев, протестированных ТЛЧ, возросло с 4% до 5% и с 6% до 9% соответственно. Проект EXPANDTB, который стартовал в 2009 г. и развил фазу тестирования в 25 странах, показывает, как сделать возможным рутинное тестирование на лекарственную устойчивость и достичь значительного увеличения детекции случаев МЛУ-ТБ [121].

В ЛУ-исследованиях все больше используются молекулярные технологии для упрощения логистики и уменьшения нагрузки на лаборатории. В 2012 году

в Нигерии для ИЛУ был использован тест Хайна GenoType® MTBDRplus (HainLifescience, Германия), а тест Xpert® MTB/RIF (Cepheid, США), в настоящее время используется в Пакистане. Хотя этот тест и не дает полных данных для определения МЛУ-ТБ, но резистентность к рифампицину является наиважнейшим индикатором для МЛУ-ТБ. Для стран, где нет еще возможности проведения культуральных исследований и ТЛЧ традиционными методами, или где лаборатории не справляются с большой нагрузкой, которая возникает вовремя ИЛУ, Xpert® MTB/RIF может сыграть важную роль. Он может быть использован для скрининга образцов на резистентность к рифампицину и выявить те из них, которые нуждаются в дальнейшем тестировании в национальных или Супра-Национальных лабораториях, к тому же это уменьшает стоимость начального скрининга традиционными ТЛЧ[122].

По всему миру, 3.6% (коэффициент достоверности, КД 95%, диапазон 2.1-5.1%) из всех новых случаев ТБ и 20,2% (КД 95%, 13.3-27.2%) из всех ранее леченных случаев показали наличие МЛУ-ТБ. Эти величины почти не изменились с 2011 года.

Таким образом, лабораторное подтверждение ТБ и ЛУ имеют решающее значение для своевременного выявления и получения доступа к правильному лечению в кратчайшие сроки.

### **1.5. Система эпидемиологического надзора за туберкулезом.**

Эпидемиологический надзор за туберкулезом должен служить двум основным целям. Он должен давать возможность составить точную картину о течении эпидемии туберкулеза в определенной группе населения во времени и позволить своевременно принять практические меры, если наблюдаемая тенденция отклоняется от ожидаемой. Во-вторых, характеристика случая должна быть достаточно подробной, чтобы позволить в сочетании с соответствующими демографическими данными выявить те группы в сообществе, которые подвержены особому риску туберкулеза, с тем чтобы более эффективно нацеливать мероприятия и ресурсы.

У эпиднадзора за туберкулезом есть местные, национальные и международные функции. На местном уровне важно, чтобы органы здравоохранения могли обеспечить: предложение соответствующих лечебных служб отдельным лицам; осуществление выявления контактов; опознание местных вспышек; слежение за местной эпидемиологией.

На национальном уровне акцент другой. Эпидемиологический надзор позволяет органам здравоохранения: следить за эпидемиологией болезней в стране, включая тенденции во времени и вариации в числе новых случаев среди подгрупп населения; сделать первый шаг в процессе контроля за успешностью национальных программ лечения туберкулеза; следить за эффективностью конкретных мер по борьбе с туберкулезом и его профилактикой.

На международном уровне цели заключаются в слежении за эпидемиологией болезни во всем Европейском регионе, включая тенденции во времени и межстрановые сопоставления, а также в выявлении групп населения с высоким числом новых случаев, которые могут быть общими для ряда стран, в целях координации усилий по борьбе с туберкулезом на международном уровне[14,26,29].

Примером эпидемиологического надзора на международном уровне может служить контроль за туберкулезом в странах с высоким бременем туберкулеза. Туберкулез является болезнью нищеты, ежегодно уносящей более одного миллиона человеческих жизней [123]. В глобальных масштабах туберкулез сконцентрирован в странах с низким и средним уровнем дохода. На пять стран — Бразилию, Российскую Федерацию, Индию, Китай и Южную Африку, входящих в группу БРИКС, приходится 46% всех случаев заболевания туберкулезом и 40% всех случаев смерти, связанных с туберкулезом. Только на Китай и Индию приходится почти 40% оцениваемого глобального бремени туберкулеза и такая же доля всех случаев, сообщаемых во Всемирную организацию здравоохранения (ВОЗ). На Южную Африку приходится 30% оцениваемого глобального бремени случаев совместной инфекции туберкулеза и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). В отношении туберкулеза с

множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) на Китай, Индию и Российскую Федерацию, в общей сложности, приходится более половины — 56% оцениваемого глобального бремени. На одну только Бразилию приходится около одной трети оцениваемого бремени туберкулеза и МЛУ-ТБ в западном полушарии[123].

Глобальные усилия по борьбе с туберкулезом привели к значительным успехам. Достигнут большой прогресс в продвижении к текущим целям Партнерства «Остановить ТБ» (сократить в два раза распространенность туберкулеза и смертность от него за период с 1990 по 2015 год) и к Цели тысячелетия в области развития (цель: остановить рост заболеваемости туберкулезом и положить начало тенденции к ее сокращению в 2015 году). Несмотря на этот прогресс, ежегодно около трех миллионов человек, у которых развивается туберкулез, остаются не учтенными национальными системами регистрации; лишь незначительная доля пациентов с МЛУ-ТБ получает лечение, и неимущие и уязвимые люди продолжают диспропорционально страдать от туберкулеза. Пришло время рассмотреть огромные проблемы, которых нельзя будет избежать в повестке дня на период после 2015 года, а также более важную роль, которую страны БРИКС могут и должны играть в борьбе с туберкулезом. Пять стран БРИКС были объединены в одну группу, потому что все они являются странами с быстро развивающейся экономикой. Помимо этого, они имеют еще одно сходство — на каждую из них приходится самое большое число случаев заболевания туберкулезом среди стран или территорий соответствующего региона ВОЗ. В том, что касается туберкулеза, в каждой из этих стран имеются свои недостатки и проблемы. Южная Африка имеет непомерное бремя туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией. Бразилия и Российская Федерация прилагают усилия для ликвидации интенсивных очагов туберкулеза среди некоторых из самых уязвимых групп населения, включая людей без определенного местожительства, людей, находящихся в местах лишения свободы, людей, употребляющих наркотики, и представителей коренного населения. Китай в настоящее время столкнулся с необходимостью

срочного расширения доступа к лечению МЛУ-ТБ. На Индию приходится самое большое число неучтенных случаев заболевания по сравнению с другими странами, а оценить качество лечения туберкулеза, предоставляемого очень активным и разнообразным частным сектором в стране, непросто. Несмотря на эти многочисленные проблемы, пять стран БРИКС часто рассматриваются в качестве региональных и глобальных лидеров в области борьбы с туберкулезом. Они предоставляют модели лечения и совместно работают в области активизации усилий, которые могут сыграть решающую роль в установлении и достижении будущих глобальных целей в борьбе с туберкулезом. На ряде примеров видно, как эти страны широкомасштабно решают местные проблемы, предоставляют важные фактические данные для улучшения профилактики и лечения туберкулеза и оказывают критически важную политическую поддержку для продвижения новых инициатив и стратегий в отношении туберкулеза [124].

Для сдерживания и обращения вспять эпидемии необходимы безотлагательные и устойчивые усилия всех заинтересованных сторон, — заявила д-р Кэрин Уэйер (Karin Weyer). Улучшенные диагностические методики и расширенный доступ означают, что выявляется и лечится большее число пациентов. Но пробелы между выявляемым числом случаев заболевания и числом людей, в действительности начинающих получать лечение, расширяются, и поэтому срочно необходимо усиление приверженности и расширение финансирования для тестирования и лечения каждого пациента.

Специальное приложение к докладу ВОЗ этого года посвящено эпидемиологическому надзору за устойчивостью к противотуберкулезным препаратам, который ведется уже 20 лет. В нем описаны ответные меры на МЛУ-ТБ, принимаемые на сегодняшний день, и изложены приоритетные действия, которые сейчас необходимо предпринять на пути от профилактики до излечения. Эпиднадзор за устойчивостью к противотуберкулезным препаратам стал первопроходцем в глобальных усилиях по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам (УПП). В связи с

возрастающим числом лабораторий, использующих экспресс-тесты, с 2009 года число диагностируемых случаев заболевания МЛУ-ТБ утроилось. В 2013 году было выявлено 136 000 случаев заболевания МЛУ-ТБ, и начато лечение 97 000 человек. Хотя число пациентов, находящихся на лечении, в 2009 году утроилось, по меньшей мере 39 000 пациентов, у которых была диагностирована эта форма туберкулеза, не получали лечения в прошлом году, а в глобальных масштабах было излечено лишь 48% пациентов[125,126,127].

Предупреждение туберкулеза представляет собой гораздо более разумное и экономичное мероприятие, чем лечение уже развившегося заболевания. Для предупреждения туберкулеза у детей необходимы следующие мероприятия: совершенствование методов противотуберкулезной иммунизации, выявление и химиопрофилактика лиц с повышенным риском заболевания туберкулезом, охрана детей от заражения туберкулезом (санитарная профилактика), использование мер, направленных на укрепление защитных сил организма, повышение их неспецифической резистентности (социальная профилактика) и многое другое.

Особое значение имеют специфическая внутрикожная вакцинация новорожденного в роддоме. Все дети при рождении должны получить прививку против туберкулеза. В Российской Федерации проводится, и ревакцинация БЦЖ в 7 и 14 лет.

Одним из основных методов предупреждения туберкулеза у детей является химиопрофилактика, которая разделяется на первичную (введение противотуберкулезных препаратов здоровым, неинфицированным детям) и вторичную (введение препаратов здоровым, но инфицированным туберкулезом лицам). Показания к химиопрофилактике или профилактическому (превентивному) лечению должны устанавливаться только врачом-фтизиатром.

Наибольшую опасность заболевания туберкулезом имеют дети, находящиеся в контактах с больными туберкулезом людьми и животными. Для данной категории населения существуют особые методики профилактических

мероприятий, которые осуществляются фтизиатрами противотуберкулезных диспансеров и врачами общей лечебной сети.

Основным методом диагностики и выявления туберкулезной инфекции у детей во всем мире является туберкулинодиагностика. В России для этой цели используются туберкулин в стандартном разведении с 2ТЕ. Туберкулинодиагностика как специфический диагностический тест применяется при массовых обследованиях населения на туберкулез, а также в клинической практике для диагностики туберкулеза. При массовых обследованиях населения на туберкулез туберкулинодиагностику применяют для своевременного выявления больных, инфицированных туберкулезом, лиц с повышенным риском заболевания (впервые инфицировавшихся, с гиперэргическими и усиливающимися реакциями на туберкулин), для отбора контингентов, подлежащих ревакцинации против туберкулеза, для определения инфицированности и риска заражения населения с целью анализа эпидемиологической ситуации по туберкулезу. Для этих целей используют единую внутрикожную туберкулиновую пробу Манту с 2 туберкулиновыми единицами (2 ТЕ) очищенного туберкулина (ППД-Л) в стандартном разведении (аллерген туберкулезного, очищенного жидкого в стандартном разведении для внутрикожного применения) - готовая форма. В целях клинической диагностики в противотуберкулезных диспансерах и стационарах, кроме пробы Манту с 2 ТЕ очищенного туберкулина в стандартном разведении, можно применять пробу Манту с различными дозами туберкулина и другие методы исследования чувствительности к туберкулину (градуированная кожная проба, подкожная проба Коха, определение туберкулинового титра, эозинофильно-туберкулиновая, гемо-и-белковотуберкулиновая, иммуно-туберкулиновые пробы и др.). С этой целью используют сухой очищенный туберкулин и альттуберкулин (АТ). В дифференциально-диагностических случаях также в условиях диспансера или стационара при наличии отрицательной пробы Манту с 2 ТЕ ППД-Л можно ставить пробу Манту со 100 ТЕ ППД-Л или в разведении 1:100 АТ. При отрицательном результате последней пробы в большинстве

случаев можно считать организм свободным от туберкулезной инфекции[127,128].

Таким образом, на современном этапе развития эпидемического процесса при туберкулезе необходимо обратить особое внимание на диагностику ЛУ форм туберкулеза, расширение доступа к лечению всех пациентов для дальнейшего снижения распространенности и смертности от заболевания.

## **ГЛАВА II.**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **2.1 Объекты и объемы исследований**

Для решения поставленных задач диссертации были изучены данные о заболеваемости, распространенности туберкулезом населения и смертности от него в Кыргызской Республике, в половом и возрастном аспекте. Указанные показатели были изучены среди населения и в Государственной системе исполнения наказаний (ГСИН) Были использованы данные статистических отчетных форм Республиканского медико-информационного центра Министерства Здравоохранения Кыргызской Республики (РМИЦ МЗ КР), Национального фтизиатрического центра (НЦФ). Для расчета показателей использованы данные по численности населения по возрасту, полу в разрезе регионов из базы данных Национального статистического комитета (НСК) Кыргызской Республики

Верификация диагноза проводилась на основании микроскопических, бактериологических и молекулярно генетических исследований, которые проводились на базе лабораторий НЦФ.

Градация бактериовыделения и разделение больных туберкулезом (ТБ) на категории: вновь выявленный случай ТБ и ранее леченый случай ТБ проведены в соответствии с классификацией ВОЗ и Национального Руководства по борьбе с туберкулезом, 2008[14,130]

#### **2.2 Лабораторные методы исследования**

Микроскопия клинического материала, является основой предварительного диагноза микобактериальной инфекции, в то время как культуральное выделение микобактерий часто обеспечивает постановку точного диагноза заболевания, вызванного микобактериями туберкулезного

комплекса (МТК) или нетуберкулезными микобактериями (НТМ). До 50-60% клинических образцов, «отрицательных по микроскопии» могут давать рост кислотоустойчивых микроорганизмов. Следовательно, культуральные методы играют ключевую роль в диагностике микобактериальных инфекций. 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, на основе которых разработаны автоматизированные системы, способствующие быстрому росту микобактерий, повышению специфичности, сокращения времени детекции и идентификации микобактерий в клинических образцах (ВАСТЕС 460, ВАСТЕСМВ9000 и ВАСТЕСМГИТ 960 (BectonDickinson), «MB/BactALERT 3DSystem (OrganonTeknica)» и др.). Кроме того, для выделения микобактерий использовали посеvy на плотную агаровую среду Миддлбрук 7Н11 (чашки), преимуществом которой, несмотря на более поздние сроки выделения по сравнению с жидкими средами, является возможность выявления смешанных культур нескольких видов микобактерий, наличия контаминации и изучения морфологии и пигментации колоний выросших культур [131].

Также в исследовании проверялась частота встречаемости мутаций и их распределение между старыми и новыми случаями пациентов.

Тесты на лекарственную чувствительность к изониазиду, рифампицину, дигидрострептомицину сульфату, этамбутолу гидрохлорид проводили в параллельных исследованиях, по следующей схеме:

- культуры МБТ, полученные на системе ВДВАСТЕСМГИТ 960 исследовали на лекарственную чувствительность на системе ВДВАСТЕСМГИТ 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 BDBASTЕСMGIT 960 – 42 дня.

На основании полученных данных нами были рассчитаны основные показатели теста лекарственной чувствительности на системе BDBASTЕСMGIT 960 по отношению к определению лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций на питательной среде Левенштейна-Йенсена. В нашем исследовании чувствительность (Se) показывает процент верно идентифицированных лекарственно-устойчивых штаммов к противотуберкулезному препарату - способность определять истинную лекарственную устойчивость, специфичность (Sp) показывает процент верно идентифицированных лекарственно-чувствительных штаммов к ПТП - способность определять истинную лекарственную чувствительность, эффективность теста (частота правильных результатов к общему числу результатов) [125].

Чувствительность, специфичность и оценку эффективности рассчитывали по общепринятым формулам:

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

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

c – устойчивые по результатам Л-Й, но чувствительные по BDBASTЕСMGIT 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 BDBASTЕСMGIT 960.

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

А 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.

### **Сбор и подготовка биоматериала для исследования**

Сбор мокроты для исследования на микобактерии туберкулеза – весьма ответственный преаналитический этап диагностической процедуры, от четкости проведения, которого во многом зависит результат исследования. В связи с наличием очень высокого риска воздушно-капельного распространения инфекции в момент откашливания, сбор мокроты производился в специально выделенном для этих целей отдельном хорошо вентилируемом помещении (пункте сбора мокроты), оснащенном бактерицидными лампами и средствами дезинфекции. При этом пациенты предварительно полоскали полость рта кипяченой водой для механического удаления основной части вегетирующей в ротовой полости микрофлоры и остатки пищи, загрязняющие мокроту и затрудняющие ее обработку.

Образцы материала для исследования собирали в стерильные контейнеры (флаконы) с маркировкой «PP HD» (полипропилен высокой плотности) с герметично закрывающимися крышками и при необходимости хранили при температуре 2–6°C (в бытовом холодильнике) до доставки в лабораторию. Образцы патологического материала в лабораторию доставлялись в транспортных контейнерах, следуя правилам безопасности при транспортировке инфекционного материала [132]. В условиях жаркой погоды были использованы контейнеры со встроенными охлаждающими элементами, с

целью поддержания соответствующей температуры (+4°C) во время транспортировки. Общее время хранения образца, включая доставку, не превышало 3-х суток при температуре 2–6°C.

Если мокрота была собрана не в 50 мл пробирку, а в другую посуду, образец переносили в 50 мл пробирку с закручивающейся крышкой. Раствор для разжижения и деконтаминации мокроты готовили в день использования. Для этого раздавливали ампулу с N-ацетил-L-цистеином, находящуюся во флаконе с раствором BBLMycoPrepNALC-NaOH перемешивали содержимое пробирки путем многократного переворачивания в течение 15-30 сек, при этом образец и вся внутренняя часть пробирки (включая крышку) должны были полностью перемешаться с раствором NALC-NaOH. Для этой цели использовали вортекс. Инкубировали пробирку со смесью при комнатной температуре в течение 15 мин., перемешивая содержимое пробирки путем переворачивания каждые пять минут. При использовании шейкера скорость вращения была умеренной. Избегали резкого встряхивания пробирки и вспенивания содержимого, так как при этом могло произойти окисление N-ацетил-L-цистеина и его инактивация. Оставляли пробирку на 5 минут в штативе для осаждения аэрозоля. Доводили объем образца в пробирке до 50 мл путем добавления холодного стерильного (+4°C) фосфатного буфера (BBLMycoPrepPhosphateBuffer).

Полученный материал использовали в следующем порядке:

- a. для приготовления мазков для микроскопии;
- b. для посева на питательные среды для культурального исследования;

### **Микроскопия клинического материала**

Все образцы мокроты микроскопировали обычным способом под иммерсионным объективом (x100) на наличие кислотоустойчивых микроорганизмов при окраске по Цилю-Нильсену или флюорохромами, в соответствии с рекомендациями Приказа МЗ КР №670 от 14.01.2014.

### **Культуральное выделение микобактерий**

Для сравнения эффективности выделения микобактерий образцы клинического материала были посеяны параллельно на три различные питательные среды:

1. яичную среду Левенштейна-Йенсена (Л-Й),
2. жидкую среду Миддлбрук 7Н9 в автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 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. Засев разведений  $5 \times 10^3$  и  $5 \times 10^4$  должен дать рост 1–10 и 10–100 колоний соответственно. При таком росте на контролируемых средах они считались удовлетворительными. Контроль ростовых свойств среды проводили одновременно с посевом диагностического материала. В случае отрицательных результатов посева, среда считалась неудовлетворительного качества и остатки незасеянной среды уничтожались.

Только после идентификации колоний проводили количественную оценку интенсивности роста по результатам подсчета числа колониобразующих единиц (КОЕ), выросших в пробирках. Интенсивность роста оценивали по 3-балльной системе:

- (1+) – 1–9 число КОЕ - скудное бактериовыделение;
- (2+) – 9–100 КОЕ - умеренное бактериовыделение;
- (3+) – >100 КОЕ - обильное бактериовыделение (сплошной рост) [133].

**Первичная изоляция комплекса M.Tuberculosis на плотной агаровой среде Миддлбрук 7Н11 и определение лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам через систему ВАСТЕСМГИТ 960**

Система MGIT (MycobacteriaGrowthIndicatingTube) предназначена для ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза и определения чувствительности микобактерий туберкулеза к препаратам первого ряда и некоторым препаратам второго ряда. Эта система осуществляет постоянный компьютерный мониторинг состояния бактериальной популяции и сигнализирует о размножении минимального числа микроорганизмов.

В основу технологии детекции заложено использование пробирки BDBBL™ MGIT™ с модифицированной средой Middlebrook 7H9 и встроенным флуоресцентным индикатором, который инактивирован высокими концентрациями кислорода [134,135]. Кислород-зависимый флюорохромный краситель содержится на дне специальной пробирки и покрыт слоем силикона. Изначально, концентрация кислорода в среде достаточно велика, что вызывает гашение флюоресценции. Размножение микобактерий приводит к потреблению кислорода в пробирке и снижению его концентрации, что вызывает усиление флюоресценции. Флюоресценция становится видимой при облучении пробирки ультрафиолетовым (УФ) светом и автоматически регистрируется фотодатчиками, встроенными в прибор ВАСТЕС 960. Интенсивность свечения регистрируется в единицах роста (GU — growthunits). Контроль за внесенным в индикаторную пробирку материалом осуществляет встроенный в прибор компьютер [136,137].

Лекарственная чувствительность микобактерий туберкулеза определяется на основе модифицированного метода пропорций. В процессе определения происходит сравнение скорости роста микобактерий туберкулеза в контрольной пробирке и в пробирках с лекарственными препаратами. Для определения чувствительности к стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу используют обогащающие добавки и антибиотики, входящие в

набор SIREkit. Для определения чувствительности к пипразинамиду используют набор PZAkit.

Испытания, проведенные во многих лабораториях мира, показали, что применение автоматизированных систем в лабораторной практике позволяет: сократить сроки выявления микобактерий из диагностического материала в среднем до 3–20 дней и сократить сроки определения лекарственной чувствительности микобактерий до 5–14 дней [138, 139].

#### Инокуляция материала в пробирки MGIT

Надписывали на пробирках идентификационные лабораторные номера. С помощью стерильной одноразовой пипетки переносили 0,5 мл концентрированного деконтаминированного биологического материала в маркированные пробирки MGIT. Перед посевом материал хорошо перемешивали (пипетированием). Для каждого образца использовали новую стерильную одноразовую пипетку. После использования утилизировали пипетку в емкость с дезраствором или в емкость для автоклавирования. Немедленно после инокуляции плотно завинчивали крышку пробирки и перемешивали содержимое путем аккуратного переворачивания несколько раз. Обработывали снаружи пробирки и пробки соответствующим дезинфицирующим средством, помещали пробирки в штатив и давали постоять 30 мин при комнатной температуре.

#### Инкубация пробирок в системе BACTEC 960

Выдвигали один из ящиков прибора MGIT и нажимали кнопку «tubeenter» («Загрузка пробирки») (рис 2. 1). При этом загоралась лампа сканера для считывания штрих-кода с пробирки. Считывали сканером штрих-код с пробирки с посевом и устанавливали ее в гнездо, которое указывал прибор. Ежедневно проверяли показания прибора на предмет наличия положительных и отрицательных результатов. О положительных результатах (т.е. о начале роста микроорганизмов в пробирках) прибор сообщал появлением красной индикации, на наружной панели соответствующего ящика и «+» на экране прибора с точным указанием местоположения пробирки. При наличии

индикации о положительном результате открывали указанный ящик, нажимали на кнопку «positive» («положительный результат»), извлекали пробирку из указанного прибора гнезда и сканировали штрих-код извлеченной пробирки.

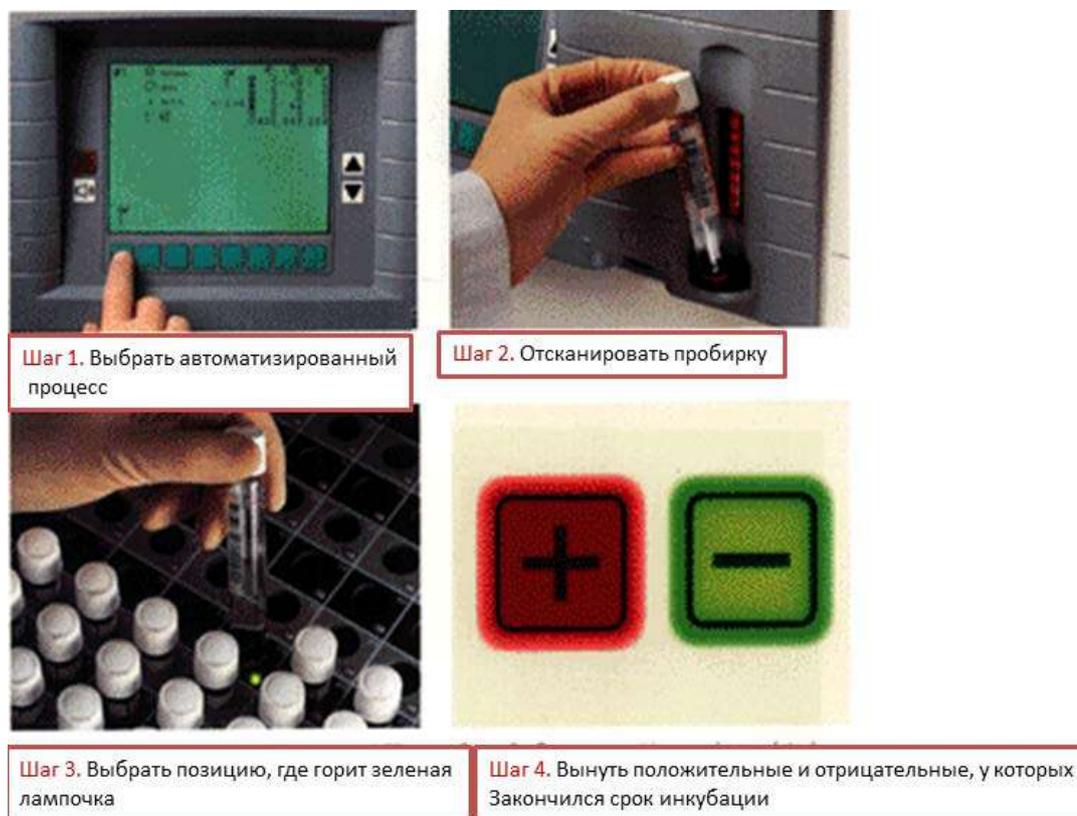


Рис. 2.2.1. Последовательность шагов при работе с аппаратом ВАСТЕС 960.

Просматривали пробирку и визуально определяли наличие роста микобактерий. Обычно рост проявляется появлением своеобразной «зернистости» в среде или белых хлопьев, при этом мутность среды может почти не проявляться. Как правило, рост микобактерий сосредоточен на дне пробирки. Сильная мутность среды может свидетельствовать о наличии контаминации посторонней флорой.

Содержимое из «положительной» пробирки использовали (в указанном порядке) для:

1. посева на кровяной агар для контроля контаминации;

2. субкультивирования на средах Левенштейна-Йенсена и на среде с натрий салициловокислым/пара-нитробензойной кислотой;

3. Приготовления мазков.

Максимальное время инкубации пробирок в приборе MGIT — 42 дня. Пробирки, в которых рост микобактерий не зафиксирован прибором в течение указанного времени, идентифицируются системой как «отрицательные». В этом случае прибор сообщает появлением зеленой индикации, на наружной стороне соответствующего ящика и «?» на экране прибора с точным указанием местоположения пробирки.

При наличии сомнений в правильности отрицательного результата (т.е. наличие мутности, зернистости и т.д.), готовили мазки для микроскопического исследования, производили посев материала на кровяной агар для контроля контаминации и на среду Левенштейна-Йенсена.

**Приготовление мазков из пробирок MGIT для микроскопического исследования (подтверждение положительных результатов и контроль отрицательных результатов).**

Перемешивали содержимое пробирки на вортексе. Оставляли на 5 минут. Используя стерильную пипетку, извлекали небольшое количество среды. Помещали 1–2 капли этой жидкости на предметное стекло и распределяли ее на площади приблизительно 1 x 2 см. Оставляли мазки для высыхания на воздухе при комнатной температуре. Фиксировали мазки, проводя их трижды через пламя горелки, либо с помощью настольного нагревателя (сухожарового шкафа) при температуре 80–85°C в течение часа. Окрашивали мазки по Цилю-Нильсену. Микроскопировали мазки обычным способом под иммерсионным объективом (x100). Наличие кислотоустойчивых колоний в виде «кос» как правило, означало наличие микобактерий туберкулеза. Наличие отдельных кислотоустойчивых бактериальных клеток требовало идентификации культуры

Контроль контаминации.

1. Производили посев жидкость из пробирки MGIT на чашки с кровяным агаром
2. Инкубировали в течение 24-х часов в термостате при +36°C
3. Наличие роста микроорганизмов на чашке свидетельствовали о контаминации материала.

Выделение микобактерий из контаминированных образцов.

Если путем посева на кровяной агар, либо иную питательную среду, контаминация образца в пробирке была подтверждена, а результат микроскопии материала из пробирки «отрицательный», образец уничтожали, в ответе указывали, что образец контаминирован.

Если контаминация подтверждена, а результат микроскопии «положительный», проводили повторную деконтаминацию и выделяли чистую культуру микобактерий.

Исследование лекарственной чувствительности микобактерий (ТЛЧ) в системе MGIT.

Тесты на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) проводили по следующей схеме:

1. Положительный результат на системе MGITI положительный результат на плотной среде Л-Й: Культура MGIT ТЛЧ MGIT Культура Л-Й ТЛЧ Л-Й
2. Положительный результат на системе MGIT и отрицательный результат на плотной среде Л-Й: Культура MGIT ТЛЧ MGIT ТЛЧ Л-Й
3. Отрицательный результат на системе MGITI положительный результат на плотной среде Л-Й: Культура Л-Й ТЛЧ MGIT ТЛЧ Л-Й

Растворение препаратов и добавление в пробирки со средой.

Стандартные концентрации препаратов для использования в системе MGIT (мкг/мл): STR 1,0; INH 0,1; RIF 1,0; EMB5,0; PZA 100,0

ТЛЧ проводили по схеме, представленной ниже.

Растворяли препараты (поставляются лиофилизированными во флаконах) путем добавления 4 мл стерильной дистиллированной или деионизированной

воды во флаконы со стрептомицином, изониазидом, рифампицином и этамбутолом; добавляли 2,5 мл воды во флакон с пиразинамидом маркировали пробирки MGIT, указывая на них номер образца, наименование препарата и предназначение пробирки. На каждого пациента готовили 7 пробирок: контроль SIRE, контроль PZA, 5 пробирок с препаратами:

- SIREGC: MGIT пробирка для SIRE-контроля, не содержащая SIRE-препараты
- STR 1,0: MGIT пробирка
- INH 0,1: MGIT пробирка
- RIF 1,0: MGIT пробирка
- EMB 5,0: MGIT пробирка
- PZAGC: MGIT-PZA пробирка для PZA-контроля, не содержащая препарат
- PZA 100: MGIT-PZA пробирка с препаратом PZA

С помощью пипетки со стерильным наконечником добавляли 100 мкл раствора препаратов (стрептомицина -S, изониазида -I, рифампицина -R, этамбутола -E и пиразинамида -P - в соответствующие маркированные пробирки MGIT.

Использовали отдельные наконечники для каждого препарата. С помощью пипетки со стерильным наконечником добавляли по 800 мкл соответствующих добавок в пробирки с препаратами и контрольные пробирки (добавку PZA-supplement — в пробирку с пиразинамидом и PZA-контроль, добавку SIRE-supplement — в пробирки со стрептомицином, изониазидом, рифампицином, этамбутолом и SIRE-контроль). Конечные концентрации в тестовых пробирках показаны в таблице 2.2.1

Таблица 2. 2.1- Концентрации лекарственных препаратов в пробирках MGIT

Лекарственный препарат	Концентрация лекарственного препарата после восстановления	Объем, добавляемый в пробирки MGIT для тестирования	Конечная концентрация в пробирках MGIT
MGIT STR	83 мкг/мл	100 мкл	1,0* мкг/мл
MGIT INH	8,3 мкг/мл	100 мкл	0,1* мкг/мл
MGIT RIF	83 мкг/мл	100 мкл	1,0* мкг/мл
MGIT EMB	415 мкг/мл	100 мкл	5,0* мкг/мл

\* Эквивалентно концентрациям лекарственных препаратов в соответствии с рекомендациями CDC [140].

Приготовление взвеси микобактерий (после культивирования в пробирке MGIT) для посева на ТЛЧ

Важным фактором является «возраст» культуры в днях, прошедших с момента индикации «положительно» в системе MGIT. День, в который данная культура была впервые идентифицирована системой как положительная, считается «нулевым» (день 0). Для получения культуры, пригодной к дальнейшим тестам на ТЛЧ, пробирку необходимо инкубировать в системе ВАСТЕС по меньшей мере еще сутки (т.е. до дня 1). Если пространство в системе является критичным фактором, сдерживающим скорость работы, пробирка может быть удалена из системы после дня 0 (т.е. после получения положительного ответа) и культивироваться в последующие дни в термостате при 37°C.

Культура, пригодна для посева на ТЛЧ в течение пяти дней, следующих за днем 0 (т.е. в течение дней 1–5). Если культура инкубировалась в системе или термостате более 5 дней после сообщения о положительном результате (т.е. начиная с дня 6 и далее), она была идентифицирована как непригодная к проведению ТЛЧ в системе MGIT.

С целью проведения ТЛЧ на этой культуре небольшой объем 0,5 мл этой культуры засеивали в свежую пробирку MGIT и культивировали, как обычно для получения положительного ответа:

- Энергично встряхивали пробирку (желательно на вортексе) для ее гомогенизации и измельчения имеющихся сгустков (скоплений микобактерий);
- Оставляли пробирку стоять в течение 5–10 мин для осаждения крупных частиц;
- Для культуры в течение дней 1–2: использовали надосадочную жидкость для инокуляции пробирок с препаратами.
- Для культур в возрасте 3,4,5 дней со дня положительной индикации роста в системе MGIT, данную процедуру проводили только после того, как в отдельную стерильную пробирку помещали 1 мл надосадочной жидкости и разводили ее 4 мл стерильного изотонического раствора NaCl, получив, таким образом, разведение 1:5. Использовали его для инокуляции пробирок с препаратами.

Готовили разведение взвеси микобактерий 1:100 для посева на контрольные пробирки SIRE. Для этого добавляли 0,1 мл суспензии микроорганизмов (надосадочной жидкости 1–2-дневной культуры или разведения 1:5 трех-пятидневной культуры) в пробирку с 10 мл стерильного изотонического раствора NaCl. Хорошо перемешивали и использовали для посева в контрольные пробирки (без препаратов).

**Определение лекарственной чувствительности M.Tuberculosis культивированного на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена к противотуберкулезным препаратам ина жидкой среде Миддлбрука 7H9 в автоматизированной системе (BACTECMGIT 960, BectonDickinson)**

Использовали для постановки ТЛЧ культуру с плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена не старше 15 дней с момента появления роста микобактерий. С помощью петли (можно использовать стерильный шпатель или деревянный аппликатор) собирали как можно больше колоний с поверхности среды. Избегали попадания самой среды на петлю. В стерильную стеклянную пробирку добавляли 4 мл среды BBLMiddlebrook 7H9 (или 4 мл

0,85% (изотонического) раствора NaCl) и помещали туда 8–10 стеклянных бусин диаметром 3 мм. Переносили собранные колонии в пробирку со средой и стеклянными бусинами. Плотнo закрывали пробку и суспендировали на вортексе в течение 1–3 минут для полного измельчения сгустков. Контролировали мутность суспензии по стандарту мутности McFarland (мутность суспензии должна быть более 1,0). Оставляли пробирку с суспензией на столе на 20 мин для осаждения крупных частиц. Аккуратно переносили надосадочную жидкость пипеткой в другую стерильную пробирку, не касаясь осадка на дне пробирки. Оставляли пробирку с надосадочной жидкостью на столе на 15 минут для осаждения всех оставшихся частиц. Аккуратно переносили надосадочную жидкость в следующую стерильную пробирку не касаясь осадка. Контролировали мутность полученной суспензии по стандарту мутности (она должна быть больше 0,5 ед.). Доводили мутность суспензии точно до 0,5 единиц путем добавления в пробирку стерильного изотонического раствора. Разводили полученную суспензию в соотношении 1:5 стерильным изотоническим раствором. Использовали полученное разведение (1:5) для инокуляции в пробирки MGIT с препаратами.

Для посева в контрольные (без препаратов) пробирки готовили разведение полученной суспензии (1:100). Для этого добавляли 0,1 мл полученной суспензии в пробирку с 10 мл стерильного изотонического раствора NaCl и перемешивали. Использовали данное разведение для посева в контрольные пробирки.

#### Инокуляция и инкубация

Маркировали пробирки (идентификационными номерами) из расчета 7 пробирок на одну культуру: 2 пробирки контрольных (SIRE и PZA), по одной пробирке для каждого из пяти используемых препаратов. Вносили стерильной пипеткой (или пипеткой со стерильным наконечником) 0,5 мл разведения 1:100 в пробирки без препаратов, которые используются для контроля роста микобактерий при тестировании на чувствительность к стрептомицину, изониазиду, рифампицину, этамбутолу. Вносили стерильной пипеткой (или

пипеткой со стерильным наконечником) 0,5 мл разведения 1:10 в пробирки без препаратов, которые используются для контроля роста микобактерий при тестировании на чувствительность к пипразинамиду. Вносили по 0,5 мл суспензии микобактерий 1:5, полученной из культуры, выращенной на плотной среде (см. п. 7.2.), или суспензии 1–2-дневной культуры микобактерий или разведения 1:5 3–5 дневной культуры микобактерий, выращенных в системе MGIT (см. п.7.1) в каждую из пяти пробирок с препаратом (S,I,R,E, иPZA);

Немедленно после инокуляции, плотно завинчивали пробки пробирок, перемешивали переворачиванием несколько раз, устанавливали пробирки в нужном порядке держатель MGIT, и помещали их в ящики прибора MGIT в гнезда, указанные прибором.

Длительность проведения ТЛЧ в системе обычно составляет от 4 до 21 дня. Система MGIT проводит автоматический мониторинг роста микобактерий и сообщает о завершении теста при достижении определенного значения единиц роста в контрольной пробирке. При получении такого сообщения все пробирки, в которые был посеян данный материал, извлекались из прибора и сканировались для получения окончательного результата исследования. Результат выдается системой в виде сообщений «R - resistant» (устойчив) либо «S-Sensitive» (чувствителен). Пробирки с выросшей культурой издают свечение в ультрафиолетовом свете (Рис.2.2.2). В бульоне культура МТБ выглядит как крупинки или хлопья (Рис.2.2.3)

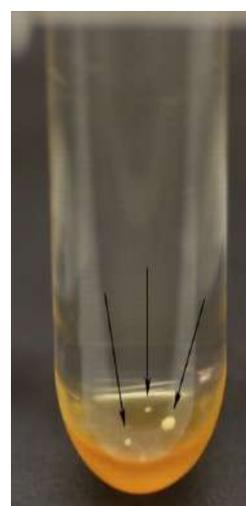
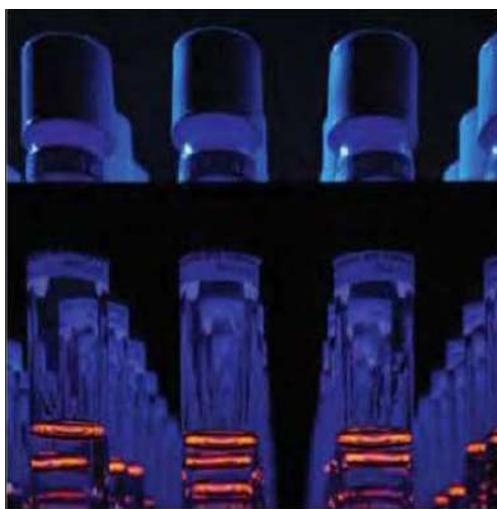


Рис. 2.2.2. Пробирки MGIT в УФ свете. Рисунок 2.2.3. Культура МТБ.

Определение результатов системой производится путем измерения интенсивности свечения в пробирках с препаратами и контрольной пробирки. При наличии роста в контрольных пробирках ранее 4-го дня (что может свидетельствовать о контаминации), либо его отсутствии по истечении 21 дня, система выдает сообщение «X - Error» («ошибка»). Это же сообщение может выдаваться и при возникновении других обстоятельств, влияющих на качество теста. При получении сообщения об ошибке, пробирки извлекали из прибора, инокулировали новые порции суспензии микобактерий в свежие пробирки и повторяли исследование.

Прибор ВАСТЕС 960 MGIT выполняет контроль наборов тестов чувствительности до определения чувствительности или устойчивости. После завершения тестирования набора прибор ВАСТЕС 960 MGIT выдает результаты через принтер [136].

### **Изучение устойчивости микобактерий к лекарственным средствам, путем использования GenoTypeMTBDRplus**

Тест GenoTypeMTBDRplusVER 2.0 - это качественный тест для диагностики *in vitro*, для идентификации комплекса *Mycobacterium tuberculosis* и определения его устойчивости к Рифампицину (RMP) и/или Изониазиду (INH) в положительных или отрицательных образцах мокроты и культивированных образцах. Тест GenoTypeMTBDRplus основан на DNA•STRIP технологии. В Кыргызстане данный вид исследования внедрен с 2011 года [141,142, 143].

В качестве исходного материала для выделения ДНК можно использовать образцы от пациентов с положительными и отрицательными результатами микроскопии, это может быть мокрота (отделяемое или мокрота), бронхиальный материал (например, бронхоальвеолярные смывы), или аспираты (например, плевральный аспират), а также культивированные образцы (плотные/жидкие среды). В туберкулёзный комплекс, тестируемый данным методом, входят следующие микобактерии, вызывающие ТВ:

1. *M. tuberculosis*
2. *M. africanum*

3. *M. bovis* подвид *bovis*
4. *M. bovis* подвид *caprae*
5. *M. bovis* BCG
6. *M. microti*
7. *M. canettii*
8. *M. pinnipedii*

Тест GenoTypeMTBDRplus рассчитан на определение устойчивости комплекса *M. tuberculosis* только в тех случаях, когда её происхождение связано с наличием мутаций в участках генах *groB*, *katG* и *inhA*. Резистентность, вызванная мутациями других генов или областями генов, так же, как и другие механизмы устойчивости к рифампицину и изониазиду, в данной тест-системе не выявятся.

Как и любая методика, основанная на ДНК, данный тест лишь обеспечивает скрининг последовательностей нуклеиновых кислот, а не аминокислот.

GenoTypeMTBDRplus выдаёт качественные результаты. Интенсивность полосок на стрипах не даёт информации о количестве клеток в положительных образцах.

Данный тест работает только в пределах участка генома, из которого были выбраны праймеры и зонды. Как и в любой системе детекции на основе гибридизации, в данной тест-системе допускается возможность того, что вариации последовательности в участке генома, для которого выбраны праймеры и пробы, но для детекции которых тест-система не предназначена, могут привести к ложным результатам. По причине высокой вариабельности бактериального генома, возможно, что определенные подтипы не будут распознаны.

#### *Меры предосторожности при работе с образцами*

Образцы от пациентов и культуры, полученные из образцов пациентов, рассматривались, как потенциально инфекционные, и работали с ними в соответствии с правилами биологической безопасности [143].

## Методика проведения

### Подготовка

Клинические образцы обрабатывались NALC/NaOH по методу, описанному в публикации CDC «PublicHealthMycobacteriology: A guide for the Level III Laboratory» [144]. После деконтаминации, клеточный осадок ресуспендировали в не более чем в 1-1,5 мл фосфатного буфера. Обработку потенциально инфекционных образцов проводили в БШБ II класса. Были использованы деконтаминированные образцы от пациентов, а также культуральные изоляты с плотной среды Левенштейна-Йенсена или жидкой среды BACTEC™ MGIT™ 960 System.

Чтобы получить правильные результаты и избежать контаминации, строго придерживались установленного протокола и процедуры тестирования. Процедура проведения теста подразделялась на три этапа: выделение-экстракция ДНК из клинических образцов (легочных, деконтаминированных) или культивированного материала (плотные/жидкие среды), мультиплексная амплификация с биотинилированными праймерами и реверс-гибридизация.

Все реагенты, необходимые для амплификации были включены в Амплификационную смесь (Amplification Mixes A и B (AM-A и AM-B)) и оптимизированы для данного теста. Мембраны стрипов покрыты специфическими зондами, комплементарными к амплифицированным нуклеиновым кислотам. После химической денатурации, одноцепочечные ампликоны связываются с зондами (гибридизация). Высокоспецифичное связывание комплементарных цепей ДНК обусловлено жёсткими условиями, которые создаются в результате оптимального сочетания состава буфера и определённой температуры. Таким образом, зонды могут достоверно распознавать несколько вариантов последовательностей в тестируемой области гена. Конъюгированная стрептавидином щелочная фосфатаза связывается с биотином ампликонов посредством фрагментов стрептавидина. В итоге, щелочная фосфатаза превращает добавленный субстрат в окрашенную форму, которая становится видимой на мембране стрипов, как цветной преципитат.

Простая и быстрая оценка полученных результатов проводится с помощью прилагаемого шаблона.

При проведении амплификации соблюдались обычные меры безопасности. Особенно важно, чтобы все реагенты и материалы, используемые для выделения ДНК и проведения амплификации, не содержали ДНК-аз. С целью контроля качества проводимой процедуры над ДНК-загрязнением использовали одну пробирку со 100  $\mu$ l бидистиллированной воды или Neutralization Buffer (A-NB), если вода не использовалась, включали в тестирование амплификационную смесь при необходимости. Проба отрицательного контроля для выявления возможной контаминации, содержащая воду вместо ДНК, была включена при каждом тестировании, которая показывала только полосы СС и АС.

Образцы, показавшие сомнительные результаты на стрипах MTBDRplus, подвергались повторной амплификации и гибридизации выделенной ДНК. Изоляты, показавшие расхождения в результатах теста Хайна с тестами на лекарственную чувствительность на твердых или в жидких средах также проходили повторный культуральный тест.

#### Экстракция ДНК

Выделение ДНК проводилось химической экстракцией при помощи набора ГеноЛиз (GenoLyse®)(Рис. 2.2.4).



Рис. 2.2.4. Набор Geno-Lyse® для экстракции ДНК.

Метод экстракции при помощи GenoLyse® позволяет провести экстракцию бактериальной ДНК вручную, напрямую из клинических материалов за 20 минут, так как компоненты набора готовы к использованию (рис.2.2.5). После первого центрифугирования бляшка осадка ресуспендировалась в 100 µl желтого лизисного буфера (A-LYS), на вортексе. Комбинированный метод приводил к выделению большего количества ДНК. После ресуспендирования материал был инкубирован на 5 минут при 95°C в термоблоке для того, чтобы убить бактерии. По истечении 5 минут лизат быстро откручивали (для осаждения) и добавляли равное количество (100 µl) нейтрализующего буфера (A-NB). Перемешивали на вортексе в течение 5 сек. После перемешивания откручивали нейтрализованный лизат на предельной скорости в течение 5 минут. В конце, 100 µl надосадочной жидкости перенесли в чистую пробирку и 5 µl экстракта использовали для амплификации.

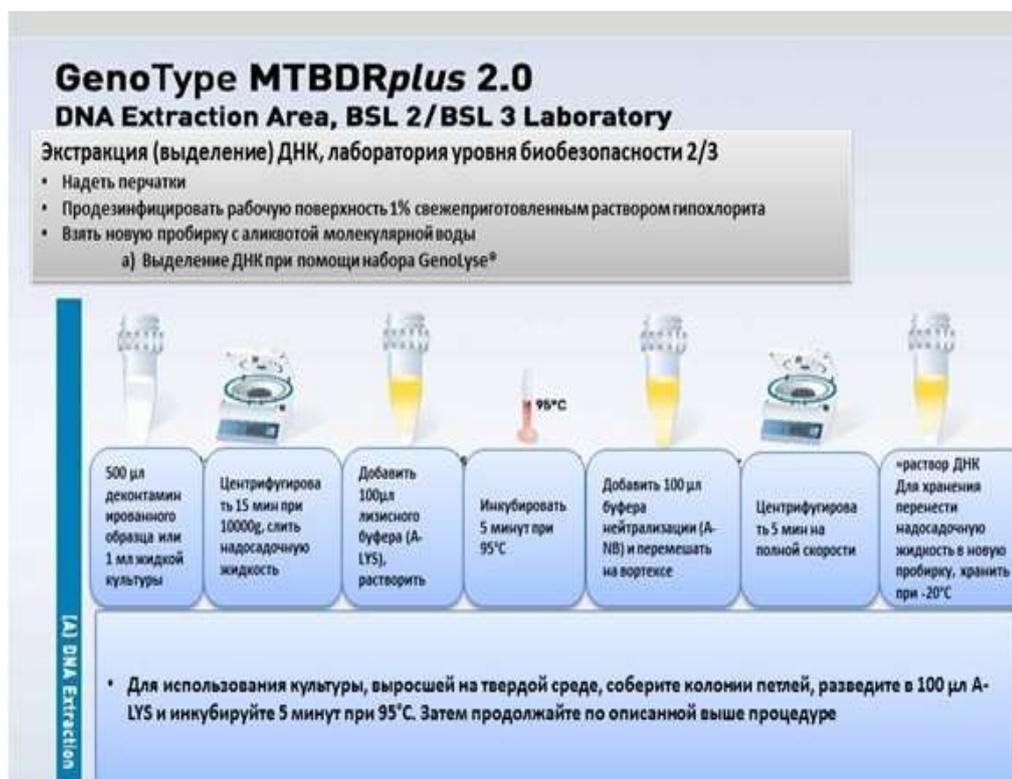


Рис. 2.2.5: Экстракция ДНК методом GenoLyse®

Приготовление мастер-микса с использованием набора для MTBDRplus®

## Version 2

Вторая версия теста Хайна позволяет снизить контаминацию в фазе преамплификации (благодаря уменьшению количества манипуляций с жидкостями в процессе приготовления мастер-микса; требуются всего два пипетирования для получения полноценного раствора), а также сэкономить средства ввиду отсутствия необходимости в приобретении дополнительной ДНК-полимеразы.

В версии 2 мастер-микс состоит всего лишь из Микса Амплификации А (АМ-А), который содержит 10X буфер, нуклеотиды и ДНК-полимеразу. Микс амплификации В (АМ-В) содержит  $MgCl_2$ , биотинилированные праймеры и краситель.

Для одной реакции ПЦР нужно смешать 10 мкл реагента А с 35 мкл реагента В, что дает нормальный объем в 45 мкл, ровно такой же, как в версии 1, при том, что требуется для этого меньшее количество манипуляций. Основываясь на количестве исследуемых образцов, необходимое количество мастер-микса получается простым умножением размера выборки на объем реактива на единицу, плюс один или два дополнительных объема для восполнения потерь во время разлива микса по пробиркам для ПЦР путем пипетирования. Растворы для амплификации А и В должны смешиваться осторожным переворачиванием пробирки.

### Амплификация

Амплификация начинается со стадии денатурации— разрушения водородных связей между двумя цепями ДНК. Двух-цепочечную ДНК-матрицу нагревали до 94 - 96°C в течение 0,5 - 2 минут, чтобы цепи ДНК разошлись. После расхождения цепей, снижали температуру на 0,5 - 2 минуты, чтобы праймеры могли связаться с одно-цепочечной матрицей. ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Это — стадия элонгации. Время элонгации принимали равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований. После окончания всех циклов проводили дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одно-цепочечные фрагменты. Эта стадия длилась 10 - 15 мин.

Количество циклов ПЦР для прямых проб из деконтаминированных мазок-позитивных и мазок-негативных образцов, равно 50, для тестирования культур количество циклов равно 30. Схема программирования термоциклера выглядит следующим образом:

Выбрали протоколы MDRCUL для культивированных образцов и MDRDIR для прямых образцов.

Культивированные образцы		Клинические образцы
15 мин 95°C	1 цикл	1 цикл
30 сек 95 °C		
2мин 65 °C	10 циклов	20 циклов
25 сек 95 °C		
40 сек 50 °C	20	30
40 сек 70 °C	циклов	циклов
8 мин 70 °C -	1 цикл	1 цикл

#### Гибридизация

В традиционном варианте гибридизационного анализа исследуемая нуклеиновая кислота иммобилизуется на мембранах и гибридизуется с олигонуклеотидным зондом, находящимся в растворе. В то же время существует целый ряд задач, когда необходимо в одном и том же образце нуклеиновой кислоты выявить множество нуклеотидных последовательностей, например, найти в геномной ДНК ряд мутаций, ответственных за возникновение того или иного признака. В этом случае становится необходимым проведение целой серии гибридизаций отдельно с каждым из зондов, специфичных для данной мутации. Более удобно и целесообразно в подобной ситуации использование варианта «обратной» гибридизации,

который заключается в том, что иммобилизованный на мембране олигонуклеотидный зонд гибридизуется с исследуемым образцом ДНК, находящимся в растворе. [3] Если на одной мембране иммобилизовать набор необходимых зондов, специфичных для всех исследуемых участков, то в результате одной гибридизации с меченым участком нуклеиновой кислоты становится возможным выявить все участки нуклеиновой кислоты, комплементарные иммобилизованным олигонуклеотидам.

Гибридизация в тесте Хайна осуществлялась методом обратной или реверс-гибридизации. Стрип DNA•STRIP® покрыт высокоспецифичными зондами, комплементарными к селективно амплифицированным последовательностям нуклеиновых кислот. Одно-цепочечный ампликон специфично прикрепляется к аналогичному зонду во время гибридизации, тогда как неспецифичные ампликоны удаляются в процессе отмывания.

Во время реакции конъюгации специфически прикрепленный ампликон помечается ферментом щелочной фосфатазой и становится видимым при помощи колориметрической реакции детекции. Таким образом, на стрипе DNA•STRIP® появляется специфическая полоска, используя специальный эталон-шаблон тест быстро интерпретируется

Для этого к набору прилагается специальный шаблон, при помощи которого можно легко осуществить интерпретацию результатов. При использовании этого эталона оценки следует приклеить окрашенные стрипы в предназначенные для этого поля, причем полоски СС и АС должны совпадать с соответствующими линиями на эталоне. (рис. 2.12).

Не все полоски на стрипе могут показывать одинаковую силу сигнала. На каждом стрипе всего 27 зон реакции. Чтобы убедиться в корректном проведении тестов и для контроля функционирования всех компонентов набора, на каждом стрипе есть 5 контрольных зон:

- Контроль Конъюгата (СС)
- Контроль Амплификации (АС)
- Комплекс *M. tuberculosis* (TUB)

- Контроль Локуса (*rpoB*)
- Контроль Локуса (*katG*)
- Контроль Локуса (*inhA*)
- Контроль Конъюгата (СС)

В этой зоне должна быть хорошо проявлена линия, подтверждающая эффективность связывания конъюгата и правильность субстратной реакции.

- Зона Контроля Амплификации (АС)

Если тест выполнен правильно, контроль ампликонов, свяжется с Зоной Контроля Амплификации на стрипе. Таким образом, если эта полоска развилась, то можно исключить перенос ингибиторов амплификации и ошибку на этапе подготовки и проведения реакции амплификации. В случае положительного результата тестирования, сигнал в зоне Контроля Амплификации может быть слабым или совсем невидимым. Это может быть вызвано конкурентными реакциями во время амплификации. Тем не менее, в этом случае, реакция амплификации считается выполненной успешно и не требует повторения. Если развились только полоски СС и АС, это значит, что отрицательный результат верен. Отсутствие полоски АС в случае отрицательного результата, указывает на ошибку во время проведения амплификации или на влияние ингибиторов амплификации. В этом случае результаты тестирования недействительны и необходимо повторное тестирование соответствующего образца.

#### Комплекс *M. tuberculosis* (TUB)

Эта зона гибридизируется с ампликонами, полученными от всех представителей комплекса *M. tuberculosis*. Если зона TUB отрицательная и, в то же время, полоска оценки устойчивости не развивается так, чтобы её можно было учесть, это означает, что выделенные бактерии не принадлежат к комплексу *M. tuberculosis* и не могут быть диагностированы данной тест-системой. В редких случаях зона TUB может быть отрицательной с одновременным развитием полоски устойчивости, которую можно учитывать.

#### Контроли локусов (*rpoB*, *katG* и *inhA*)

Три зоны Контроля Локусов (*groB*, *katG* и *inhA*), для проверки оптимальной чувствительности реакции для каждого тестируемого локуса. Зоны Контроля Локусов улавливают специфичные для каждого локуса участки генов. В случае положительного результата тестирования, (видимая полоска в диапазоне дикого типа и мутантного образца) сигнал в зоне Локус Контроля может быть слабым или совсем невидимым. В редких случаях, локус *katG* может полностью отсутствовать (включая полоску Локус Контроля). Это указывает на устойчивость тестируемого штамма к изониазиду. В то же время, если локусы *groB* и/или *inhA* не развиваются, результат теста нельзя оценивать.

#### Пробы дикого типа

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 соответствующим антибиотикам.

#### Мутантные пробы

В случае мутации, определённые ампликоны не могут связаться с соответствующими пробами диких типов. Отсутствие сигнала хотя бы в одной пробе дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма к соответствующим антибиотикам. Во внимание должны приниматься только полоски с интенсивностью равносильной или большей, чем полоска Контроля амплификации (АС). Хотя проба *groB*WT, тем не менее, является исключением в этой схеме оценки: если соответствующая полоска мутации *groB*MUT3 не развита, то сигнал полоски *groB*WT8, который слабее, чем АС, всё равно считается положительным.

Каждый образец полоски, отличный от образца полоски дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма. Полоска, проявившаяся в зоне гена *groB*, говорит об устойчивости тестируемого штамма к рифампицину, полоска в зоне гена *katG* и *inhA* позволяет сделать выводы об устойчивости тестируемого штамма к изониазиду (рис. 2.2.6, таб. 2.2.2; 2.2.3; 2.2.4, и 2.2.5).

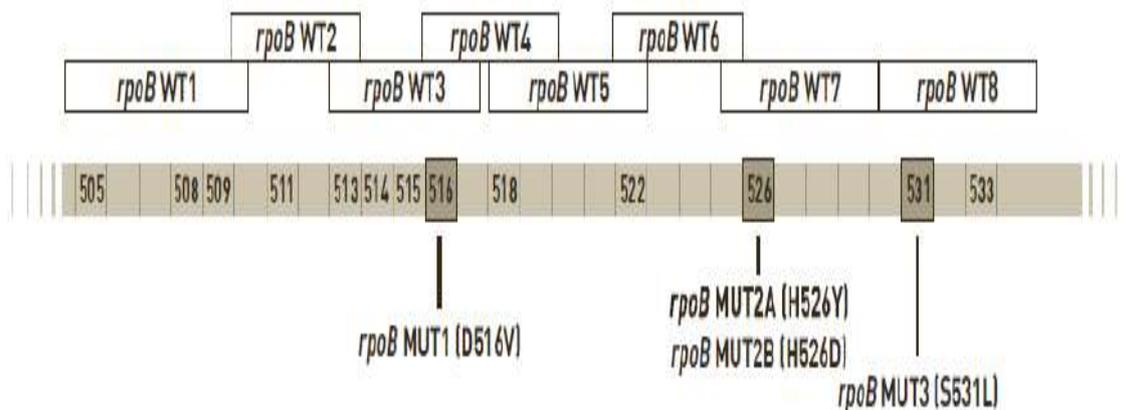


Рис. 2.2.6. Области устойчивости к рифампицину гена *groB*

Примечание: *groB*WT1-8: *groB* - зоны дикого типа; *groB*MUT1-3: *groB*-зоны мутаций. Числа указывают положения аминокислот (кодонов) для всех мутаций, перечисленных в таблице. Кодоны, для которых разработаны мутантные пробы, выделены. Мутантные пробы выявляют наиболее часто встречаемые мутации, вызывающие устойчивость (см. таб. 2.2.2; 2.2.3; 2.2.4, и 2.2.5).

Таблица 2.2.3-Мутации в гене *katG* и соответствующие дикие типы, и мутантные полоски.

слабые полоски дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1	S315T1
		<i>katG</i> MUT2	S315T2

Таблица 2.2.4 -Мутации в гене *groB* и соответствующие дикие типы, и мутантные полоски.

слабые полосы дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>groB</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>groB</i> WT2	510-513		L511P*
<i>groB</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>groB</i> WT3/WT4	513-519	<i>groB</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>groB</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>groB</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>groB</i> WT7	526-529	<i>groB</i> MUT2A <i>groB</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>groB</i> WT8	530-533	<i>groB</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

В сравнении с другими пробами, положительные сигналы в мутантных пробах *groB*MUT2A и MUT2B могут проявлять сигнал меньшей интенсивности. Только полосы с интенсивностью сигнала такой же или более интенсивной, чем в зоне Контроля Амплификации (AC), могут приниматься во внимание. В редких случаях, когда полоска *groB*MUT3 положительная, слабое окрашивание, наблюдаемое в полоске *groB*WT8, считается отрицательным.

Таблица 2.2.5. - тМутации в области промотора *inhA* и соответствующие дикие типы, и мутантные полоски.

слабые полосы дикого типа	исследованные положения аминокислот	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A <i>inhA</i> MUT3B	T8C T8A

В редких случаях, когда полоска *groVMUT3* положительная, слабое окрашивание, наблюдаемое в полоске *groVWT8*, считается отрицательным (табл. 2.2.6).

Таблица 2.2.6. -Мутации в гене *groV*, ответственные за возникновение резистентности к рифампицину

Таблица 1: Мутации в гене *groV* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски (согласно [7]).

слабые полоски дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>groV</i> WT1	505-509		F505L T508A S509T
<i>groV</i> WT2	510-513		L511P*
<i>groV</i> WT2/WT3	510-517		Q513L* Q513P del514-516
<i>groV</i> WT3/WT4	513-519	<i>groV</i> MUT1	D516V D516Y del515
<i>groV</i> WT4/WT5	516-522		del518* N518I
<i>groV</i> WT5/WT6	518-525		S522L S522Q
<i>groV</i> WT7	526-529	<i>groV</i> MUT2A <i>groV</i> MUT2B	H526Y H526D H526R H526P* H526Q* H526N H526L H526S H526C
<i>groV</i> WT8	530-533	<i>groV</i> MUT3	S531L S531Q* S531W L533P

\* Эта редкая мутация была выявлена пока только теоретически (in silico). И вполне возможно, что эту мутацию нельзя определить in vitro.

Таблица 2.2.7-Мутации в гене *katG* и промоторной области гена *inhA*, ответственные за возникновение резистентности к изониазиду.

Таблица 2: Мутации в гене *katG* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски.

слабые полоски дикого типа	исследованные кодоны	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>katG</i> WT	315	<i>katG</i> MUT1 <i>katG</i> MUT2	S315T1 S315T2

**Таблица 3: Мутации в области промотора *inhA* и соответствующие дикие типы и мутантные полоски.**

слабые полоски дикого типа	исследованные		
	положения аминокислот	развивающаяся мутантная полоска	мутация
<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C15T
	-16	<i>inhA</i> MUT2	A16G
<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T8C
		<i>inhA</i> MUT3B	T8A

### Ограничение метода

Появились публикации о дополнительных мутациях в пределах области тестируемого гена *groB*, приводящих к устойчивости к рифампицину [145]. Поскольку эти мутации очень редки, то невозможно было их подтвердить на данной тест-системе, они были установлены только *insilico*. Но, тем не менее, определение *insilico* не исключает возможности, что некоторые из этих мутаций можно определить *invitro*.

Теоретически, устойчивость может иметь место, не смотря на дикий тип. Если исследуемый образец содержит штамм, проявляющий гетерорезистентность и резистентность, обусловлена мутацией, не включённой в мутантные пробы, то проявится полоска в диких типах [146].

Микроорганизмы, относящиеся к комплексу *M.tuberculosis*, не могут быть дифференцированы. Аналогично, если в образце содержится более чем один штамм *M. tuberculosis*, (по причине смешанной культуры или контаминации) и один из них не включён в мутантные пробы, также проявится полоска в диких типах. Присутствие нескольких видов бактерий в анализируемом образце может помешать правильной интерпретации теста.

Как и любой метод выявления ДНК, рутинные тест-системы улавливают ДНК из жизнеспособных и нежизнеспособных бактерий. Таким образом, GenoTypeMTBDRplus тест, не может быть использован для мониторинга

прогрессирования или успешности лечения пациентов, находящихся на антимикробной терапии.

### **Исследование на МЛУ ТБ, путем использования теста XpertMTB/RIF для быстрого выявления ТБ.**

Согласно протоколу исследования, перед проведением теста XpertMTB/RIF патологический материал исследовали методом прямой микроскопии по Цилю-Нильсену с выявлением кислотоустойчивых бактерий (КУБ). Независимо от результатов микроскопии, т.е. в случаях с положительным и отрицательным мазком проводилось тестирование XpertMTB/RIF. Анализ XpertMTB/RIF основан на полимеразно-цепной реакции (ПЦР) работающий в режиме реального времени, предназначенный для выявления мутаций гена *rpoB*. Любое отклонение нуклеотидной последовательности от дикого типа приводит к задержке появления сигнала, превышающего заданное значение  $\Delta CT (> 3,5)$ , между первым и последним значением порогового цикла (CT), расценивается программным обеспечением, как устойчивость к рифампицину.

Полученные пробы обрабатывались в соответствии с инструкцией XpertMTB/RIF (версия картриджа №4), компании Cepheid, Sunnyvale, США. Лизирующий буфер (Samplereagent) из набора добавлялся в пробу в соотношении 1:2 и перемешивался. Данная преамплификационная процедура снижает жизнеспособность МТВС, что делает использование данного теста, подходящим для использования в условиях, наиболее приближенных к пациенту и в лабораториях с ограниченными требованиями к биологической безопасности, т.е. даже на уровне первичного медико-санитарного звена.

После инкубации при комнатной температуре в течение 10 минут пробу перемешивали заново и затем подвергали дальнейшей инкубации на протяжении 5 минут. Затем 2 мл лизированной пробы добавляли в промаркированный картридж и помещали в прибор GX-IVR2. А также в условиях референс лаборатории исследования проведены с патологическим материалом, взятых у пациентов с внелегочными формами туберкулеза:

- Плевральная жидкость
- Операционный материал
- Гной
- Отделяемое из свищей
- Спинномозговая жидкость (СМЖ)
- Лимфоузлы и другие ткани:

В лаборатории, поступивший внелегочной материал, в шкафу биологической безопасности 2-го класса переносился в стерильную полипропиленовую пробирку высокой плотности, после чего подвергался гомогенизации, деконтаминации и концентрации NALC-NaOH модифицированным методом. В полученный осадок объемом 0,5 мл добавляли 1,5 мл реагента (samplereagent) из набора XpertMTB/RIF. Далее тест XpertMTB/RIF с внелегочными образцами был проведен в соответствии с инструкциями производителя - компании Cepheid, Sunnyvale, США. Результаты тестирования каждого картриджа получали за 1 час 50 минут. (рис. 2.2.6).

Платформа выдавал результаты тестирования биологического образца в режиме реального времени. Кривые, окрашенные в различные цвета, показывали количество ампликонов. Полученные результаты сохранялись в памяти программного обеспечения, что положительно сказывается на качестве выдаваемых результатов клиницистам. Также, немаловажным фактором являлась возможность автоматического поиска результатов тестирования на каждого конкретного больного.

## Пример результата Xpert MTB/RIF

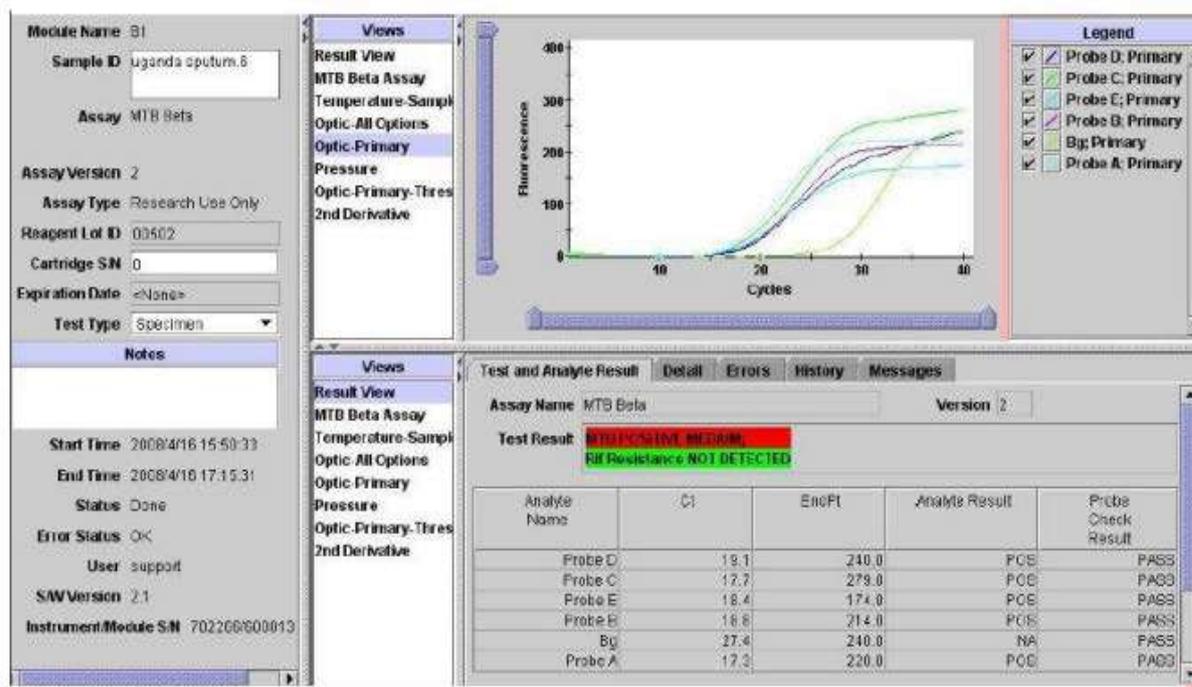


Рисунок 2.2.6. Пример результата xpertMTB/RIF Статистический анализ клинических и лабораторных данных

Результат выдавался в виде – ДНК комплекса *m.Tuberculosis* выявлена или не выявлена, резистентность к РИФ выявлена или не выявлена. В случае, когда тестирование в силу разных причин не завершилось или не состоялось, платформа также выдавала сведения.

### Идентификация вида НТМ

Колонии большинства нетуберкулезных микобактерий (НТМ) морфологически не сходны с МБТ. Сапрофитные микобактерии могут варьировать по форме колоний. Они бывают гладкие, круглые, влажные, блестящие, куполообразные, маслянистые. Хорошо эмульгируются в воде. Иногда могут иметь промежуточную форму. Колонии кремового цвета *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii* и *M. terraecomplex* бывают сухие и морщинистые, поэтому их иногда ошибочно принимают за МБТ. Окраска колоний НТМБ может быть от белого, телесного и кремового цвета до

слабозелтого, желтого и оранжевого. Рост культуры НТМ может быть пышным или стелющимся, выпотевающим – дисгоническим. Морфологически колонии родственных микроорганизмов отличаются от колоний МБТ, однако некоторые виды нетуберкулезных микобактерий (фотохромогенные) могут расти в виде характерной для микобактерий туберкулеза R-форме[147].

Поскольку нетуберкулезные микобактерии также могут вызывать заболевания человека (микобактериозы), они также подлежат выборке для дальнейшей идентификации. Главной отличительной особенностью рода микобактерий является строгая кислото-, щелоче- и спиртоустойчивость, поэтому первой ступенью идентификации является микроскопия всех выделенных культур с окраской мазков по Цилю – Нильсену.

Идентификацию можно проводить с помощью биохимических тестов (ниацинового, редукции нитратов, каталазо-пероксидазного), а также с использованием селективных сред (среда с салицилатом натрия, паранитробензойной кислотой и др.). Также существуют современные экспресс-методы идентификации, дающие различие на уровне комплекса МТБ - иммунохроматографический тест SDBIOLINETBAgMPT 64 Rapid.

Это – быстрый иммунохроматографический тест, в котором для идентификации комплекса МТБ используются мышинные моноклональные антитела анти-MPT 64. Тест используется в лабораториях для идентификации микобактерий, выделенных на твердой среде или в бульоне MGIT.

Биохимические, иммунологические и молекулярные исследования помогли выявить несколько антигенов *M.tuberculosis* и разработать несколько методов для дифференциации комплекса МТБ и нетуберкулезных микобактерий. *M.tuberculosis* секретирует более 33 различных протеинов. MPT 64 был определен только в культурах *M.tuberculosis*, выращенных *invitro*.

Обработку культур микобактерий, полученных от больных туберкулезом, и выделение ДНК проводили также, как и для определения вида комплекса *M. tuberculosis*.

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 [148-150].

Тест-система «MAIS-диф» состоит из двух последовательных этапов. На первом этапе проводится ПЦР фрагмента гена *hsp65*, второй этап представлен рестрикционным анализом ампликонов, полученных после проведения ПЦР. Тест-система «ТБ-БИОЧИП», позволяющая одновременно выявлять МБТ и определять их чувствительность к рифампицину и изониазиду, и тест-система «ТБ-БИОЧИП-2», позволяющая определять лекарственную чувствительность МБТ к фторхинолонам.

В институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН также разработана версия биологических микрочипов «IMS» предназначенных для идентификации *M. tuberculosis* и ряда видов НТМ (рис 2.2.7).

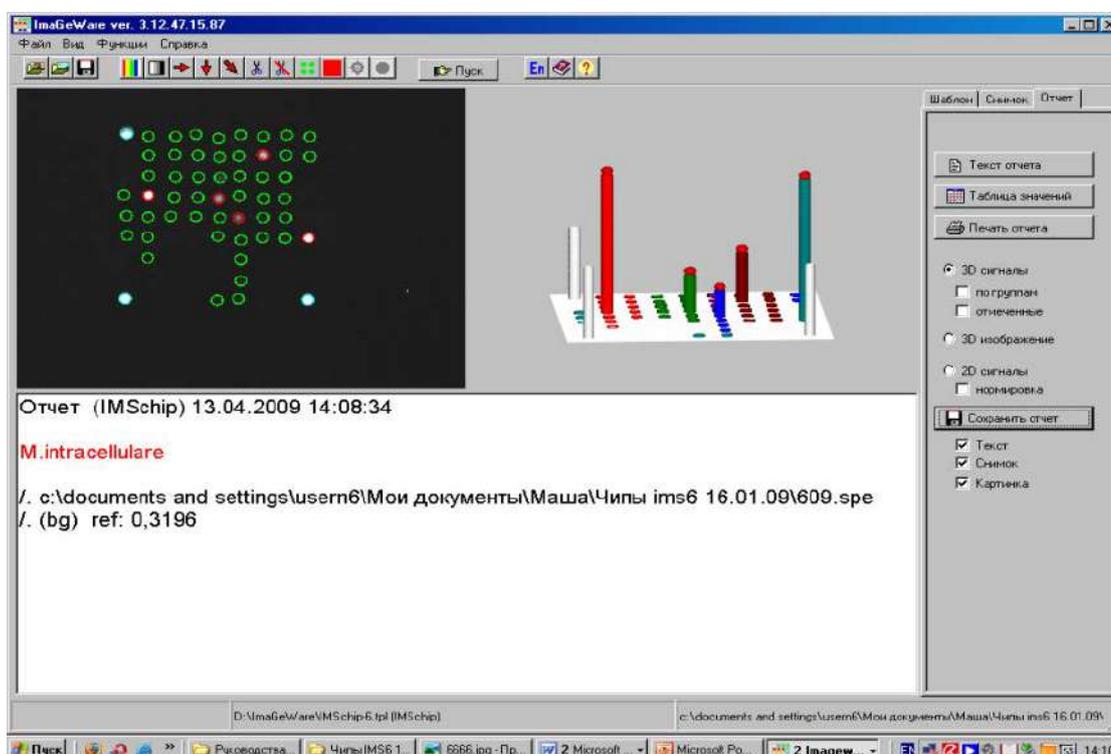


Рис. 2.2.7. Анализ гибридационной картины экспериментальной версии биочипа «IMS» с помощью программного обеспечения.

Данный метод основан на анализе видоспецифического участка гена *gyrB*, размером 371 п.н. и позволяет идентифицировать 8 видов микобактерий (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. fortuitum*). Метод включает в себя двухстадийную ПЦР. На второй стадии используется дезоксинуклеотид, меченый флуоресцентной меткой SY-5. Полученный меченый ПЦР-продукт гибридизуется на чипе. Процедура гибридизации проводится в гибридизационной камере в течение 16-18 часов при 37°С. Регистрация гибридизационной картины осуществляется при помощи автоматического комплекса, состоящего из автоматического микроскопа, 512x512 ПЗС камеры и компьютера с соответствующим программным обеспечением.

Интерпретация результатов гибридизации осуществляется при сравнении интенсивности флуоресцентных сигналов в ячейках, принадлежащих к одной группе. Максимальный флуоресцентный сигнал свидетельствует о наличии совершенного гибридизационного дуплекса. На рис. 2.20 представлена интерпретация гибридизации на биологическом чипе «IMS» с помощью программного обеспечения.

Для видовой идентификации с помощью биологических микрочипов «IMS» использовали культуры микобактерий, выделенные с плотной яичной среды Левенштейна-Йенсена и агаровой Миддлбрук 7H11.

Результаты гибридизации регистрировали с помощью аппаратно-программного комплекса для анализа изображений диагностических микрочипов «Чипдетектор-03» [ИМБ РАН, Россия]. Инсталляцию и эксплуатацию комплекса осуществляли в соответствии с инструкцией по его использованию. Интерпретацию результатов осуществляли с помощью программы «Imageware». Результаты гибридизации анализировали посредством оценки интенсивностей свечения ячеек, содержащих видоспецифические олигонуклеотиды, комплементарные ДНК *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. Fortuitum*[150-157].

### 2.3. Статистический анализ полученных данных

Статистической совокупностью данного исследования явились больные туберкулезом, которые имели количественные и атрибутивные учетные признаки.

Исследование проводилось по методу репрезентативной выборочной совокупности. Результаты исследований подвергались вариационно-статистической обработке в соответствии с общепринятыми методами, а также с использованием программ для медико-биологических исследований.

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:

$$r_{xy} = \frac{\sum (d_x \times d_y)}{\sqrt{\sum dx^2 \times \sum dy^2}}$$

где:  $r_{xy}$  – коэффициент корреляции ;

$x$  и  $y$  – коррелируемые ряды ;

$d_x$  и  $d_y$  – отклонение каждой варианты от средней величины .

вычисленной в ряду признака ( $x$ ) и в ряду признака ( $y$ );

$\sum$  - знак суммы.

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

$M$  - средняя арифметическая;

сигма ( $\sigma$ ) - среднеквадратическое отклонение:

$\pm m$  - средняя ошибка средней арифметической

#### **2.4. Соблюдение этических норм**

Этические нормы и соблюдение врачебной тайны имеют большое значение для проведения разного рода исследований по болезням, которые связаны со стигмой в обществе. Туберкулез относится как раз к таким заболеваниям. В Кыргызстане, как в большинстве социумов, где население невелико и тесно связано родственными и прочими узами, соблюдение врачебной тайны имеет огромное значение. Поэтому дизайн исследования был предусмотрен таким образом, чтобы пациенты ни в коем случае не пострадали в результате публикации результатов. Данное исследование проводилось с соблюдением врачебных этических норм, с согласия Комитета по Этике МЗ КР. Все данные от больных деидентифицированы, результаты тестов анонимизированы и врачебная тайна сохранена[158].

## ГЛАВА III

### ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ТУБЕРКУЛЕЗУ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ.

#### 3.1 Оценка показателей заболеваемости, смертности и распространенности туберкулеза.

Эпидемиологическая ситуация, сложившаяся у нас в республике по туберкулезу показывает всю сложность данной проблемы во всей Центральной Азии. Необходимо отметить, что в Центральной Азии по заболеваемости туберкулезом, среди стран СНГ Кыргызстан находится на втором месте. Слабое социально-экономическое составляющее нашего государства являются одной из причин роста заболевания и распространения среди населения, а также сложившейся эпидемиологической ситуации по туберкулезу. В Кыргызстане, как и во многих постсоветских республиках, ситуация с заболеваемостью туберкулезом сложная. За период с 1991 года по 2015 эпидемический процесс при заболеваемости туберкулезом характеризуется тенденцией роста. Подъем заболеваемости начался с 1995 года и своего пика достиг 2001 году. Несмотря на снижение заболеваемости в последующие годы в 2015 году ее уровень в 1,7 раза выше в сравнении с 1991 годом. В 2015 году в Кыргызской Республике зарегистрировано 5853 впервые выявленных больных туберкулезом – 98,2 на 100 тыс. населения, против 5898 в 2014 году(101,1). Однако несмотря на снижение уровня заболеваемости ситуация осложняется распространением лекарственно-устойчивого туберкулеза и туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией [14, 159].

Важно подчеркнуть, что в зависимости от правильно выбранных методов и корректной регистрации может быть различен уровень заболеваемости, а также и смертности от туберкулеза. Насколько эффективна программа,

направленная против туберкулеза и правильно выбранное лечение, настолько ниже будет уровень роста и смертность от данного заболевания. является Диспансерный учет лиц с активной формой туберкулеза входит в показатель распространенности заболевания, который зависит напрямую от раннего выявления, выбора эффективных методов лечения и организации процесса лечения, включающих, в том числе, перевод больных в неактивную группу, предполагающую завершение инфекционного периода.

За анализируемый период размах заболеваемости составил: 53,7 -192,4. В 1996 году в республике началось внедрение стратегии DOTS, рекомендованная в международном масштабе стратегия, направленная на обеспечение излечения туберкулеза, которая была принята за основу Национальной программы «Туберкулез-1» (1996-2000гг). Вначале программа DOTS была внедрена в 4 пилотных районах Чуйской и Иссык-Кульской областях, а с 1999 года ею были охвачены все регионы республики. В результате выполнения данной программы наблюдается рост показателей заболеваемости и распространенности туберкулеза за счет внедрения метода микроскопии мокроты как более эффективного выявления больных и с 2006 года наметилось умеренное снижение заболеваемости.

Показатель распространенности туберкулеза свидетельствует об эффективности проводимых лечебных мероприятий. Динамика распространенности туберкулеза в республике характеризуется умеренной тенденцией к снижению. Размах показателей составляет от 179,8<sup>0</sup>/<sub>0000</sub> до 363,8<sup>0</sup>/<sub>0000</sub>. При этом необходимо отметить, что соотношение между показателями заболеваемости и распространенности в разные периоды наблюдения были различны. Так, в начале 90-х годов соотношение показателей заболеваемости и распространенности составило 1:6,6, к началу внедрения программы DOTS оно снизилось до 1:3,1 и после внедрения программы -1:1,4, что свидетельствует о эффективности проводимых лечебных мероприятий.

В динамике за анализируемые годы смертность от туберкулеза была в пределах от 6.1 до 16,0. В начале 90-х годов до внедрения программы DOTS

соотношение показателя заболеваемости к показателю смертности составляло 1:6,3. После внедрения программы ДОТС и стабилизации уровня заболеваемости (1997-2007гг) это соотношение составило 1:10,7, а в последние годы – 1:12.

Итак, предпринятые меры по внедрению программы ВОЗ, а также его эффективность выразились в том, что в 1,1 раз снизился уровень заболеваемости, в то время как показатели смертности от туберкулеза снизились 2,5 раза и в 2 раза снизились показатели распространенности. Несмотря на это, эпидемиологическая ситуация на национальном уровне не может быть рассмотрена как удовлетворительная, так как превышает все пороговые показатели. Рис. 1

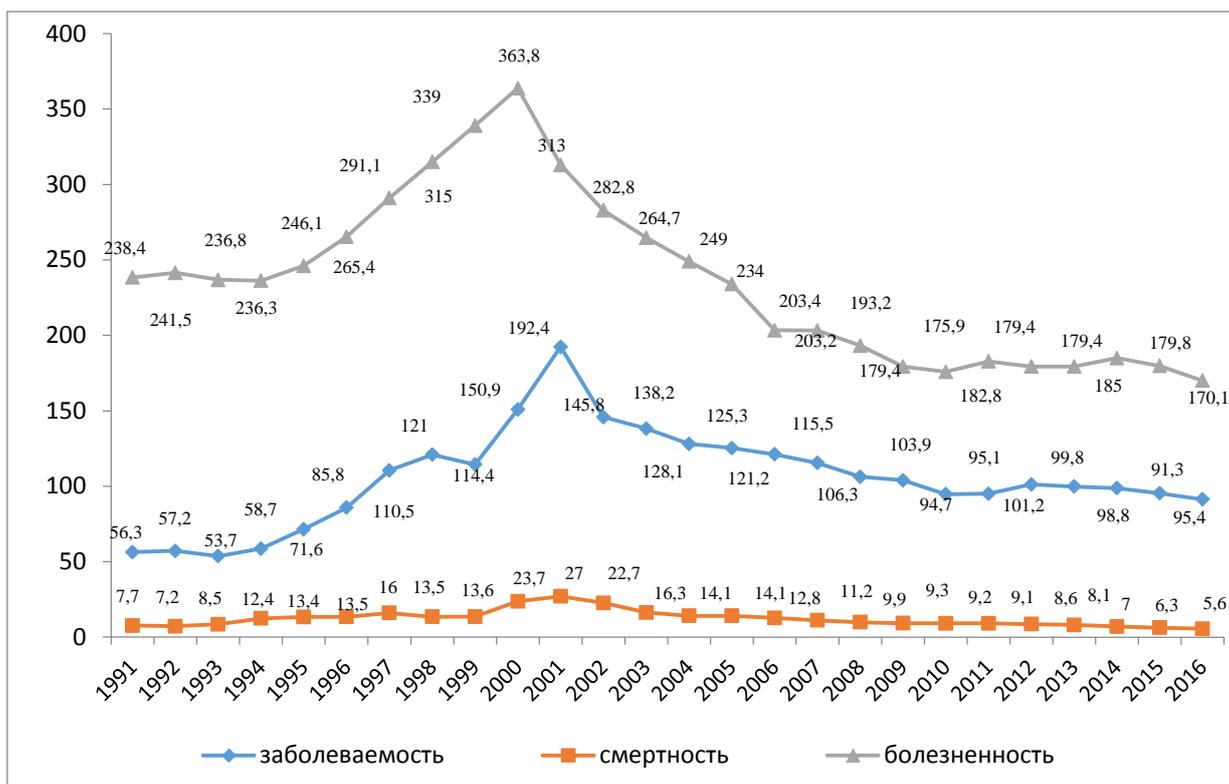


Рис.3.1.1. Многолетняя динамика заболеваемости, распространенности и смертности от туберкулеза в Кыргызской Республике

Заболеваемость туберкулезом регистрируется повсеместно по всем административным территориям республики. Однако удельный вес

заболеваемости различен. Из общего числа выявленных больных 75% приходится на 4 административные территории. При этом на Чуйскую область – 21,0%, Ошскую -19,0, г. Бишкек – 19,0% и Жалалабатскую область – 16,0%. По остальным регионам удельный вес варьировал от 4,0% в г.Ош и Таласской области до 7,0% в Баткенской области рис.3.2.1.

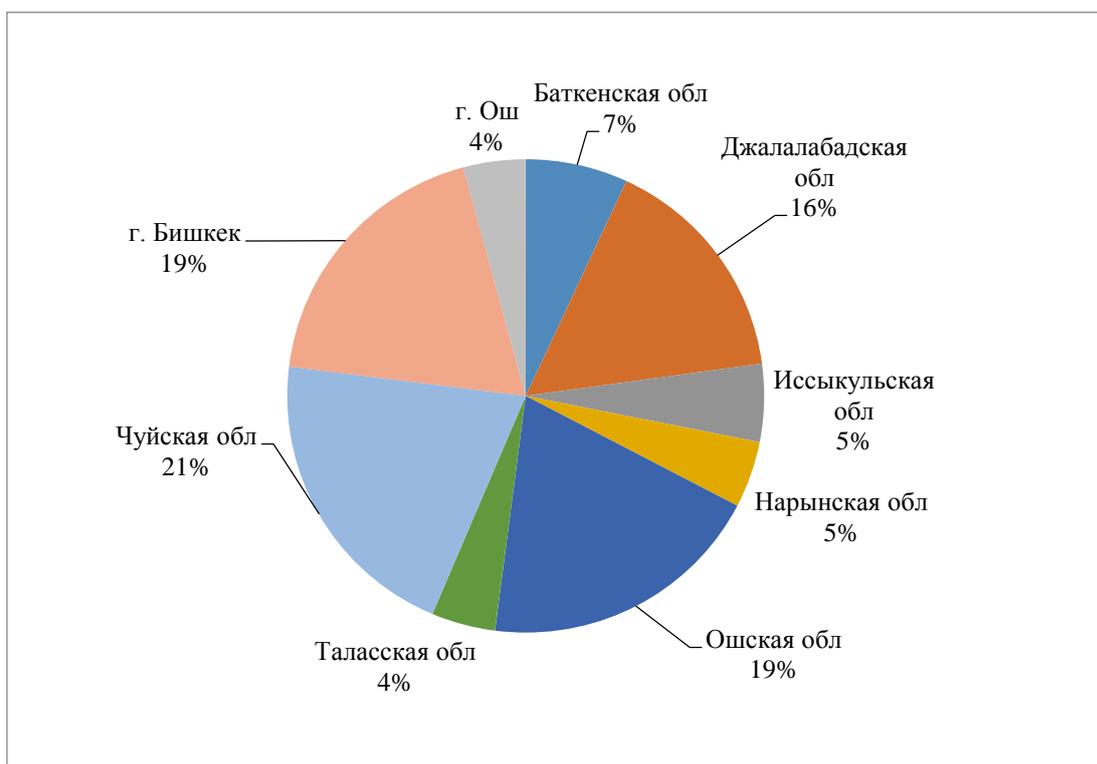


Рис.3.1.2. Удельный вес распределения случаев туберкулеза по регионам республики.

По средним многолетним показателям заболеваемости также лидируют Чуйская область и город Бишкек, где средний интенсивный показатель составил  $119,8^0/0000$  и  $117,3^0/0000$  соответственно, а вот в Таласской области, где доля числа случаев туберкулеза незначительная (4%), средний интенсивный показатель составляет  $105,1^0/0000$ . По доле участия в общем числе случаев туберкулеза Ошская область занимает 4 место, по уровню заболеваемости на 7 месте с интенсивным показателем -  $91,6^0/0000$ . По остальным административным территориям средний интенсивный показатель был ниже республиканского значения и варьировал от  $68,0 \pm 3,9^0/0000$  в Иссык-Кульской

области до  $97,8 \pm 6,1^{0/0000}$  в Нарынской области. Очень высокий показатель заболеваемости наблюдается в ГСИН с интенсивным показателем  $2105,0^{0/0000}$ . Рост показателя обусловлен повышением выявляемости случаев туберкулеза и снижением эффективности лечения больных туберкулезом.

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  $68,0 \pm 0,069^{0/0000}$  в Иссык-Кульской области до  $119,8 \pm 0,015^{0/0000}$  в Чуйской области.

В динамике за анализируемые годы размах показателя смертности по республике составил от 6,3 в 2015 до 27,0 в 2001. Высокие показатели смертности выше 10 на 100 тысяч населения отмечаются с 2000г. по 2007 годы. В последующем наблюдается снижение этого показателя в 1,5 раза с 9,9 в 2008 до 6,3 в 2015 году. ПС выше республиканского значения отмечены в г. Бишкек и Чуйской области. В г. Бишкек средний показатель смертности составил  $16,6^{0/0000}$  населения, их размах был от 5,9 до 22,4, что свидетельствует о снижении его в 3,7 раза. В Чуйской области средний показатель составил 16,1, размах варьировал от 10,5 до 21,4 со снижением в 2 раза. Во всех остальных административных территориях средний показатель смертности за анализируемый период был ниже республиканского. Так, в г. Ош средний показатель смертности составил  $11,1^{0/0000}$  населения, минимальный показатель наблюдался в 2015 г- 6,2, максимальный в 2001 – 13,9. В динамике также наблюдается снижение в 2,2 раза. В Нарынской области средний показатель смертности составил  $9,6^{0/0000}$  населения с минимальным показателем 5,9 в 2014 году, максимальным 13,5 в 2002 году смертность снизилась в 2 раза. В Таласской области средний показатель смертности составил  $9,3^{0/0000}$  населения, минимальный – 5,6 в 2015 году, максимальный – 11,7 в 2010 году, снижение показателя в 2 раза. В Ошской области средний показатель смертности за анализируемый период составил  $-7,8^{0/0000}$  населения,

минимальный - 4,7, максимальный – 11,9, снижение показателя 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 показатель смертности в Баткенской области составил  $6,9^{0}/_{0000}$  населения, минимальный 3,2 в 2014 году и максимальный - 12,2 в 2002 году. В Жалалабатской области средний показатель смертности составил  $7,6^{0}/_{0000}$  населения, минимальный -3,5 и максимальный 13,0. В Иссык-Кульской области средний показатель смертности за анализируемый период составил  $6,7^{0}/_{0000}$  населения, минимальный показатель был зарегистрирован в 2007 -3,5, максимальный в 2001 - 10,7 таблица 3.1.1.

Определены гендерные различия ПС: у мужчин в КР уровень данного показателя в 3 раза выше, чем у женщин (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, но территорией риска являются Чуйская и Таласская области и г. Бишкек где средние многолетние показатели заболеваемости достоверно выше таковых по республике ( $P < 0.05$ ).

Таблица 3.1.1-Смертность от туберкулеза населения Кыргызской Республике по административным территориям.

годы	КР	г. Бишкек	г. Ош	Регионы						
				Чуйский	Нарынский	Таласский	Ошский	Дж-Абадский	Баткенский	Иссыккульский
2000	23,7	18,6	13,9	17,0	8,7	4,9	10,2	13,0	11,0	7,4
2001	27,0	19,4	13,7	21,4	9,4	5,9	11,1	9,9	11,9	10,7
2002	22,7	20,4	13,2	20,8	13,5	9,7	11,9	10,1	12,2	7,1
2003	16,3	20,4	11,8	19,4	7,2	9,1	8,0	9,6	6,4	5,9
2004	14,1	22,4	11,6	16,2	11,7	6,6	7,5	8,5	3,6	5,9
2005	14,1	22,4	7,2	16,7	8,3	8,9	7,2	7,4	8,7	4,4
2006	12,8	17,4	12,8	16,0	6,7	7,4	9,2	6,8	5,0	3,7
2007	11,2	18,1	12,0	12,1	7,8	10,6	7,8	6,1	6,6	3,5
2008	9,9	17,0	8,0	14,8	5,5	10,5	7,9	5,9	3,3	4,2
2009	9,3	14,4	10,4	11,8	7,7	8,8	7,2	5,2	4,2	8,4
2010	9,2	13,9	11,7	13,2	7,7	11,7	5,2	5,1	4,8	7,2
2011	9,1	11	7,0	15,3	12,5	12	4,8	6,5	4,7	8,7
2012	8,6	10,2	10,1	13,6	12,0	10,5	4,7	5,4	6,4	6,0
2013	8,1	10,4	8,8	13,6	10,4	9,5	4,7	3,5	8,4	5,5
2014	7,0	7,3	8,6	10,6	5,9	7,3	4,9	5,6	3,2	8,0
2015	6,3	5,9	6,2	10,5	8,7	5,6	4,7	5,5	3,7	4,1
всего	13,0	16,6	11,1	16,2	9,6	9,3	7,8	7,6	6,9	6,7
± m	0,01	0,04	0,03	0,04	0,06	0,06	0,02	0,02	0,04	0,04
95% ДИ	13,48-13,52	16,5-16,7	11,0-11,2	16,1-16,3	9,5-9,7	9,2-9,4	7,75-7,85	7,55-7,65	6,83-6,97	6,63-6,77
P		1-4< 0,05	3-4< 0,05	2-4< 0,05	4-5< 0,05	4-6< 0,05	4-7< 0,05	4-8< 0,05	4-9< 0,05	4-10< 0,05

### **3.2. Подверженность туберкулезом в зависимости от возраста, пола, контингента.**

В многолетней динамике заболеваемости туберкулезом детей за период 2001 по 2016 годы наблюдается выраженная тенденция к снижению. В 2016 году показатель заболеваемости туберкулезом среди детей снизился в 2,9 раза, ежегодный темп снижения составил – 8,0%. Минимальный интенсивный показатель 24,1 на 100 тысяч детей наблюдался в 2014 году, максимальный – 82,2 в 2002 году. Показатели заболеваемости в первые годы наблюдения имели достоверное различие по сравнению с показателями в последние годы наблюдения ( $P < 0.05$ ).

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 и 2016 годы отмечается стабильная тенденция с высоким уровнем заболеваемости. Максимальный интенсивный показатель заболеваемости подростков составил  $93,1^{0/0000}$ , в 2012 году, минимальный –  $62,6^{0/0000}$  в 2006 году. Достоверных различий в показателях заболеваемости за анализируемые годы не выявлено ( $P < 0,05$ ), кроме 2006 и 2010 годов таблица 3.2.1

Таблица 3.2.1-Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом детей и подростков в Кыргызской Республике за период 2001 - 2015 гг.

годы	Дети				Подростки				Р значение
	абс. число	0/0000 (1)	±m	95%ДИ	абс. число	0/0000 (2)	±m	95%ДИ	
2001	1285	76,7	0,2	6,3-77,1	280	84,5	0,5	83,6-85,4	1-2<0,05
2002	1366	82,2	0,2	81,8-82,6	290	84,6	0,5	83,7-85,5	1-2<0,05
2003	993	61	0,2	60,6-61,4	259	74	0,4	73,1-74,9	1-2<0,01
2004	867	53,8	0,2	53,5-54,1	267	75,5	0,4	74,6-76,4	1-2<0,01
2005	782	49	0,2	48,7-49,3	245	69,3	0,4	68,5-70,1	1-2<0,01
2006	699	44,1	0,2	43,8-44,4	221	62,6	0,4	61,8-63,4	1-2<0,01
2007	679	42,8	0,2	42,5-43,1	248	70,3	0,4	69,5-69,5	1-2<0,01
2008	630	39,6	0,2	39,3-39,9	255	73,1	0,4	72,2-74,0	1-2<0,01
2009	541	35,7	0,2	35,4-36,0	249	70,2	0,4	69,4-71,0	1-2<0,01
2010	531	32	0,1	31,7-32,3	230	66	0,4	65,2-66,8	1-2<0,01
2011	504	30,1	0,1	29,8-30,4	275	79,9	0,5	79,0-80,8	1-2<0,01
2012	640	37,2	0,1	36,9-37,5	309	93,1	0,5	92,1-94,1	1-2<0,01
2013	594	33,6	0,1	33,3-33,9	275	86,3	0,5	85,3-87,3	1-2<0,01
2014	438	24,1	0,1	23,9-24,3	271	87,4	0,5	86,4-88,4	1-2<0,01
2015	532	28,3	0,1	28,1-28,5	243	79,7	0,5	78,7-80,7	1-2<0,01

Гендерное распределение заболеваемости туберкулезом за период с2001 по 2016 годы характеризуется преимущественным поражением лиц мужского пола. Доля заболевших мужчин составляет – 73,8% из общего числа заболевших людей. При этом во все годы наблюдения отмечается достоверное различие уровня заболеваемости между мужчинами и женщинами (P<0.05).

В многолетней динамике заболеваемости за анализируемый период наблюдается умеренное снижение ее уровня, как среди женщин, так и среди мужчин (таблица 3.2.2.)

Таблица 3.2.2 Многолетняя заболеваемость туберкулезом в разрезе гендерного распределения, Кыргызстан, 2011-2015гг

Годы	Мужчины				Женщины				Р значение
	Абс. число	0/0000 (1)	± m	95% ДИ	Абс. число	0/0000 (2)	± m	95% ДИ	
2001	5571	228,3	0,3	227,8-228,8	2695	107,8	0,2	107,4-108,2	1-2< 0.001
2002	4670	189,8	0,3	189,3-190,3	2664	105,7	0,2	105,3-106,1	1-2< 0.001
2003	4237	170,8	0,2	170,4-171,3	2688	105,8	0,2	105,4-106,2	1-2< 0.001
2004	4032	161,0	0,2	160,5-161,5	2510	98,0	0,2	97,7-98,4	1-2< 0.001
2005	3898	154,2	0,2	153,7-154,6	2532	97,9	0,2	97,5-98,2	1-2< 0.001
2006	3867	151,5	0,2	151,0-151,9	2430	93,1	0,2	92,7-93,4	1-2< 0.001
2007	3615	140,5	0,2	140,0-140,9	2398	91,1	0,2	90,7-91,4	1-2< 0.001
2008	3305	127,3	0,2	126,9-127,7	2278	85,8	0,2	85,5-86,1	1-2< 0.001
2009	3266	122,9	0,2	122,5-123,3	2329	85,4	0,2	85,1-85,7	1-2< 0.001
2010	3169	117,8	0,2	117,5-118,2	2341	84,9	0,2	84,5-85,2	1-2< 0.001
2011	3247	119,3	0,2	118,9-119,6	2288	81,9	0,2	81,6-82,3	1-2< 0.001
2012	3433	123,9	0,2	123,5-124,3	2418	85,2	0,2	84,9-85,5	1-2< 0.001
2013	3319	117,4	0,2	117,0-117,8	2540	87,8	0,2	87,5-88,1	1-2< 0.001
2014	3281	114,0	0,2	113,6-114,4	2617	88,9	0,2	88,6-89,3	1-2< 0.001
2015	3334	114,0	0,2	113,6-114,3	2519	84,2	0,2	83,9-84,5	1-2< 0.001
2001-2015		142,4				98,3			

Ежегодный темп снижения заболеваемости у мужчин составил 4,6%, в 2015 году интенсивный показатель заболеваемости туберкулезом у мужчин

снижился в 2 раза по сравнению с 2001 годом. Темп снижения заболеваемости женщин составил всего – 1,6%, а в 2015 году интенсивный показатель снижился только на 1,2 раза по сравнению с 2001 годом. Средний интенсивный показатель заболеваемости мужчин составил  $142,4 \pm 0,2$ , среди женщин  $98,3 \pm 0,2$ . Минимальный показатель заболеваемости среди мужчин -  $114 \pm 0,2$ , в последние два года и максимальный  $228,3 \pm 0,3$  в 2001 году. Среди женщин минимальный показатель заболеваемости составил  $81,9 \pm 0,2$ , в 2011 году, максимальный –  $107,8 \pm 0,2$ , в 2001 году.

Заболеваемость туберкулезом регистрируется во всех возрастных группах, таблица 3.2.3.. 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 –  $17,4 \pm 0,2$  ( $P < 0.05$ ).

Таблица 3.2.3. Многолетняя возрастная заболеваемость туберкулезом в разрезе гендерного распределения, Кыргызстан, 2011-2015гг

Средняя заболеваемость мужчин					Средняя заболеваемость женщин				Р значение
Возрастные группы	Абс. число	0/0000 (1)	$\pm m$	95% ДИ	Абс. число	0/0000 (1)	$\pm m$	95% ДИ	
0-6	96	27,1	0,3	26,5-27,6	59	17,4	0,2	16,9-17,8	1-2 < 0.05
7-14.	195	41,9	0,3	41,3-42,5	181	40,1	0,3	39,5-40,6	1-2 > 0.05
15-17	145	81,4	0,6	80,1-82,7	258	147,1	0,8	145,5-148,8	1-2 < 0.01
18-24	576	161,8	0,6	160,6-163,0	571	162,2	0,6	160,9-163,4	1-2 > 0.05
25-34	727	182,4	0,6	181,2-183,6	604	153,4	0,6	152,3-154,6	1-2 < 0.05
35-44	528	160,1	0,6	158,9-161,4	314	92,9	0,5	91,9-93,9	1-2 < 0.05
45-54	467	214,5	0,9	212,8-216,2	229	97,1	0,6	95,9-98,3	1-2 < 0.01
55-64	302	33,0	0,2	32,7-33,4	198	187,2	1,2	184,9-189,6	1-2 < 0.01
65 и старше	162	143,4	1,0	141,3-145,4	178	105,5	0,7	104,1-107,0	1-2 < 0.05

По мере взросления показатели заболеваемости также повышаются. Группой риска у мужчин являются лица от 18 до 54 лет, у которых интенсивный показатель заболеваемости варьирует в пределах  $160,1 \pm 0,6$  (18-

24лет) –  $214,5 \pm 0,9$  (45-54лет). У женщин группа риска лица от 15 до 34 лет с размахом интенсивного показателя от  $147,1 \pm 0,8$  (15-17 лет) до  $153,4 \pm 0,6$ . Следует отметить высокий показатель заболеваемости у мужчин старше 65 лет –  $143,4 \pm 1,0$  и женщин в возрасте 55-64 и старше 65 лет с интенсивным показателем  $187 \pm 1,2$  и  $105,5 \pm 0,7$  соответственно. Во всех возрастных группах мужчин и женщин кроме 7-14 лет и 18-24 года наблюдается достоверное различие в показателях заболеваемости ( $P < 0.05$ ).

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, Большую долю заболевших медицинских работников составили лица женского пола – 86,7%. Территориально чаще болели медицинские работники города Бишкек, доля которых составила – 29,5%. По остальным административным территориям удельный вес заболевших медицинских работников варьировал от 1,4 % в Нарынской области до 10,6% в Ошской области. В противотуберкулезных организациях городов Бишкек и Ош туберкулезом заразились 5 и 7 медицинских работников соответственно.

Отмечается высокий удельный вес положительных БК среди заболевших туберкулезом медицинских работников. Так, положительные результаты БК в Жалал-Абатской области имели 45,4 % медработников с выявленным туберкулезом, в Нарынской – 33,3%, в Чуйской – 28,0, в Баткенской – 26,3% и в Иссык-Кульской – 22,2%, в городе Бишкек этот экстенсивный показатель составил 16,0%. Таблица 3.2.4

Таблица 3.2.4 - Число случаев туберкулеза среди медицинских работников Кыргызской Республики по административным территориям за период 2011-2015 гг.

Регион	Всего заболевших	Из них							
		БК+	%	мужчин	%	женщин	%	В ПТО	%
Республика	211	42	19/9	28	13.2	183	86.7	20-	9.4
Баткенская область	19	5	26.3	5	26.3	14	73.6	1	5,2
Джалал-Абадская область	22	10-	45,4	5	22,7	17	77,2	2-	9.0
Ошская область	27	2-	7,4	5-	18,5	22	81,4	-	
г.Ош	20	2	10.0	1-	5,0	19	95.0	7	35.0
Иссык-Кульская область	9-	2-	22,2	-		9-	100	2-	22.2
Нарынская область	3-	1-	33/3	-		3-	100	1-	33/3
Таласская область	-8	1-	12.5	1-	12.5	7-	87.5	1-	12.5
Чуйская область	25	7	28.0	2	8.0	23	92.0	2-	8.0
г.Бишкек	75	12	16.0	9	12.0	66	88.0	5-	6.6

Миграционные процессы, происходящие в республике также имеют свое влияние на эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу. К примеру, граждане Кыргызстана, заболевшие в России, Казахстане и других республиках содружества, и прибывшие на лечение домой. Всего за последние четыре года заболело туберкулезом 2157 граждан Кыргызстана, прибывших из-за рубежа. В динамике за анализируемые годы вклад мигрантов в общую заболеваемость остается стабильным с размахом от 7,9% (2012г.) до 10,4% (2013г.). В 2015 году заболевшие внешние мигранты составили 9,3% против 10,1% в 2014 г. от числа впервые выявленных больных. Большой удельный вес заболевших приходится

на мигрантов из южных регионов республики, составляя в среднем 59,1% от числа впервые выявленных больных туберкулезом. При этом самый большой удельный вес заболевших мигрантов приходится на Баткенскую и Джалал-Абадскую области, составляя в среднем по 20,6 % и 17,6 % соответственно.

Значительный вклад в заболеваемость туберкулезом в республике вносит и контингент ГСИН. Динамика заболеваемости за период с 2011-2016 годы среди данного контингента характеризуется стабильностью с высоким ее уровнем. Всего за этот период было выявлено 1054 случая заболевания со средним интенсивным показателем 2408,8 с размахом от 1590,0 в 2016 году до 3804,3 в 2011. Умерло от туберкулеза в ГСИН 109 больных, средний показатель смертности составил 281,7 с вариациями от 212,1 в 2015 году до 401,6 в 2012 году таблица 3.2.5

Таблица 3.2.5 - Данные заболеваемости и смертности от туберкулеза в ГСИН за период 2011 -2015 гг.

Годы	Абс.число	ИП	Абс.число	ИП
2011	292	3804,3	19	247,5
2012	177	2293,0	31	401,6
2013	149	1917,9	25	321,8
2014	135	1789,0	17	225,9
2015	169	2240,2	15	212,1
Всего	922	2408.8	107	281.7

Туберкулез является одним из основных нозологических форм из числа ВИЧ ассоциируемых инфекций. Для выявления ВИЧ инфекции проводятся обязательные исследования среди больных туберкулезом. Доля обследованных на ВИЧ инфекцию туберкулезных больных в среднем составляет - 85.8 %. Наименьший охват тестированием на ВИЧ среди больных туберкулезом отмечается в Чуйской и Иссык-Кульской областях.

В Кыргызской Республике за период 2011-2015 гг. всего было зарегистрировано 1144 случая заболеваемости туберкулезом среди ВИЧ инфицированных. Удельный вес больных с коинфекцией составил 31,1%. Из всех случаев зарегистрированных больных туберкулезом в республике прошли исследования на ВИЧ -85,8%.

За анализируемый период 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 2016г он снизился до 29,1% (Рис 3.2.3)

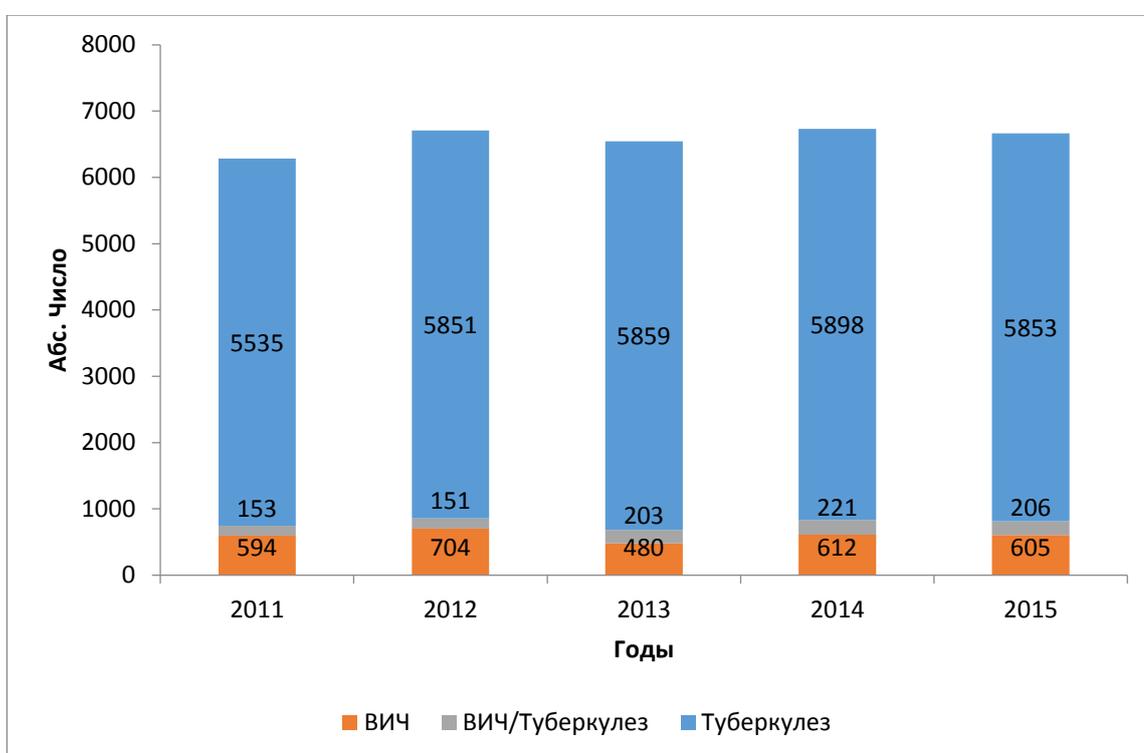


Рис 3.2.3. Заболеваемость туберкулезом среди ВИЧ инфицированных. 2011-2015гг.

Показатель смертности от туберкулеза у ВИЧ-инфицированных за анализируемые годы оставался стабильным в пределах от 1,2 до 1,3, и соотношение между показателем смертности и показателем заболеваемости менялось. Так, 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 3.2.4

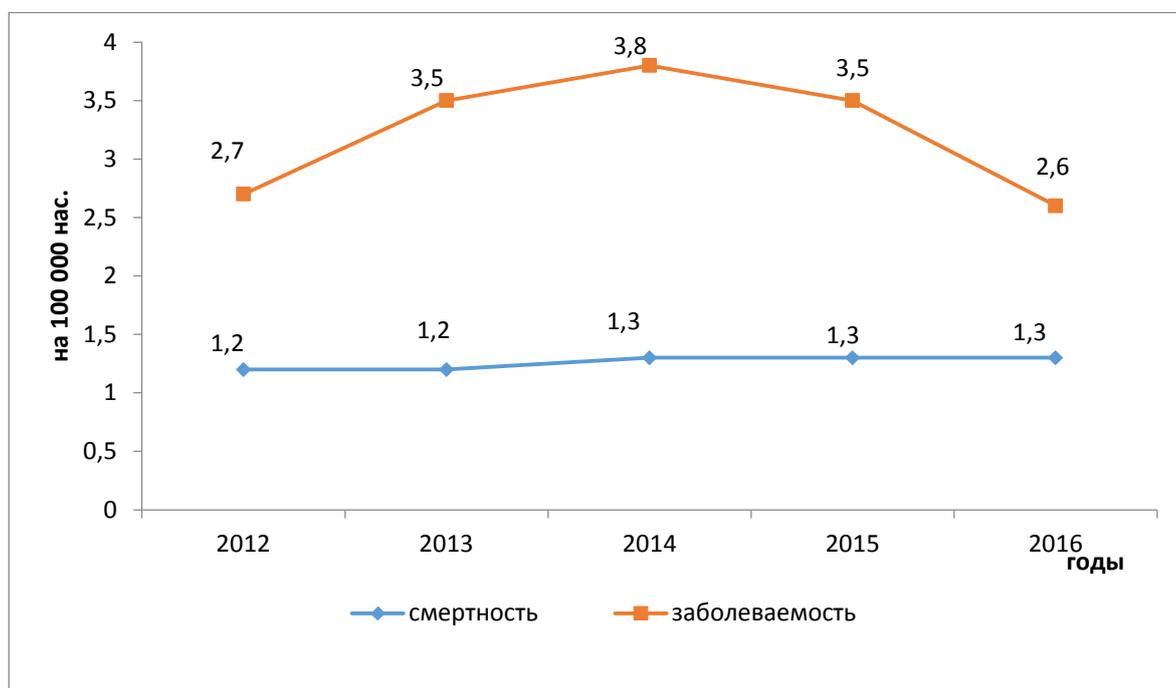


Рис.3.2.4 Показатели заболеваемости и смертности от туберкулеза у ВИЧ инфицированных за 2012-2016гг.

Таким образом, эпидемический процесс при туберкулезе в республике характеризуется высоким уровнем заболеваемости подростков (76,7 на 100 тысяч), лиц мужского пола (73,8%), вовлечением в эпидпроцесс медицинских работников (252 случаев), контингента ГСИН (1054 случая) и ВИЧ инфицированных (1144 случая).

## ГЛАВА IV

### РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ТУБЕРКУЛЕЗА в КР по КЛИНИЧЕСКИМ ФОРМАМ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЗА ПЕРИОД 2000-2016гг

#### 4.1 Выявляемость туберкулеза рутинными методами диагностики в КР

В республике средний удельный вес выявленных на профилактических осмотрах больных туберкулезом за 2011-2015 годы составляет 22,0%. Размах доли выявления больных по годам от 17,5% в 2015 году до 28,1% в 2013 году. Лучшее выявление больных на профилактических осмотрах обстоит в городе Бишкек, где в среднем за анализируемые годы заболевание туберкулезом диагностировано у 34,9% больных. Доли выявляемости туберкулеза на профилактических осмотрах в Иссык-Кульской, Чуйской областях, и г.Ош составляют 30,5%, 28,3%, 27,4% соответственно. По остальным регионам этот показатель варьирует от 4,5% в Баткенской области до 16,8% в Жалал-Абатской области (таблица 4.1.1).

Таблица 4.1.1-Удельный вес впервые выявленных больных туберкулезом при профилактических осмотрах (%) по регионам республики.

Области	2011	2012	2013	2014	2015
КР	20,8	20,0	28,1	23,8	17,5
Баткенская	2,8	2,0	4,1	9,8	3,9
Джалал-Абадская	29,4	4,3	16,6	21,1	12,9
Иссык-Кульская	37,4	34,8	24,5	27,8	21,0
Нарынская	10,7	12,0	9,0	7,2	2,2
Ошская	7,5	5,9	17,8	19,3	12,7
Таласская	16,4	13,5	13,7	15,7	6,8
Чуйская	21,4	22,1	55,1	24,3	18,8
г.Бишкек	31,2	34,6	38,2	35,9	34,8
г.Ош	27,4	20,5	28,9	43,9	16,3

Флюорографическое обследование декретированного контингента и групп риска за анализируемые годы в среднем выполнялось на 85,1%. В динамике за 2011-2015 годы удельный вес флюорографического обследования выполнялся от 83,1% в 2011 году до 87,5% в 2014 году. Выявляемость туберкулеза среди декретированного контингента была в пределах 0,2%-0,3%.

Требовалось дополнительное дообследование у 91,2% положительных флюорографических обследованных лиц в результате, которого диагноз туберкулез был подтвержден в 9,6% случаях таблица 4.1.2

Таблица 4.1.2-Результаты флюорообследования декретированного контингента и групп риска за 2011-2015 годы в Кыргызской Республике

Годы	план	Выполнено	%	Из них		Из них выявлено ТБ		
				В.т.ч. фл+	Дообследовано	Абс.ч исслед	%от до-следованных	%от выполнения
2011	605463	502968	83,1	13101	11801	1200	10,2	0,26
2012	609004	516771	84,9	13295	12088	1331	11,0	0,3
2013	636633	553118	86,9	15359	13385	1266	9,5	0,2
2014	634055	554980	87,5	15804	14912	1358	9,1	0,2
2015	656367	566949	86,4	14500	13592	1214	8,9	0,2
Σв сред	628304	534957	85,1	14419	13156	1274	9,6	0,2

Выявление инфицированности туберкулезом детей проводится постановкой реакции Манту. За анализируемые годы в среднем было обследовано реакцией Манту 342103 детей, что составило 81,9% от плана. В динамике за 2011-2015 годы удельный вес подлежащих обследованию детей колебался в пределах от 15,5% в 2011 году до 99,1% в 2012 году. Низкий экстенсивный показатель в 2011 году объясняется отсутствием туберкулина, а

2014 году поздним его поступлением. Наиболее полный охват детей туберкулинодиагностикой был выполнен только 2012 и 2013 годах по 99,1 и 93,7 соответственно таблица 4.1.3.

Таблица 4.1.3-Результаты туберкулинодиагностики в КР за 2011-2015 годы

Годы	План	Выполнено	%	Из них		Из них выявлено ТБ		
				Нужд. в конс.	Консультировано	Абс. число	%отконсультированных	%отвыполнения
2011	59130 +НЦФ 12000	80823	15,5	6708	6570	113	1,1	0,14
2012	630429	624992	99,1	52139	50534	520	1,0	0,08
2013	670482	628148	93,7	48088	46158	448	1,0	0,07
2014	428713	174748	40,8	18213	13770	126	0,9	0,07
2015	299616	201806	67,4	16938	16166	314	2,0	0,15
Σср.	417674	342103	81,9	28417	17408	304	1,7	0,08

Таким образом, рутинные методы диагностики при значительном числе обследованных лиц дают маленькую долю выявляемых больных туберкулезом. При профилактических осмотрах в среднем выявляется около 22,0% больных, при флюорографическом обследовании – 0,2% и постановке реакции Манту - 0,08%.

#### 4.2 Запущенные формы туберкулеза.

Несмотря на позитивные сдвиги в противотуберкулезной борьбе в эпидемическом процессе появились особенности в развитии современного туберкулеза. Сокращение охвата населения профилактическими

осмотрами способствовало уменьшению доли больных туберкулезом, выявленных на ранних стадиях его развития. Появились микобактерии туберкулеза, устойчивые к лекарственным средствам.

На формирование запущенных форм туберкулеза влияют как поздняя диагностика, так и погрешности в лечебных мероприятиях. В Кыргызской республике запущенные случаи туберкулеза в среднем составили 489 случаев от 33597 случаев впервые выявленного туберкулеза за 2011-2016 годы. Удельный вес запущенных случаев составил 1,5%.

В динамике за анализируемые годы доля запущенных случаев имела тенденцию к повышению с 1,3% в 2011 году, до 1,7% и 1,67% в 2014 и 2016 гг. Высокая доля запущенных случаев туберкулеза выявлялась в Нарынской области, где удельный вес за анализируемые годы составил 3,4%, а размах по годам варьировал от 1,4% в 2012 году и 5,2 в 2014 году. Самая маленькая доля запущенных случаев наблюдается в Чуйской области – 0,5% с размахом от 0,5 до 1,7%. В Иссык-Кульской области экстенсивный показатель запущенных случаев за анализируемые годы составил 2,1% при этом наблюдается рост данного показателя с 1,3% в 2011 году до 2,7% в 2014 году с последующим снижением до 1,4 % 2015 г. В городе Бишкек и Таласской области экстенсивный показатель запущенных случаев туберкулеза составляет 1,9% и 1,8% соответственно, при этом в г. Бишкек в динамике наблюдается снижение данного показателя до 0,6% с размахом от 1,2 в 2011 году до 3,1% в 2014 г. а в Таласской области от 1,6% в 2015 году до 4,0% в 2011 году. В Джалал-Абатской, 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 Джалал-Абатской области этот показатель оставался стабильным во все годы наблюдения (1,1%-1,4%) с последующим снижением в 2015 году (0,8%). В Баткенской области экстенсивный показатель запущенных случаев имел тенденцию к росту с 0,9% до 2,0% в 2014 году и снижением до 0,8% в 2015 г. В Ошской области наблюдался рост доли запущенных случаев с 0,6% в 2013 году до 1,6% в 2015 году и в г. Ош также отмечается рост этого

показателя с 0,4% в 2013 году до 2,5% в 2015 г. таблица 4.2.1. По этим показателям можно дать оценку эффективности лечебно-диагностических мероприятий, проводимых на территории обслуживания противотуберкулезной службы. Доля запущенных случаев в динамике по всем регионам несколько увеличилась к 2014г по сравнению с предыдущими годами, но в 2015 году намечается снижение, кроме города Ош.

Эти данные свидетельствуют о поздней выявляемости болезни на уровне ПМСП, 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.

Таблица 4.2.1. Запущенные случаи туберкулеза по регионам КР за период 2011-2015гг.

Регионы	2011 год			2012 год			2013 год			2014 год			2015 год			Всего		
	запу-нные случаи	Всего выяв лено	%	запу-нные случаи	Всего выяв лено	%	запу-нные случаи	Всего выяв лено	%	запу-нные случаи	Всего выяв лено	%	запу-нные случаи	Всего выяв лено	%	запу-нные случаи	Всего выяв лено	%
Республика	69	5243	1,3	72	5674	1,7	79	5642	1,4	100	5763	1,7	64	5640	1,1	397	28049	1,4
Баткенская	3	351	0,9	5	410	1,2	6	428	1,4	8	409	2,0	3	354	0,8	25	1877	1,3
Джалал-Абадская	10	851	1,2	10	904	1,1	11	846	1,3	13	948	1,4	7	868	0,8	41	4417	0,9
Иссык-Кульская	4	302	1,3	9	316	2,8	8	320	2,5	8	295	2,7	4	276	1,4	33	1509	2,1
Нарынская	10	251	4,0	4	280	1,4	6	240	2,5	14	268	5,2	10	229	3,9	44	1268	3,4
Ошская	10	991	1,0	9	1039	0,9	7	1166	0,6	19	1101	1,7	19	1106	1,7	64	5403	1,1
Таласская	10	252	4,0	1	230	0,4	3	250	1,2	4	250	1,6	4	248	1,6	22	1230	1,7
Чуйская	8	1096	0,7	8	1196	0,7	3	1066	0,2	6	1114	0,5	5	1236	0,5	30	5708	0,5
г.Бишкек	11	929	1,2	21	1052	2,0	34	1096	3,1	24	1102	2,2	7	1085	0,6	97	5264	1,8
г.Ош	3	220	1,4	5	247	2,0	1	230	0,4	4	276	1,4	5	238	2,1	18	1211	1,4

### 4.3. Лекарственно-устойчивый туберкулез.

Одним из проявлений изменчивости МБТ является устойчивость к лекарственным препаратам против туберкулеза. Лекарственная устойчивость появляется при прерывании лечения. Если у больного возникает рецидив, то, скорее всего, речь идет о лекарственно-устойчивой форме, поскольку рецидив обычно развивается у тех, кто недостаточно хорошо пролечился. Выжившие в результате такого лечения палочки Коха приобретают устойчивость к лекарственным препаратам, поэтому для лечения таких случаев нужны особые усилия

Лечение туберкулеза долгое — не менее 6 месяцев, если через 4 месяца пациент бросает лечение, то какие-то палочки выживают. Они мутируют, укрепляются и дают рост новым популяциям бактерий, устойчивым к этим лекарствам. К возникновению лекарственной устойчивости может привести и неверно выбранная комбинация препаратов, либо некачественные препараты. Лекарственная устойчивость вырабатывается тогда, когда лечение проводится неправильно или недостаточно длительно. В настоящее время отмечается рост микобактерий с лекарственной устойчивостью. По классификации ВОЗ (1998) МБТ могут быть: монорезистентные — к одному противотуберкулезному препарату; полирезистентные — к двум и более противотуберкулезным препаратам, но не к сочетанию изониазида и рифампицина (самые эффективные лекарства, обладающие бактерицидным действием на МБТ); множественно-лекарственно-резистентные — как минимум к сочетанию изониазида и рифампицина.

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 годом и в 47 раз по сравнению с 2005 годом. В динамике за наблюдаемые годы отмечается выраженная тенденция роста удельного веса лекарственно-устойчивого туберкулеза. В 2010 году экстенсивный показатель этой формы туберкулеза

составлял 10,2%, начиная с 2013 года он вырос до 20,5% с последующим ростом до 20,7% в 2015 г. таблица 4.3.1

Таблица 4.3.1-Удельный вес лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, в Кыргызской Республике за 2010-2015гг.

Годы	Число заболеваний	Число МЛУ/ШЛУ	%	±m	ДИ
2010	5510	566	10,2	0,4	10,1-10,9
2011	5243	804	15,3	0,4	14,5-16,0
2012	5674	958	16,8	0,4	16,0-17,5
2013	5642	1160	20,5	0,5	20,0-21,0
2014	5763	1186	20,5	0,5	20,0-21,0
2015	5640	1172	20,7	0,5	20,2-21,2
Всего	33472	5846	17,4	0,2	17,2-17,6
∑ сред.	5578	974			

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 РУ -17,9%, МЛУ- 77,6% и ШЛУ-4,5%. Территориально доля больных с лекарственной устойчивостью распределяется следующим образом: в Чуйской области – 23,2%, в городе Бишкек – 21,7%, Ошской области -17,1% и Джалал-Абатской области – 14,7%. В динамике отмечается рост числа регистрируемых лекарственно устойчивых форм туберкулеза. При этом необходимо отметить, что основная доля лекарственно устойчивых больных туберкулезом находится среди гражданского населения. Экстенсивный показатель доли лекарственно устойчивых больных среди этого контингента варьировал от 47,0% до 100% и имел тенденцию к росту до 2013 года, что свидетельствует о организационных трудностях в контроле за соблюдением режима приема противотуберкулезных препаратов при амбулаторном лечении. Однако, 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% рисунок 4.3.1.

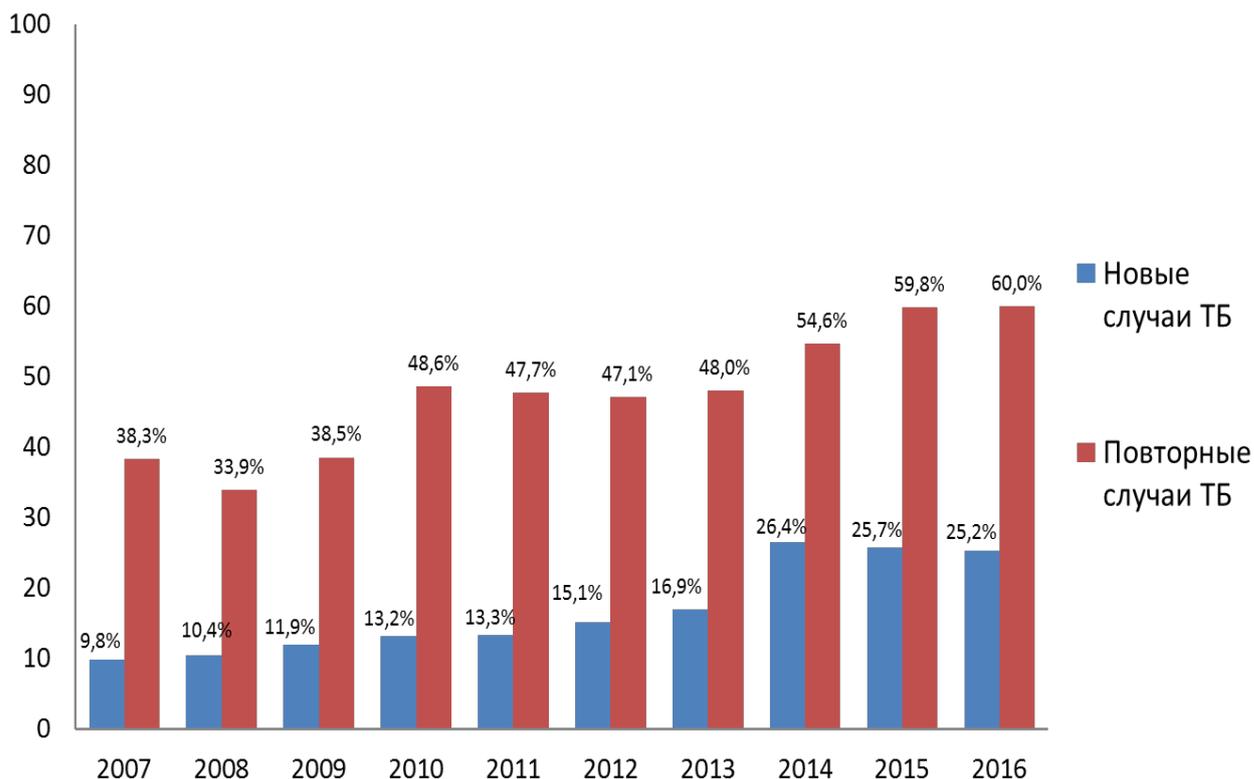


Рис. 4.3.1 Число, выявленных МЛУ/ШЛУ-ТБ в Кыргызской Республике за период 2007-2016 гг.

Распространенность ТБ в стране в 1990 году была на уровне в среднем 190 на 100 000 населения. К 1999 году распространенность достигла пика, затем пошла на снижение и с этого периода наблюдается тенденция к снижению данного показателя. В тоже время, 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. Необходимо отметить, что во все годы наблюдения удельный вес МЛУ среди гражданского населения был достаточно высок с размахом 47,7% в 2007 году до 100%. В тоже время число случаев МЛУ среди больных из ГСИН имеет тенденцию к снижению, что свидетельствует об эффективности контроля за своевременностью и регулярностью проводимого лечения. Если в 2008 году удельный вес числа случаев МЛУ в ГСИН составляло 43,3%, то в 2014 они этот показатель был уже 3,6 %.

В 2013 году в Кыргызской Республике зарегистрировано 5710 впервые выявленных больных туберкулезом, против 5674 в 2012 году (с системой Государственного исполнения наказания (ГСИН) при Правительстве КР 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. Как известно, сочетанная инфекция ТБ и ВИЧ, также остается угрозой системе общественного здравоохранения страны.

Таким образом, доля больных с МЛУ и ШЛУ имеет тенденцию к росту, что осложняет эпидемиологическую ситуацию в связи с заражением новых больных устойчивыми формами возбудителя.

#### **4.4. Оценка бремени туберкулеза в КР.**

Кыргызстан 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, что не может не отражаться на экономике. Необходимо отметить, что выполнение

противотуберкулезных программ, направленных на выявление и эффективное лечение повлияло на изменение показателей заболеваемости от туберкулеза, а также смертность по данному заболеванию в целом. В данном случае индикатором действенности программы против туберкулеза является уровень заболеваемости и смертности.

В настоящее время стали активно использовать количественные показатели эпидемиологической ситуации для определения ущерба от заболеваний: а) временная утрата трудоспособности; б) инвалидность; в) смертность; г) распространенность и DALY (disabilityadjustedlifecycleyears) [10], которые отражают частоту и глубину воздействия заболевания.

Заболеваемость туберкулезом населения республики остается высокой, превышая в два раза предельный рекомендуемый ВОЗ уровень(рис 4.4.1.).

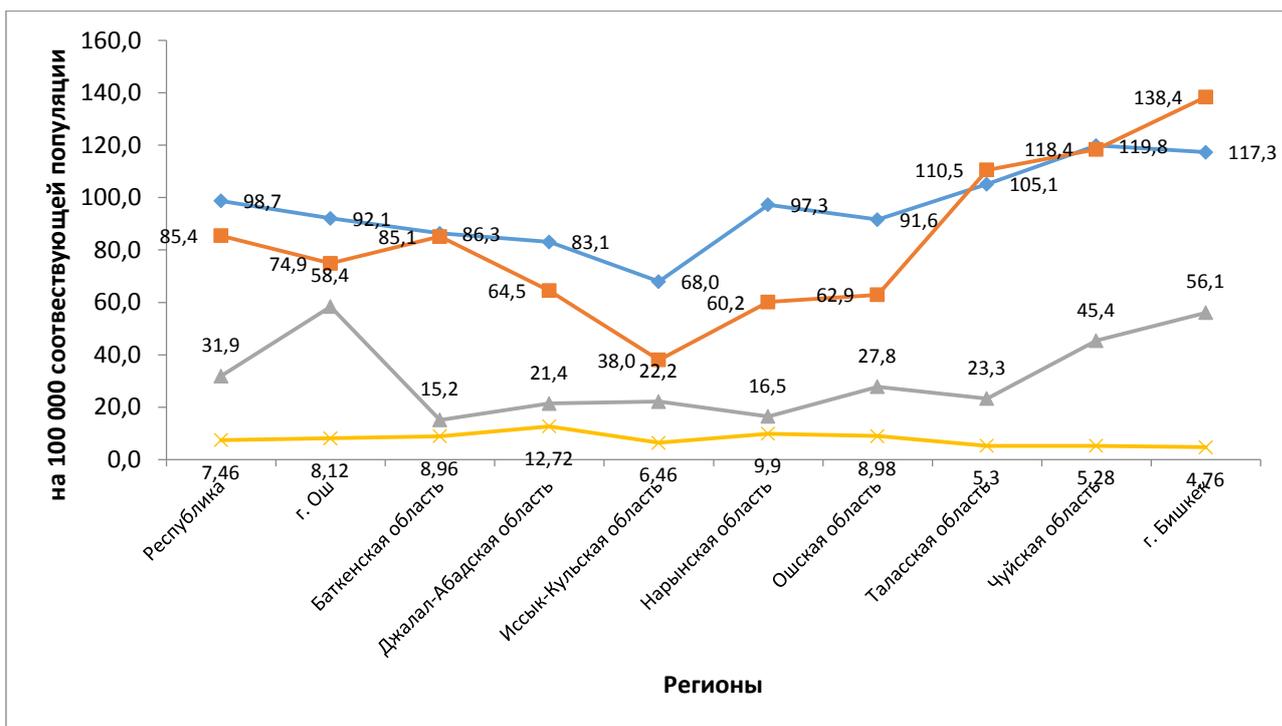


Рис. 4.4.1 Распределение общей заболеваемости, подростков, детей и смертности по регионам республики.

При этом удельный вес заболеваемости туберкулезом детей и подростков варьирует от 16,2% до 26,3%, а интенсивный показатель заболеваемости подростков всего на 17,7%, детей – 32,9%. Меньше общего показателя

заболеваемости. При этом высокий уровень заболеваемости подростков наблюдается в Баткенской, Таласской, Чуйской областях и в г. Бишкек где интенсивные показатели заболеваемости подростков одинаковы с общими показателями, а в г. Бишкек они даже на 15,3% выше.

Средние многолетние показатели заболеваемости туберкулезом детей и подростков свидетельствуют о том, что дети и подростки чаще вовлекаются в эпидемический процесс в городе Бишкек и Чуйской области, где средний многолетний показатель составляет  $56,1 \pm 0,3$  и  $138,4 \pm 0,8$ ;  $45,4 \pm 0,1$  и  $118,4 \pm 0,07$  соответственно, таблица 4.4.1.

Таблица 4.4.1-Средняя заболеваемость туберкулезом детей и подростков в КР

	Средняя заболеваемость детей, 2011-2015гг				Средняя заболеваемость подростков, 2011-2015гг			
	М	$\pm m$	95% ДИ	P значение	М	$\pm m$	95% ДИ	P значение
Республика	31,9	0,035	31,83-31,97		85,4	0,063	85,28-85,52	
Баткенская	15,2	0,09	15,02-15,38	1-2 < 0.01	85,1	0,2	84,7-85,5	1-2 < 0.05
Джалал-Абадская	21,4	0,068	21,27-21,53	1-3 < 0.01	64,5	0,183	64,14-64,86	1-3 < 0.01
Иссык-Кульская	22,2	0,11	22,18-22,62	1-4 < 0.01	38,0	0,305	37,4-38,6	1-4 < 0.01
Нарынская	16,5	0,12	16,26-16,74	1-5 < 0.01	60,2	0,379	59,46-60,94	1-5 < 0.01
Ошская	27,8	0,07	27,66-27,94	1-6 < 0.05	62,9	0,174	62,56-63,24	1-6 < 0.01
Таласская	23,3	0,143	23,02-23,58	1-7 < 0.01	110,5	0,091	110,32-110,68	1-7 < 0.01
Чуйская	45,4	0,1	44,84-45,24	1-8 < 0.01	118,4	0,078	118,25-118,55	1-8 < 0.01
г. Бишкек	56,1	0,321	55,47-56,73	1-9 < 0.01	138,4	0,081	138,19-138,51	1-9 < 0.01
г. Ош	58,4	0,18	58,05-58,75	1-10 < 0.01	74,9	0,366	74,18-75,62	1-10 < 0.05

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,±0,2 в Баткенской области. Заболеваемость детей высокая в городах Ош, Бишкек и Чуйской области составляя 58,4 ± 0,1, 56,1 ± 0,3 и 45,4 ±0,1 соответственно. По остальным регионам этот показатель варьирует от 15,2 ±0,09 в Баткенской области до 27,8 ±0,07 в Ошской области

За 2000-2016 гг. средний показатель смертности по Кыргызстану составил 13,0±0,01 случаев /100,000 населения.

На рисунке 4.4.2 видно, 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. По остальным регионам размах этого показателя составил 6,9% в Ошской области до 8,2% в Таласской области.

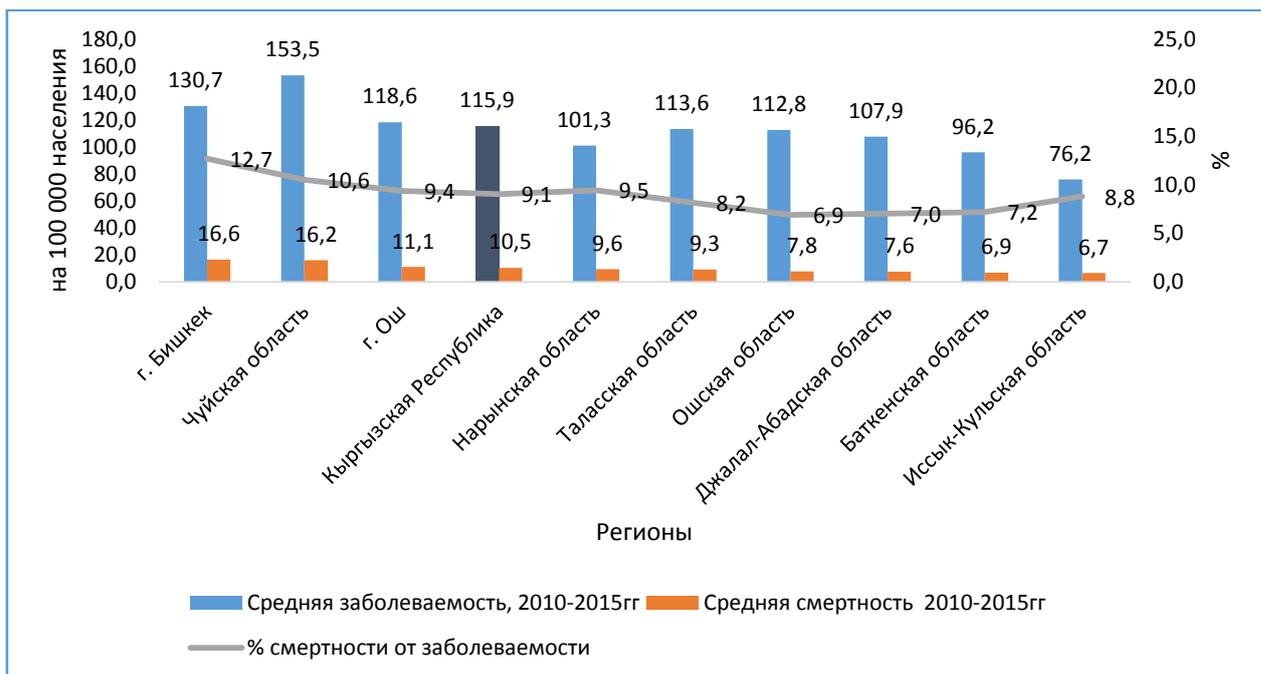


Рис.4.4.2 Средняя заболеваемость и смертность от туберкулеза по регионам Кыргызской Республики.

Соотношение смертности к заболеваемости по среднегодовым 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 больных, а в городе Ош и Нарынской области среди 10 больных туберкулезом. Сравнительно лучше эти показатели выглядят в Ошской, Жалал-Абатской, Баткенской и Таласской областях где один случай смерти отмечается среди 15, 14,13, и 12 больных туберкулезом. По этим данным можно дать оценку эффективности проводимых диагностических и лечебных мероприятий по этим регионам.

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%. Также выше республиканского уровня число запущенных случаев в Нарынской и Иссык-Кульской областях (по 2,5%). В г.Ош уровень запущенных случаев уменьшился в четыре раза и составил 0,5% (в 2012г. – 2,0%). Как и в предыдущий год в отчетном году самый низкий уровень запущенных случаев в Чуйской и Ошской областях (1,3 и 0,6% соответственно).

В Кыргызской Республике индекс ущерба по ГППЖ из-за преждевременной смерти за 2001 год составил: среди детского населения 189 лет, среди подростков – 110 год и среди взрослых 18275 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=x раз наблюдается рост показателя смертности среди детей на 25%. В сумме за 2001 этот показатель был равен 18574 годам, а в 2015 – 13412 годам. Необходимо отметить, что наибольший урон обществу туберкулез оказывает популяции наиболее трудоспособного возраста, самый высокой уровень ГППЖ оказался среди возрастной группы от 20 до 50 лет составив 13800 лет в 2001 г. и 10050 в 2015 году.

Экономический ущерб зависит от вида назначенного лечения и клинических форм туберкулеза. Амбулаторное лечение в 3 раза дешевле стационарного, не нарушает образ жизни больного, исключая длительный отрыв от семьи на время лечения в стационаре. Позволяет продолжать трудовую деятельность, снижает боязнь и риск внутрибольничного заражения, улучшает приверженность к лечению. В 2016 году 21,8% больных получали амбулаторное лечение. Лечение противотуберкулезными препаратами 2 –го ряда ПЛУ-ТБ, РУ/МЛУ-ТБ и ШЛУ-ТБ обходится намного дороже. Так в 2016 году на лечение больных с МЛУ-ТБ затрачено 4504,95 долларов США, ПЛУ-ТБ- 4059,97, ШЛУ-ТБ-2974,5 долларов США. Всего за 2016 год вместе с остальными больными экономический ущерб от туберкулеза составил 7464230,4 долларов США. В понятие бремя туберкулеза мы включили заболеваемость, смертность, наличие запущенных случаев болезни, МЛУ, ШЛУ лекарственно-устойчивых форм туберкулеза

Таблица 4.4.2- Оценка бремени ТБ в Кыргызстане за 2011-2015 год

Оценка бремени ТБ * 2011-2015 гг.	Показатели	95% ДИ
Средняя заболеваемость (в том числе ВИЧ+ТБ)	98,7±0,005 <sup>0</sup> / <sub>0000</sub>	98,6-98,71
Средняя смертность (за исключением ВИЧ+ТБ)	7,5±0,011 <sup>0</sup> / <sub>0000</sub>	7,48-7,52
Средняя заболеваемость детей	31,9±0,035 <sup>0</sup> / <sub>0000</sub>	31,83-31,97
Средняя заболеваемость подростков	85,4±0,063 <sup>0</sup> / <sub>0000</sub>	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

Как видим из таблицы, биологическое бремя туберкулеза в республике высокое превышая показатели, рекомендуемые ВОЗ в два раза. Отмечается высокий уровень заболеваемости подростков, запущенные случаи и ЛУ туберкулез составляет по  $1,38 \pm 0,1$  и  $17,8 \pm 1,2$ .

Итак, в многолетней динамике показатели смертности от туберкулеза населения Кыргызской республике имеют выраженную тенденция к снижению с темпом - 47,0%, что свидетельствует об эффективности проводимых диагностических, лечебных и профилактических мероприятий по борьбе с туберкулезом. В то же время наиболее высокое биологическое бремя от туберкулеза наблюдается в Чуйской области и в городе Бишкек, где самый высокий удельный вес смертности у больных туберкулезом. Наиболее уязвимой возрастной группой с высоким бременем туберкулеза от потенциально потерянных лет жизни являются лица активного работоспособного возраста 20-50 лет. В целом в 2015 году наблюдается снижение индекса ущерба от ГППЖ в 1,3 раза по сравнению с 2001 годом. Экономическое бремя от туберкулеза зависит от вида лечения: амбулаторного или стационарного, а также клинических форм туберкулеза (запущенные формы, лекарственно-устойчивые формы). Общий экономический ущерб от туберкулеза за 2014-2015 годы составил 7464230,4 долларов США.

## ГЛАВА V.

# СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОВРЕМЕННЫХ И ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ МИКОБАКТЕРИЙ 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 Миддлбрука 7Н9 в автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 960 (МГИТ 960) и на чашки с агаровой средой Миддлбрук 7Н11, разделенные на 2 сектора: 1 сектор - с антибиотиками(с антибиотиками – 7Н11 селективный агар) – для подавления роста посторонней микрофлоры и получения чистой культуры микобактерий; 2 сектор - без антибиотиков – для выделения штаммов микобактерий, рост которых могут ингибировать антибиотики.

### **5.1. Исследование на автоматизированной системе Bactec MGIT 960**

#### **5.1.1. Сравнительная оценка эффективности автоматизированной системы ВАСТЕСМГИТ 960 и среды Левенштейна-Йенсена при первичной изоляции *M. Tuberculosis***

В Республиканской референс лаборатории НЦФ исследовано 2547 образцов в автоматизированной системе ВАСТЕСМГИТ 960(АсВ 960), из которых 1113 образцов являлись мазок положительными (табл. 5.1.1).

Таблица 5.1.1.1– Распределение исследований по результатам посева на автоматизированной системеВАСТЕСMGIT 960 в зависимости от результатов микроскопии

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

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 (МТ). 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. 5.1.2). 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.

Таблица 5.1.1.2 - Распределение исследований по результатам посева на среде Левенштейна-Йенсена в зависимости от результатов микроскопии

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

Пациентам больных с туберкулезом органов дыхания, у которых результаты прямой микроскопии мазка мокроты с окрашиванием по Цилю-Нильсену были отрицательные, но клинико-рентгенологическая картина со стороны легких требовала дальнейшего обследования, получили возможность ранней диагностики заболевания и лечения. 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 ЛЙ в отношении выявления микобактерий и сроков детекции.

### 5.1.2. Сравнительная оценка эффективности автоматизированной системы BDBASTECMGIT 960 и среды Левенштейна-Йенсена при определении лекарственной чувствительности M. Tuberculosis

Для оценки лекарственной чувствительности (ТЛЧ) на изониазид, рифампицин, стрептомицина, этамбутол и к множественной форме лекарственной устойчивости (HR) было проведено 234 параллельных посевов штаммов МБТ, из них 117- на с Л-Й, 117 - на диагностическую тест-систему BDBASTECMGIT 960 (BBM 960).

Основные показатели определения лекарственной устойчивости (ЛУ) на BBM 960 к каждому препарату представлены в нижеследующих таблицах.

По представленным данным в 87 случаях была определена устойчивость к изониазиду (Н) методом абсолютных концентраций на с Л-Й и в 85 случаях устойчивость подтверждена на BBM 960. (табл 5.1.2.1).

Таблица 5.1.2.1 - Распределение результатов исследований на устойчивость МТ к изониазиду (Н) на BDBASTECMGIT 960 в зависимости от результатов исследования на среде Левенштейна-Йенсена

Диагностическая тест-система BDBASTECMGIT 960	Среда Левенштейна – Йенсена		Всего	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Эффективность (%)
	МБТ устойчивые к Н	МБТ чувствительные к Н				
МБТ устойчивые к Н	85	2	87	97,7	91,4	96,6
МБТ чувствительные к Н	2	32	34			
<b>ВСЕГО</b>	87	34	121			

В 34 случаях определена чувствительность к Н методом абсолютных концентраций на с Л-Й, 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 с Л-й и в 54 случаях устойчивость подтверждена на тест-системе ВВМ 960(табл.5.1.2.2).

Таблица 5.1.2.2 - Распределение результатов исследований на устойчивость МТ к рифампицину (R) на ВДВАСТЕСМГИТ 960 в зависимости от результатов исследования на среде Левенштейна-Йенсена

Диагностическая тест-система <b>ВАСТЕСМГИТ 960</b>	Среда Левенштейна – Йенсена		Всего	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Эффективность (%)
	МБТ устойчивые к R	МБТ чувствительные к R				
МБТ устойчивые к R	54	2	56	96,4	96,8	96,6
МБТ чувствительные к R	2	61	63			
<b>ВСЕГО</b>	56	63	119			

В 2 –х случаях устойчивость к R не подтверждена на МГИТ. В 63 случаях определена чувствительность к R методом абсолютных концентраций на с Л-Й

и в 61 случае чувствительность подтверждена на тест-системе BDBASTЕСMGIT960. В 2 –х случаях устойчивость не подтверждена на MGIT. Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к Rна тест-системе BDBASTЕСMGIT 960 составили, соответственно 96,4% и 96,8%, эффективность теста – 96,6%.

Как следует из табл.5.1.2.3. в 50 случаях была определена устойчивость к этамбутолу (E) методом абсолютных концентраций на питательной с Л-Й и в 43 случаях устойчивость подтверждена на BVM 960.

В 7 случаях устойчивость к E не подтверждена на MGIT. В 81 случае определена чувствительность к E методом абсолютных концентраций на питательной с Л-Й и в 74 случаях чувствительность подтверждена на тест-системе BVM 960. В 7 случаях чувствительность не подтверждена на MGIT. Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к E на тест-системе BDBASTЕСMGIT 960 составили, соответственно 86% и 91,3%, эффективность теста – 89,3%.

Таблица 5.1.2.3 -Распределение результатов исследований на устойчивость MT к этамбутолу (E) на BDBASTЕСMGIT 960в зависимости от результатов исследования на среде Левенштейна-Йенсена

Диагностическая тест-система BDBASTЕСMGIT 960	Среда Левенштейна – Йенсена		Всего	Чувствительность (%)	Специфичность(%)	Эффективность (%)
	МБТ устойчивые к E	МБТ чувствительные к E				
МБТ устойчивые к E	43	7	50	86	91,3	89,3
МБТ чувствительные к E	7	74	81			
<b>ВСЕГО</b>	50	81	131			

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 BDBASTЕСMGIT 960 (табл. 5.1.2.4). В 1 случае устойчивость к S не подтверждена на MGIT. В 29 случаях определена чувствительность к S методом абсолютных концентраций на питательной с Л-Й и в 30 случаях чувствительность подтверждена на тест-системе BDBASTЕСMGIT 960. В 1 случае чувствительность не подтверждена на среде Л-Й. Таким образом, чувствительность и специфичность при определении лекарственной чувствительности к S на тест-системе BDBASTЕСMGIT 960 составили, соответственно 98,8 и 103,4%, эффективность теста – 100%.

Таблица 5.1.2.4 - Распределение результатов исследований на устойчивость МТ к стрептомицину (S) на BDBASTЕСMGIT 960 в зависимости от результатов исследования на среде Левенштейна-Йенсена

Диагностическая тест-система BDBASTЕСMGIT 960	Среда Левенштейна-Йенсена		Всего	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Эффективность (%)
	МБТ устойчивые к S	МБТ чувствительные к S				
МБТ устойчивые к S	86	-1	85	98,8	103,4	100
МБТ чувствительные к S	1	30	31			
ВСЕГО	87	29	116			

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 BDBASTECMGIT 960 (табл. 5.1.2.5). 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 BDBASTECMGIT 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 BDBASTECMGIT 960 составили, соответственно 87,3% и 92,9%, эффективность теста – 90,1%.

Таблица 5.1.2.5 - Распределение результатов исследований на множественную лекарственную устойчивость МТ на BDBASTECMGIT 960 в зависимости от результатов исследования на среде Левенштейна-Йенсена.

Диагностическая тест-система BDBASTECMGIT 960	Среда Левенштейна – Йенсена		Всего	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Эффективность (%)
	МБТ устойчивые к HR	МБТ чувствительные к HR				
МБТ устойчивые к HR	48	4	52	87,3	92,9	90,1
МБТ чувствительные к HR	7	52	59			
ВСЕГО	55	56	111			

Необходимо подчеркнуть, что если на определение лекарственной чувствительности МТ унифицированным методом абсолютных концентраций

на плотных питательных средах затрачивается 3-4 недели, то 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 BDBACTECMGIT 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.

## **5.2. Исследование на GenoTypeMTBDRplus (Хайн тест)**

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 [160,161]. 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 NADHэноил АСРредуктазы) [162,163,164].

Быстрое получение окончательного результата (минимум через 4-6 часов и максимум в течение 2- рабочих дней) является главным преимуществом данной тест-системы.

### 5.2.1. Идентификация комплекса МБТ и определение его устойчивости к рифампицину (RIF) и/или изониазиду (INH)

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 (Таблица 5.2.1.1.)

Таблица 5.2.1.1 - Результаты исследования ТЛЧ тест-системой GenoTypeMTBDRplus

GenoTypeMTBDRplus		Не интерпретируемые результаты	Всего тестов
положительный	отрицательный		
344 (61%)	188 (33%)	36 (6%)	568

Как видно из таблицы 5.2.1.2 и рис.5.2.1.1 суммарная доля штаммов с различными видами устойчивости составила 67%, среди которых 38% были штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ). Данная тест-система предназначена для быстрого определения резистентных к H и R, и доля таковых среди положительных результатов должна быть выше, свидетельствует о нерациональном использовании данного метода детекции устойчивости M. Tuberculosis.

Таблица 5.2.1.2. Характеристика положительных результатов тест-системы GenoTypeMTBDRplus

Результаты *	GenoTypeMTBDRplus	
	Положительный	
	n	%
Штаммы с сохраненной чувствительностью к H и R	110	32
МЛУ ТБ штаммы× (устойчивые к H и R), из них	132	38
× вновь выявленные	53	-
× ранее леченные	70	-
× категория ТБ больного не определена	9	-

Штаммы монорезистентные к H	91	27
Штаммы монорезистентные к R	7	2
МБТ определена, но резистентность не детерминирована	4	1
Всего результатов	344	100

*\*Расшифровку аббревиатур см. в тексте.*

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.

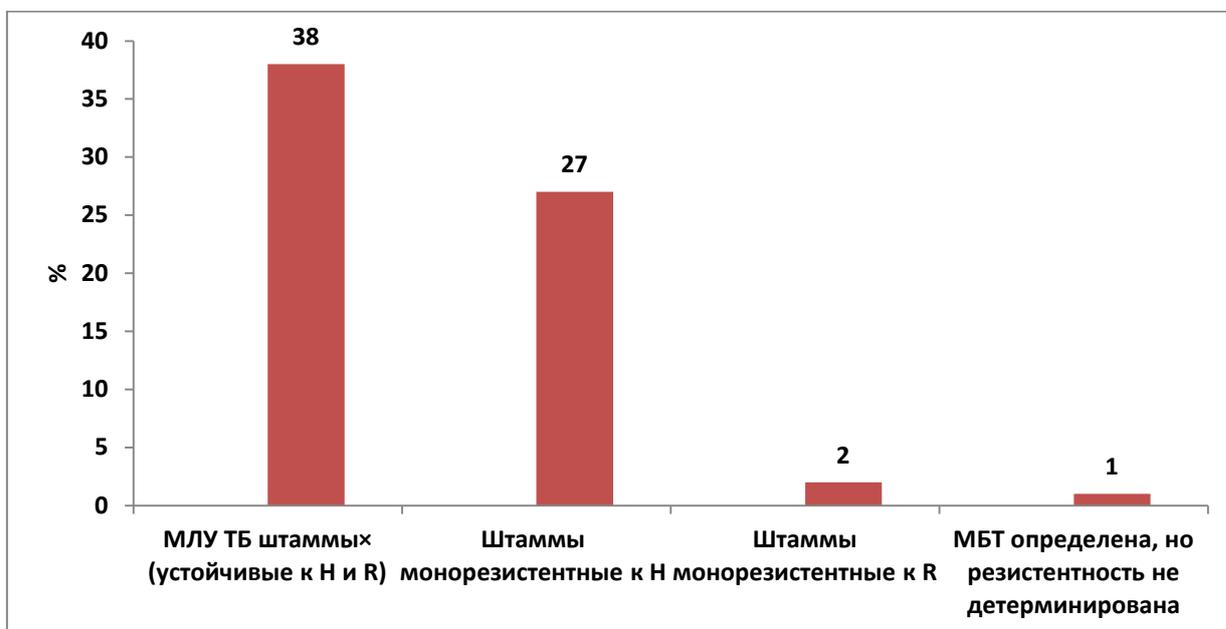


Рис. 5.2.1.1 Распределение резистентных *M.Tuberculosis*, n=344

При проведении теста выявлен низкий – 1% штаммов *M.Tuberculosis*,

когда ДНК определена, но 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.

Возвращаясь к количеству выявленных данным методом как чувствительных, так и устойчивых штаммов *M.tuberculosis* необходимо отметить, потребность в более широком использовании теста, как быстрого метода определения возбудителя заболевания.

### **5.2.2. Сравнительная оценка теста GenoTypeMTBDRplus (Хайн тест) и традиционных методов выявления туберкулеза**

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 (табл. 5.2.2.1). 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%), в то время как больных с предшествующей историей ТБ лечения было обследовано 296 (15,4%).

Таблица 5.2.2.1-Виды патологического материала, взятых в исследование

<b>Материал</b>	<b>%</b>	<b>Количество</b>
Мокрота	85%	1626
Плевральная жидкость	12%	230
Гной	1.50%	29
Асцит	0.05%	10
СМЖ	1.30%	25
Всего	100%	1920

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 (табл. 5.2.2.2).

Таблица 5.2.2.2-Половая и возрастная характеристика обследованных пациентов

	Всего	%	Средний возраст
Всего	1920	100%	38,3
Мужчины	1478	77%	31,2
Женщины	442	23%	28.9

Культуральное исследование всех 1920 образцов дало положительные результаты на рост комплекса *MTu* 1689(88%) пациентов. Образцы от 154(8%) пациентов оказались отрицательными, а у 77(4%) пациентов культуры были контаминированы. (табл.5.2.2.3)

Таблица 5.2.2.3-Распределение результатов бактериологического исследования на *M. Tuberculosis*

	Количество	%
Культура +	1689	88%
Культура -	154	8%
Контаминация	77	4%
Всего	1920	100%

Результаты ТЛЧ на с Л-Й были получены для всех 1689 пациентов с положительной культурой на GenoTypeMTBDRplus (Тест Хайна) (табл. 5.2.2.4)

Таблица 5.2.2.4-Распределение результатов исследований на GenoTypeMTBDRplus в зависимости от результатов бактериологического посева

Результаты Хайн теста	Культура +	Культура -	Контаминация	Всего
Положительный	1678	110	55	1843
Отрицательный	11	44	22	77
Всего по культуре	1689	154	77	1920

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) (табл.5.2.2.5).

Таблица 5.2.2.5. Распределение результатов исследований на GenoTypeMTBDRplus в зависимости от результатов микроскопии мазка

Результаты теста	Хайн	КУБ положительный	КУБ отрицательный	Всего
Положительный		1282	561	1843
Отрицательный		9	46	77
$p<0.05$		-	0,012	1920

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).

### **5.2.3. Сравнительная оценка теста GenoTypeMTBDRplus (Хайн тест) и традиционных методов в изучении лекарственной устойчивости**

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 (табл. 5.2.3.1).

Таблица 5.2.3.1-Результаты устойчивости *M.tuberculosis* согласно Хайн тесту.

Устойчивость к рифампицину и изониазиду, МГМ	N	%
INH+RIF (МЛУ)	1077	58%
RIF	72	3.9 %
INH	215	12.1 %
Чувствительные	479	26%
Всего	1843	100

Все образцы, имевшие положительный результат по культуре (1678 изолятов), были протестированы на лекарственную чувствительность на твердой среде Левенштейна-Йенсена и жидкой среде ВАСТЕСМГИТ 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 (табл.5. 2.3.2).

Таблица 5.2.3.2- Результаты ТЛЧ для образцов с полученными ранее результатами ПЦР

Устойчивость к рифампицину и изониазиду, культуральный метод	N	%
INH+RIF (МЛУ)	916	54.60%
RIF	67	4.00%
INH	343	20.40%
Чувствительные	352	21.00%
Всего	1678	100.00%

#### **5.2.4. Определение частоты основных мутации в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, приводящих к устойчивости к рифампицину и изониазиду в изолятах МЛУ-МТБ**

Аналізу 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%) случаев, а вся устойчивость к изониазиду в 1259 (75%) случаев (табл.5. 2.3.2).

Устойчивость к рифампицину, возникающая в результате мутации S531L в гене *rpoB*, была обнаружена в 1169 (69.7%) случаев; она была самой распространенной(табл.5.2.1). Устойчивость, возникающая 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.

Таблица 5.2.4.1. -Распространенность мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью, в генах *rpoB*, *katG* и *inhA* в геноме МЛУ-изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от новых и повторных случаев ТБ.

Мутация	Количество (%) изолятов МЛУ-МТБ			P
	Все случаи (n = 1678)	Новые случаи (n = 1382)	Повторные случаи (n = 296)	
<i>rpoB</i> S531L	1169 (69.7)	1137(82.3)	167 (56.3)	≤ 0.000001
<i>rpoB</i> H526Y	59 (3.5)	28 (2.0)	9 (3.0)	0.4
<i>rpoB</i> H526D	35 (2.1)	21(1.5)	3 (1.2)	0.2
<i>rpoB</i> D516V	94 (5.6)	94 (6.8)	12 (4.1)	0.25
<i>katG</i> S315T	1457 (86.8)	1313 (95.0)	223 (75.5)	≤ 0.000001
<i>inhA</i> C (-15) T	413 (24.6)	395 (28.6)	62 (21.1)	0.01
<i>inhA</i> T (-8) C	15 (0.9)	8 (0.6)	4 (1.5)	0.38

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 *rpoB*S531L (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*.

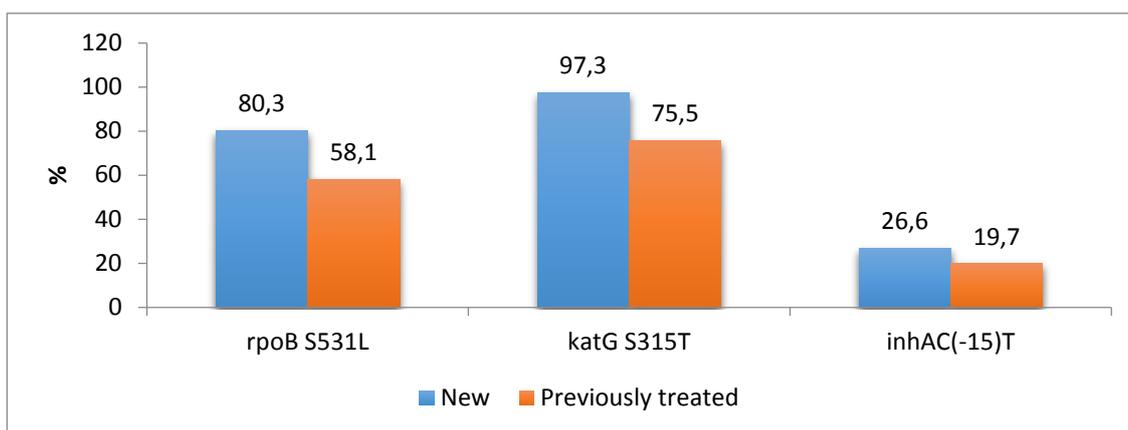
В таблице также показано распределение мутаций между новыми и повторными случаями. Например, мутация S531L в гене *rpoB* встречалась в 1137 (82.3%) случаев у новых больных, а у ранее леченных - в всего в 167 (56.3%) случаев. Мутация S315T в гене *katG*, ответственная за устойчивость к изониазиду, у нелеченных больных встречалась в 1313 (95%) случаев, тогда как у повторных- в 223(75.5%). Остальные мутации (*rpoB*H526Y, *rpoB*H526D, *rpoB*D516V, *inhA*T (-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, соотношении 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 [165, 166, 167].

Мутации, ответственные за формирование устойчивости к противотуберкулезным препаратам, в частности, *rpoB*S531L и *katG*S315G и S315T, были обнаружены в гораздо большей степени у ранее леченных случаев по сравнению с новыми (Рис.5.2.4.1).



Голубым цветом выделены новые случаи, красным-повторные.

Рисунок 5.2.4.1 Соотношение распространения самых частых мутаций между новыми и повторными случаями ТБ.

### Сочетания мутаций в МЛУ-изолятах МТБ

Распределение часто встречающихся мутаций между новыми и повторными случаями ТБ показано в табл.5.2.4.2.

Таблица 5.2.4.2-Частота встречаемости сочетаний мутаций, ответственных за МЛУ ТБ

Сочетания мутаций	Количество (%) изолятов МЛУ-МТБ			P value*
	Все случаи (n = 1374)	Новые случаи (n = 1198)	Повторные случаи (n = 176)	
<i>rpoB</i> S531L + <i>katG</i> S315T	891 (53.1)	734 (61.3)	118 (40)	0.000006
<i>rpoB</i> S531L + <i>inhA</i> C (-15) T	25 (1.5)	24 (2.0)	4 (1.3)	0.4
<i>rpoB</i> S531L + <i>katG</i> S315T + <i>inhA</i> C (-15)T	285 (17.0)	230 (19.2)	34 (11.5)	0.3
<i>rpoB</i> H526Y+ <i>katG</i> S315T	17 (1.0)	7 (0.6)	4 (1.5)	0.5
<i>rpoB</i> H526T + <i>katG</i> S315T + <i>inhA</i> T (-8) C	13 (0.8)	7 (0.6)	4 (1.5)	0.7
<i>rpoB</i> H526D + <i>katG</i> S315T + <i>inhA</i> C (-15) T	17(1.0)	18 (1.5)	3 (0.9)	0.3
<i>rpoB</i> D516V + <i>inhA</i> C (-15) T	34 (2.0)	24 (2.0)	4 (1.5)	0.73
<i>rpoB</i> D516V + <i>katG</i> S315T	92 (5.5)	58 (4.8)	5 (1.9)	0.33

\*В таблицу не включены данные по 304 изолятам, в которых не обнаруживалось мутаций или были единичные

Самыми часто встречающимися сочетаниями мутаций в МЛУ-изолятах МТБ выделенных в Кыргызстане 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 %). Данное сочетание единственное дало статистически значимую разницу, остальные же не выявили статистически значимых различий.

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)  $\geq 100$   $\mu\text{g/ml}$ ). Комбинации мутаций, включающие в себя мутацию S315T гена *katG* составили 97% ( $n=1315$ ) всех сочетаний, включающих изониазид. Данная мутация известна своей ассоциацией с высоким уровнем резистентности к изониазиду (MIC  $\geq 100$   $\mu\text{g/ml}$ ) [168, 169, 170].

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, *rpoB*S531L и *katG*S315T, являются полностью благоприятными для микобактерий туберкулеза. Они не мешают бактериям успешно размножаться и не появляются за счет каких-либо жизненно-важных функций бактериального метаболизма. Такие мутации не исчезнут благодаря тому, что использование антибиотиков будет ограничено или прекращено, но останутся персистировать в популяции даже после того, как использование того или иного препарата прекратилось много лет назад. Это показано во многих клинических исследованиях [171, 172, 173, 174]. Исследования показали, что существует жесткий отбор благоприятных лекарственно-устойчивых мутаций *in vivo* [175, 176].

Компенсация мутаций устойчивости в свете приспособляемости бактерий, а также способность бактерий компенсировать изменения в геноме являются ключевыми параметрами для определения того, останутся ли мутации устойчивости в бактериальной популяции в отсутствие антимикробной терапии. Эксперименты, проведенные на разных моделях, показали, что хромосомные мутации, ответственные за возникновение лекарственной устойчивости, практически всегда связаны со значительными потерями и в отсутствие лекарств адаптируются скорее благодаря возникновению

вспомогательных компенсаторных мутаций, чем реверсии к первоначальному чувствительному генотипу [177].

Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, исследованные в данной работе, обсуждались в целом ряде публикаций [178,179,180,166,167]. Результаты, полученные по частоте встречаемости доминирующих мутаций Ser531Leu в гене *rpoB*, Ser315Thr в гене *katG* и C (-15) T в гене *inhA* были сходны с данными, полученными на больших количествах образцов в разных странах [181,182,183,166,167]. Эти мутации чаще наблюдались среди новых случаев ТБ и выявляется тенденция к их увеличению. Это может связано с тем, что эти мутации являются благоприятными для микобактерии туберкулеза и, возникая, не противоречат основным жизненным функциям бактерии. с другой стороны. подобное распространение может свидетельствовать о продолжающейся трансмиссии подобных штаммов в обществе.

Таким образом, результаты исследования показывают, что распределение мутаций лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* в Кыргызстане сходно с данными, приводимыми в публикациях по иным географическим регионам [184]. Данный факт может иметь важное значение для отбора данных быстрых тестов генотипа для идентификации лекарственно-устойчивых случаев. Быстрая диагностика поможет улучшить ситуацию с лечением пациентов с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза. Использование подобных тестов потребует постоянного наблюдения за местными типами профилей мутаций для того, чтобы при определении принадлежности микобактерий к тому или иному генетическому семейству, правильно их диагностировать как потенциально лекарственно-устойчивые.

Исследование различий между новыми и повторными случаями показало, что все типы самых распространенных мутаций (*rpoBS531LikatGS315T*) 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 Кыргызстане. Небольшой процент исследованных штаммов показал отсутствие сигнала дикого типа наряду с отсутствием сигнала мутации при фенотипической резистентности к рифампицину. Данный факт позволяет предположить существование не описанных ранее мутаций, ответственных за устойчивость к рифампицину, у штаммов МТБ, циркулирующих в Кыргызстане. Требуются дальнейшие исследования, включающие секвенирование генома таких изолятов, которые позволят определить существование единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP, singlenucleotidepolymorphism), благодаря которым возникли мутации, обеспечившие устойчивость к рифампицину.

Молекулярные методы диагностики позволяют также дифференцировать мутации, ответственные за высокую или низкую степень устойчивости к рифампицину и изониазиду [185]. 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.

Рутинное использование теста Хайна позволяет значительно сократить время диагностики туберкулеза, устойчивого к рифампицину и изониазиду, и таким образом ускорить назначение правильного курса лечения для пациентов. Своевременно начатое лечение резко сокращает трансмиссию лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза в социуме и уменьшает его бремя для страны [186]. Это составляет основную ценность теста для использования его в диагностике. Тест *GenoTypeMTBDRplus*, Версия 2.0 - это чувствительный и специфичный метод для обнаружения устойчивости к рифампицину и изониазиду как в мазок-положительных, так и в мазок-отрицательных клинических материалах. Этот тест может быть рекомендован как доступный метод для быстрого молекулярного скрининга большого количества пациентов за короткое время.

## Характеристика мутаций в гене *groB*, вызывающего развитие резистентности к рифампицину

Итак, как видно из табл.5.2.4.3 наибольшее количество мутаций гена *groB* выявлено в пробах дикого типа *groB*WT8 – 181.

Таблица 5.2.4.3. -Характеристика мутаций в гене *groB*, ведущих к развитию резистентности к RIF.

Виды диких проб Виды мутантных проб	<i>groB</i> WT1	<i>groB</i> WT2	<i>groB</i> WT3	<i>groB</i> WT4	<i>groB</i> WT5	<i>groB</i> WT6	<i>groB</i> WT7	<i>groB</i> WT8	Всего мутаций в MUT
<i>groB</i> MUT1	1	1	2	2	-	-	-	-	6
<i>groB</i> MUT2A	-	-	-	-	-	-	9	-	9
<i>groB</i> MUT2B	-	-	-	-	-	-	3	-	3
<i>groB</i> MUT3	-	1	-	-	-	-	3	155	159
Мутации в WT, не сопряженные с MUT	-	12	20	15	2	2	35	26	
Всего мутаций в WT	1	14	22	17	2	2	50	181	

Примечание \*расшифровку аббревиатур см. в тексте

Мутации в данной дикой пробе сопровождались мутациями в *groB*MUT3 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 *groB*WT7, в большинстве -35 образцов - не сопровождались наличием мутаций в *groB*MUT пробах. Также отмечены мутации в диких пробах: в *groB*WT1 -1; *groB*WT2 - 14; *groB*WT3 -22; *groB*WT4 – 17; *groB*WT5 и *groB*WT6 по 2 мутации.

Для выявления устойчивости мутаций применяются мутантные пробы, в которых каждая полоска, которая имеет отличие от полоски дикого типа, указывает на то, что тестируемый штамм имеет устойчивость. В том случае, когда ампликоны не могут связаться с представленными пробами диких типов,

речь идет о мутации. Об устойчивости тестируемого штамма к антибиотикам говорит отсутствие сигнала в представленной пробе дикого типа.

Так в наших исследованиях, определено наибольшее количество изменений нуклеотидной последовательности в пробе мутантного типа *rpoBMUT3* – 159, большая часть которых – 155 случаев - сопряжено, как упоминалось выше, с мутациями дикой пробы *rpoBWT8*. Также выявлены мутации в *rpoBMUT1*, в *rpoBMUT2A* и в *rpoBMUT2B*, по 6, 9 и 3 соответственно.

По данным наших исследований, циркулирующий на территории Кыргызской Республики 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.

#### **Характеристика мутаций в генах *inhA* и *katG*, вызывающих развитие резистентности к изониазиду**

Из 597 анализов были проанализированы 307 проб с различными мутациями гена в зоне *katG* и *inhA* (см. табл.5.2.4.4).

Таблица 5.2.4.4-Характеристика мутаций в гене *katG* и *inhA*, ведущих к развитию резистентности к изониазиду

<b>Всего резистентных к изониазиду штаммов (n=307)</b>	<b>Исследованные кодоны</b>	<b>Мутация</b>	<b>Частота встречаемости n, % (174)</b>
<i>katGWT1</i>	315	-	96 (55%)
<i>katG MUT1</i>	-	S315T1	57 (33%)
<i>katG MUT2</i>	-	S315T2	21 (12%)
	Исследованные положения аминокислот	Мутация	Частота встречаемости n, % (258)
<i>inhA WT1</i>	-15 -16	-	36 (14%)

<i>inhA</i> WT2	-8	-	5 (2%)
<i>inhA</i> MUT1	-	C15T	27 (10%)
<i>inhA</i> MUT2	-	A16G	74 (27%)
<i>inhA</i> MUT3A	-	T8C	92 (36%)
<i>inhA</i> MUT3B	-	T8A	24 (9%)

*\*расшифровку аббревиатур см. в тексте.*

В 290 случаях были выявлены штаммы с сохраненной чувствительностью к изониазиду, что составило 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 чувствительный к антибиотикам. Наибольшее количество мутаций гена *katG* и *inhA* выявлено в пробах дикого типа *katG*WT1 S315T – 96. Мутации в данной дикой пробе сопровождались мутациями в *katG*MUT1 в 57 случаях, с типом мутации S315T1. Для выявления устойчивости мутаций применяются мутантные пробы, в которых каждая полоска, которая имеет отличие от полоски дикого типа, указывает на то, что тестируемый штамм имеет устойчивость. В том случае, когда ампликоны не могут связаться с представленными пробами диких типов, речь идет о мутации. Об устойчивости тестируемого штамма к антибиотикам говорит отсутствие сигнала в представленной пробе дикого типа.

Проведенное исследование показало, что наибольшее количество изменений нуклеотидной последовательности в пробе мутантного типа 21 случаях *katG*MUT2 - S315T2. Мутации в гене *inhA* с исследованными положениями аминокислот в *inhA*WT1 выявлены в 36 случаях и в *inhA*WT2 в 5. Замена C15T в гене *inhA*MUT1 обнаружена в 27 штаммах, *inhA*MUT2 A16G - в 74, *inhA*MUT1 T8C - в 92, *inhA*MUT1 T8A- в 24 случаях. В нашем исследовании спектр мутаций, связанных с устойчивостью к изониазиду (доминирование

одной мутации katGS315T, inhAC15T приблизительно совпадает с рядом публикаций [138,102,139].

### 5.3. Исследование на GeneXpertDxSystem (тест система XpertMTB / RIF)

Данные, представленные в этой главе являются результатом проекта TBReach, Wave II, реализованного согласно Приказа Министерства здравоохранения КР №53 от 07.02.2012 «О внедрении и реализации проекта “Снижение влияния эпидемии туберкулеза в Кыргызстане среди людей, имеющих ограниченный доступ к услугам – внутренние и внешние мигранты». В лабораториях в лечебно-профилактических организаций на различных уровнях оказания медицинской помощи, где были установлены платформы GeneXpertDxSystem, было проведено исследования на тест-системе XpertMTB/RIF, который используется для быстрой диагностики туберкулеза и определения резистентности к рифампицину, как маркера туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью

Как видно из табл.5.3.1, на обследование анализом Xpert®MTB/RIF, в лаборатории были направлены образцы патологического материала у 5839 лиц с подозрением на ТБ из категории «Вновь выявленный случай».

Таблица 5.3.1. - Результаты тестирования XpertMTB/RIF

Результаты тестирования	Вновь выявленный случай ТБ	Ранее леченные случаи ТБ	Всего	
			n	%
ДНК МБТ+ устойчивый к рифампицину	530	384	914	13
ДНК МБТ+ чувствительный к рифампицину	1203	282	1485	20

ДНК МБТ не выявлена	3753	627	4380	61
Устойчивость к RIF не определена	47	7	54	1
Не интерпретируемые результаты (нет результата, не валидные, ошибки)	306	77	383	5
Всего	5839	1377	7216	100

*Примечание: расшифровку аббревиатур см. в тексте*

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.

Как видно из табл.5.3.2, 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 *groV*, 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 *groV* гене, что свидетельствует о чувствительности штамма *M.Tuberculosis* к рифампицину, что составило 62,7% от общего числа положительных результатов теста.

Таблица 5.3.2-Распределение положительных результатов теста XpertMTB/RIF

	Вновь выявленный случай ТБ		Ранее леченые случаи ТБ		Категория неизвестна		Всего	
	п	%	п	%	п	%	п	%
ДНК МБТ+ устойчивый к рифампицину	530	29,8	384	57,1	42	39,6	956	37,3*
ДНК МБТ+ чувствительный к рифампицину	1250	70,2	289	42,9	65	60,4	1604	62,7*
Всего							2560	100

*Примечание: \* От общего количества положительных результатов (2560).*

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 табл.5.3.3 приведена распределение образцов патологического материала и результатов культурального исследования. 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 объясняется, по-видимому тем, что исследования в некоторых случаях проводили из разной образцов мокроты.

Таблица 5.3.3- Результаты культурального исследования

Образец патологического материала	Результаты первичной изоляции			
	МТВС	НТМ	Отр	Контаминация
Мокрота	506	2	3	4
БАЛЖ	13	-	4	-
Мазок из зева	42	1	2	-
Плевральная жидкость	49	-	9	-
СМЖ	12	-	1	-
Гастро-дуоденальное содержимое	3	-	-	1
Биоптат лимфоузла (тонко-игольная биопсия)	28	-	16	2
Перикардальная жидкость	8	-	4	-
Гной	9	3	1	4
Синовиальная жидкость	7	-	2	-
Моча	39	-	-	7
<b>ВСЕГО</b>	<b>716</b>	<b>6</b>	<b>42</b>	<b>18</b>

С целью определения чувствительности и специфичности теста ХpertMTB/RIF был проведен посев на плотные и жидкие среды для первичной изоляции МТВС, результаты которого приведены в табл.5.3.4

Таблица 5.3.4-Сравнительная характеристика теста ХpertMTB/RIF и культурального исследования как «золотого стандарта».

Образец патологического материала	Чувствительность n(%) [95% ДИ]	Специфичность n (%) [95% ДИ]
Легочный образец	561/577 (97,2%) [74,9%–99,9%]	561/574 (97,7%) [78,9%–99,1%]
Внелегочной образец	155/205 (75,6%) [30,5%–91,3%]	155/202 (76,7%) [58,5%–91,1%]
Всего	716/782 (92,3%) [76,9%–98,1%]	716/782 (91,5%) [83,7%–97,8%]

\*Примечание: доверительный интервал 95%

Итак, рассмотрим результаты, полученные при обработке выделенных 782 первичных изолятов. Для образцов легочного материала чувствительность данного метода составила 97,2% (561/577). Специфичность для данного вида образцов была достаточно высока 97,7% (561/574). Для образцов, внелегочной локализации чувствительность составила 75,6%, а специфичность 76,7%. Полученные нами данные разнятся от данных ряда авторов, достигавших в ходе исследований специфичность до 100% [187, 188, 189, 183]. По-видимому, данный факт можно объяснить тем, что правила забора материала не всегда соблюдаются при получении внелегочных образцов (кровь, нарушение стерильности, инородные тела, сроки доставки в лабораторию [190, 191, 192, 142, 143]). Но в целом, полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности 92,3% и специфичности 91,5% теста.

Итак, данные, полученные в ходе внедрения нового, быстрого метода выявления ТБ и определения резистентности к рифампицину в условиях Кыргызской Республики 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. Необходимо отметить, что необходимо повышать требования к сбору патологического материала, который является, как видно из наших данных, немаловажным моментом для получения достоверного и качественного результата. 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.

### 5.3.1.1. Оценка эффективности исследования на XpertMTB/RIF и традиционными методами

В Республиканской референс лаборатории (РРЛ) НЦФ, с использованием теста XpertMTB/RIF, проанализировано 76 образцов патологического материала с отрицательным и положительным результатом микроскопии мазка мокроты. Результаты теста XpertMTB/RIF сравнивали с результатами посева на жидкой среде. Данные представлены в табл.5.3.1.1.

Таблица 5.3.1.1-Сравнительная характеристика теста XpertMTB/RIF и культурального исследования на туберкулез

Результаты исследования		XpertMTB/RIF положительный	XpertMTB/RIF Отрицательный
Мазок отрицательный	Культура положительная*	21	5
	Культура отрицательная	2	16
Мазок положительный	Культура положительная*	32	0
	Культура отрицательная	0	0

\*определена как положительная для комплекса *M.Tuberculosis*

Итак, в 32 образцах мокроты, в которых был выявлен рост *M.Tuberculosis*, выявили 100% чувствительность теста XpertMTB/RIF. В 44 случаях, из мазок отрицательного результата мокроты по микроскопии, чувствительность теста составила 81% (21/26) и специфичность – 89% (16/18).

Полученные нами данные не противоречат результатам исследований ряда авторов [193, 194, 195]. В двух образцах мокроты, которые были мазок отрицательные, но тест XpertMTB/RIF был положительный, роста *M.Tuberculosis* не обнаружено. Повторные исследования не были проведены, так как собрать патологический материал не представилось возможным.

В 5-ти случаях, когда результаты тестов XpertMTB/RIF и прямой микроскопии мазка были отрицательными, на жидкой среде выросли не туберкулезные микобактерии, что было подтверждено результатами иммунохроматографического теста SDBIOLINETBAgMPT 64 Rapid. Общая чувствительность теста составила 91% (53/58). Чувствительность микроскопии мазка мокроты по Цилю-Нильсену у культурально-положительных больных составила 60,3%, что подтверждается рядом публикаций [196, 197].

Таким образом, результаты наших исследований, констатируют высокую чувствительность теста XpertMTB/RIF, что подтверждено результатами культурального исследования, который до сих пор остается «золотым стандартом» в диагностике туберкулеза. 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.

## ГЛАВА VI.

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА СОВРЕМЕННЫХ И ТРАДИЦИОННЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ И ИХ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

Род *Mycobacterium* включает огромное количество видов, список которых продолжает увеличиваться, к 2003 году были охарактеризованы 95 видов [198] (сейчас – более 100). Два из них – *M. tuberculosis* и *M. leprosy* вызывают хорошо известные заболевания. Остальные микобактерии, не входящие в так называемый комплекс микобактерий туберкулеза (*M.tuberculosiscomplex*), широко распространены в окружающей среде, как сапрофиты, но в некоторых случаях могут быть этиологическими факторами тяжелой (вплоть до смертельной) патологии [125, 130, 199]. Их называют микобактериями окружающей среды (*environmentalmicobacteria*), возбудителями микобактериозов, анонимными, оппортунистическими, атипичными микобактериями (последний, широко применявшийся многие годы термин, ввел М. Pinner, 1935) [160]. Однако, в настоящее время принят термин нетуберкулезные микобактерии (НТМ) [161, 162], который был признан наиболее приемлемым Американским торокальным обществом [163]. Наиболее характерным их отличием от *M.tuberculosis* комплекса является то, что они практически не передаются от человека к человеку [164].

Эти микобактерии, как уже было отмечено, широко (относительно) распространены в окружающей среде (в почве и воде) [200, 201]. Их обнаруживают повсеместно: в естественных водоемах, водопроводной воде и т.д., вплоть до хирургических растворов [202, 203, 204, 205,206,207,208].

Н. Tomioka (1998) классифицировал микобактерии на основании анализа их биологических, биохимических, генетических (в том числе последовательности 16S рибосомальной ДНК) свойств [209]:

- *M. tuberculosis* комплекс (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*).
- Медленнорастущие, включая фотохромогенные – (I группа Runyon) –*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. intermedium*, *M. asiaticum*; скотохромогенные (II группа Runyon) –*M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. injectum*, *M. lentiflavum*, *M. gordonae* и нефотохромогенные (III группа Runyon) - *M. avium*, *M. intracellulareae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. genavense*, *M. celatum*, *M. gastri*.
- Быстрорастущие– (IV группа Runyon) –*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. phlei*, *M. smegmatis*.

Достаточно сложной задачей, стоящей перед исследователями, является поиск геномной мишени, при молекулярно-генетическом анализе которой будет возможна идентификация вида НТМ. Выбор мишени осложняется большим сродством геномов различных представителей рода *Mycobacterium*. В настоящее время, для этой цели используются инсерционные последовательности (IS900, IS901, IS1245, IS1561, IS2404), структурные гены (*rpoB*, *gyrB*, *hsp65*, *secA1*, *recA*, *sodA*, ген *16SrRNA*, область ITS гена *16SrRNA*) микобактериальной ДНК [210-216].

Процесс видовой идентификации для более точной таксономической классификации микобактерий основан как на классических методах определения вида (культуральные и биохимические тесты), так и современных высокотехнологичных методах, которые включают в себя различные варианты хроматографии (в первую очередь ВЭЖХ) и молекулярно-генетические методики (ПЦР-рестрикционный и ПЦР-гибридизационный анализ, секвенирование).

Недостатком культуральных и биохимических тестов видовой идентификации, помимо длительности исследования, которое может занимать до нескольких месяцев, является субъективная оценка исследователем

результатов этих тестов, вследствие чего возможны ошибки в определении вида. Эти методы могут служить лишь дополнением к современным хроматографическим и молекулярно-генетическим технологиям, успешно применяемым для идентификации, установления новых видов НТМ и филогенетических исследований в области таксономии рода *Mycobacterium*.

Необходимо подчеркнуть, что рост выявления микобактериозов связан (помимо увеличения количества «чувствительных-иммунокомпрометированных» лиц, в частности ВИЧ-инфицированных) с использованием новых, более чувствительных методов выделения и идентификации возбудителя.

Для определения чувствительности НТМ к ПТП (и другим препаратам) используют в основном те же методы, что и для соответствующих «манипуляций» с микобактериями туберкулеза. Наибольшее число работ посвящено изучению устойчивости *MAC*, *M. kansasii*, *M. marinum* (а также *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. abscessus/M. chelonae*). Лекарственную чувствительность медленно растущих НТМ определяют на плотных (яичных и агаровых), а также жидких средах [217-230].

Таким образом, нетуберкулезные микобактерии (НТМ) широко распространены в окружающей среде, однако они далеко не всегда могут быть этиологическими факторами патологии у человека и животных. Эти микобактерии не входят в так называемый комплекс микобактерий туберкулеза (*M. Tuberculosis complex*), два члена которого (*M. tuberculosis* и *M. leprosy*) вызывают хорошо известную патологию у человека, а один (*M. bovis*) у животных.

Следует особо подчеркнуть, что для определения вида НТМ и оценки его лекарственной устойчивости сегодня может применяться большой набор клинических, микробиологических, а также современных методов, таких как ВЭЖХ и молекулярно-генетические тесты [231, 232].

## 6.1. Сравнительная характеристика различных методов диагностики нетуберкулезных микобактерий

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): *MAC* – 17 культур, *M.kansasii* – 8 культур, *M.xenopi* – 6 культур, *M.fortuitum* – 10 культур. а 186 культур (82,3%) отнесено *M.Tuberculosiscomplex* (МТС).

Сравнительные данные о результатах посевов клинического материала на три различные питательные среды представлены в табл. 6.1.1

Таблица 6.1.1 - Частота выделения микобактерий на разных питательных средах

Вид микобактерий	Число (%) микобактерий, выделенных на среде:		
	Левенштейна-Йенсена	Миддлбрука 7Н9 (ВАСТЕСМГИТ 960)	Миддлбрука 7Н11
НТМ (41):	24 (58,5)	35 (85,4)	33 (80,5)
<i>MAC</i> (17)	8	14	13
<i>M.kansasii</i> (8)	5	7	6
<i>M.xenopi</i> (6)	4	5	5
<i>M.fortuitum</i> (10)	7	9	9
<i>M.tuberculosis</i> (186)	85 (45,7)	169 (90,9)	159 (85,5)
<b>ИТОГО (227)</b>	<b>109 (48,0)</b>	<b>204 (89,9)</b>	<b>192 (84,6)</b>

Как видно из таблицы 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 (Таблица 6.1.2; 6.1.3).

Таблица 6.1.2 - Частота выделения микобактерий на разных питательных средах и их комбинациях (абс. /%)

Среда	Число (%) выделенных микобактерий						
	<i>M.tuberculosis</i>	<i>MAC</i>	<i>M.kansasii</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.xenopi</i>	Всего НТМ	Всего
Л-Й	3(1,6)	1	-	-	-	1(2,4)	4
Миддлбрук 7Н9	17 (9,2)	2	1	1	-	4(9,7)	21
Миддлбрук 7Н11	10 (5,4)	1	1	-	-	2(4,9)	12
Л-Й + 7Н9	7 (3,8)	1	1	-	1	3(7,3)	7
Л-Й + 7Н11	4 (2,2)	1	-	1	1	3(7,3)	7
7Н9 + 7Н11	74(39,8)	6	1	2	1	10(24,4)	84
На всех средах	71(38,2)	5	4	6	3	18(43,9)	89
<b>ИТОГО</b>	<b>186</b>	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>41</b>	<b>227</b>

Таблица 6.1.3 - Частота выделения микобактерий на разных питательных средах (отдельно, в двойных и тройных комбинациях, абс)

Среды и их сочетания	Вид микобактерий						
	<i>M.tuberculosis</i>	<i>MAC</i>	<i>M.kansasii</i>	<i>M.fortuitum</i>	<i>M.xenopi</i>	Всего НТМ	ВСЕГО
Левенштейна-Йенсена	3(1,6)	1	-	-	-	1	4
Двойное сочетание сред	11(6,0)	2	1	1	2	6	18
На трех средах	71(38,2)	5	4	6	3	18	88
<b>Всего</b>	<b>85(45,8)</b>	<b>8(47,0)</b>	<b>5(62,5)</b>	<b>7(70,0)</b>	<b>5(83,3)</b>	<b>25(61,0)</b>	<b>110(48,5)</b>
Миддлбрук 7Н9	17(9,2)	2	1	1	-	4	21
Двойное сочетание сред	81(43,6)	7	2	2	2	13	94
На трех средах	71(38,2)	5	4	6	3	18	89
<b>Всего</b>	<b>169(91,0)</b>	<b>14(82,3)</b>	<b>7(87,5)</b>	<b>9(90)</b>	<b>5(83,3)</b>	<b>35(85,4)</b>	<b>204(89,9)</b>
Миддлбрук 7Н11	10(5,4)	1	1	-	-	2	12
Двойное сочетание сред	78(42,0)	7	1	3	2	13	91
На трех средах	71(38,2)	5	4	6	3	18	89
<b>Всего</b>	<b>159(85,6)</b>	<b>13(76,5)</b>	<b>6(75,0)</b>	<b>9(90,0)</b>	<b>5(83,3)</b>	<b>33(80,5)</b>	<b>192(84,6)</b>
<b>Итого</b>	<b>186</b>	<b>17</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>41</b>	<b>227</b>

В табл.6.1.4 приведены данные о средних сроках обнаружения роста микобактерий в системе ВАСТЕСМГИТ 960 и на плотных питательных средах Миддлбрука 7Н11 и Л-Й.

Таблица 6.1.4. - Сроки (дни) выделения микобактерий на разных питательных средах

Вид микобактерий	Питательная среда		
	Левенштейна-Йенсена	Миддлбрука 7Н9 (ВАСТЕС MGIT 960)	Миддлбрука 7Н11
<i>M.tuberculosis complex</i>	27,2(20-36)	13,0(5-22)	22,1(10-31)

Как видно из табл. 6.1.4, обнаружение роста в системе ВАСТЕСMGIT 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, какое требуется для выделения микобактерий на плотных питательных средах.

Контаминация среды Л-Й 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.

Необходимо указать, что увеличение частоты выделения культур микобактерий на 20% и выше происходит при применении системы ВАСТЕСMGIT 960 в сравнении с обычными плотными средами (в частности Л-Й). Если в плотных средах средний период определения роста -3-5 недель, то при использовании системы ВАСТЕСMGIT – от 8 до 14 дней. В данном случае, высокоэффективность ВАСТЕСMGIT определяется жидкой средой,

превосходящей сроками детекции и частотой выявления микобактерий в отличие от плотной среды. Специальная литература содержит описание микобактерий, растущих только в жидкой среде [233]. Но этот метод имеет и свои недостатки. Так, в жидкой среде наблюдать за морфологией и хромогенностью колоний практически не возможно. При этом, их подверженность контаминации позволяет скрыть рост микобактерий.

Вместе с тем, благодаря простому химическому составу агаровая среда Миддлбрук 7Н11 меньше подвержена контаминации, а имеющийся в составе ее гидролизата казеина обеспечивает рост штаммов, которые подвержены 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. Недостатком применения агаровой среды 7Н11 в условиях централизованных микробиологических лабораторий с большим потоком исследований является неудобство, связанное с инкубированием и просмотром очень большого количества чашек.

Исходя из этого, целесообразно использование данной среды лишь после выделения микобактерий на плотной яичной или жидкой питательных средах для первичной идентификации (обнаружение контаминации, разделение нескольких видов микобактерий, изучение культурально-морфологических свойств выделенных культур)[234].

Вместе с тем при наличии в лаборатории ВЭЖХ и/или молекулярно-генетических методов исследования применение полного спектра культурально-биохимических методов идентификации для всех выделенных культур микобактерий нецелесообразно, но в то же время при невозможности установления вида этими методами, проведение необходимого минимума биохимических тестов остается актуальным.

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.tuberculosiscomplex* отнесено 11139 (94,8%) культур и 609 – к НТМ, что составило 5,2%(табл.6.1.5).

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.tuberculosiscomplex* и НТМ[235]. Идентификация нетуберкулезных микобактерий по способности расти при различных биохимических свойствах и температурах: способность к восстановлению нитратов, теллурита калия, гидролиз твина-80, амидазная, арилсульфатазная, каталазная активность, и др.

Таблица 6.1.5-Частота обнаружения микобактерий микробиологическими методами в разные годы.

ГОДЫ	Количество посевов	Частота обнаружения					
		МБТ		НТМ		Всего МБ	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
2009	38263	3366	97,1	102	2,9	3468	9,1
2010	41025	3239	96,7	111	3,3	3350	8,2
2011	44016	3436	93,1	253	6,9	3689	8,4
2012(6 месяцев)	22462	1707	92,3	143	7,7	1850	8,2
<b>ВСЕГО</b>	<b>145766</b>	<b>11748</b>	<b>95,1</b>	<b>609</b>	<b>5,0</b>	<b>12357</b>	<b>8,5</b>

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 - 2 53 (6,9%); за шесть месяцев 2012 г. – всего 1850 (8,2%) – МБТ – 1707 (92,3%) НТМ – 143 (7,7%)). Вместе с тем,

количество выделенных НТМ, начиная с 2010 года существенно 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.

Также, не все выделенные в лаборатории культуры НТМ идентифицировали до вида, часть культур, полученных на жидких питательных средах, после дифференциации от микобактерий туберкулезного комплекса (без определения вида), при подсчете не учитывали.

В этот период для идентификации НТМ применяли только традиционные микробиологические методы. Начиная с 2010 года стали проводить идентификацию НТМ, полученных также с жидких питательных сред, с этого периода широко использовались и молекулярно-генетические (ПДРФ, биочипы) методы и ВЭЖХ, что позволило ускорить процесс идентификации микобактерий и повысить его специфичность. Необходимо подчеркнуть, что благодаря этим данным, отдельным категориям больных вместо туберкулеза был поставлен диагноз микобактериоза и назначено лечение.

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[236-239] (табл.6.1.6.)

Таблица 6.1.6- Частота обнаружения НТМ при обследовании больных туберкулезом и лиц с «подозрением на туберкулез»

Группы НТМ	Отдельные виды НТМ	Количество (абс)	%
Медленнорастущие НТМ	<i>M.gastri</i>	2	0,5
	<i>M.gordonae</i>	12	2,9
	<i>M.kansasii</i>	61	14,6
	<i>M.marinum</i>	4	1,0
	MAC	136	32,5
	<i>M.simiae</i>	4	1,0
	<i>M.szulgai</i>	2	0,5
	<i>M.terrae complex</i>	2	0,5
	<i>M.xenopi</i>	59	14,1
<b>ВСЕГО</b>		<b>282</b>	<b>67,6</b>
Быстрорастущие НТМ	<i>M.abscessus/M.chelonae complex</i>	26	6,2
	<i>M.flavescens</i>	8	1,9
	<i>M.fortuitum</i>	96	23,0
	<i>M.phlei</i>	1	0,2
	<i>M.smegmatis</i>	5	1,2
<b>ВСЕГО</b>		<b>136</b>	<b>32,5</b>
<b>ИТОГО</b>		<b>418</b>	<b>100,0</b>

Как видно из таблицы, две трети выделенных НТМ относились к медленнорастущим (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%. Самым распространенным видом является *M. aviumcomplex*. С этим согласуется известное (по данным зарубежных авторов) значение MAC в патологии человека. Вторыми по частоте выделения

были *M. Fortuitum* [240]. Однако, как однократное, так и многократное выделение быстрорастущих микобактерий требует особенно тщательного изучения клиники заболевания с целью оценки этиологической значимости этих микроорганизмов (заболевание, колонизация или контаминация).

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.

Так 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).

Таким образом, посеvy на среду Миддлбука 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 7H11 также позволяет получать культуры микобактерий в случаях обильного роста контаминантов, обнаруживать смешанные культуры и изучать их морфологию.

По данным настоящей работы две трети выделенных культур микобактерий относились к медленно растущим НТМ (по классификации Раньона), среди них основными были *MAC*, *M. kansasii* и *M. xenopi*, а среди быстрорастущих *M. Fortuitum*[240].

## **6.2. Идентификация нетуберкулезных микобактерий молекулярно-генетическими методами**

В настоящей работе были использованы две модификации молекулярно-генетических методов: один, разработанный в МНПЦБТ – определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена *hsp65*; другой, разработанный в институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (совместно с МНПЦБТ) – биологические микрочипы.

На основе метода определения полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена *hsp65* для идентификации видов нетуберкулезных микобактерий и дифференциации их от *M.tuberculosiscomplex* 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.Scrofulaceumi* дифференциации этих видов от *M.Tuberculosiscomplex* в течение 24 часов, но при этом с её помощью возможно

определение вида и некоторых других представителей рода *Mycobacterium* (см. рис 6.2.1) [234].

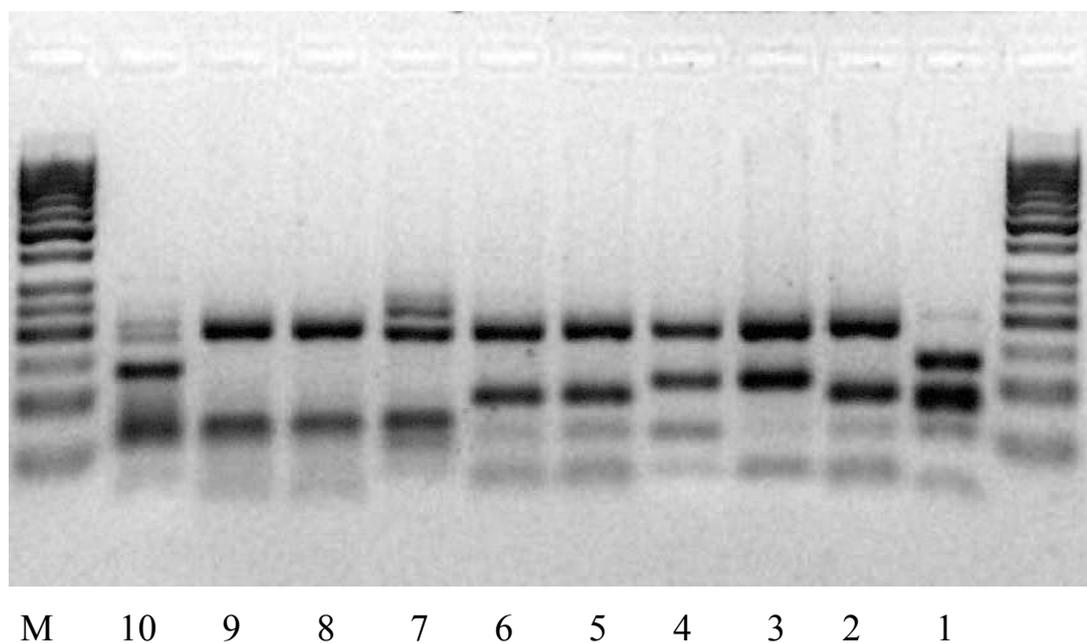


Рис.6.2.1 Идентификация микобактерий тест-системой «MAIS-диф».

М – маркер молекулярного веса; 1 – *M.tuberculosis* complex; 2 – *M.avium*; 3 – *M.intracellulare*; 4 – *M.intracellulare*; 5 – *M.avium*; 6 – *M.avium*; 7 – *M.xenopi*; 8 – *M.xenopi*; 9 – *M.xenopi*; 10 – *M.kansasii*.

С использованием тест-системы «MAIS-диф» были исследованы 319 культур кислотоустойчивых микобактерий, выделенных на плотных питательных средах Левенштейна-Йенсена и Middlebrook 7H11 в Централизованной бактериологической лаборатории (ЦБЛ) МНПЦБТ. Результаты видовой идентификации микобактерий с помощью этой тест-системы в сравнении с данными микробиологических исследований представлены в табл. 6.2.1. Исходя из полученных данных видно, что в целом распределение по частотам выявления совпадает для обоих методов исследования, по крайней мере, для клинически значимых видов микобактерий. Наиболее часто выделяли культуры *MAC*, *M. fortuitum*/*M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. xenopi*/*M. gordoniae* и *M. tuberculosis* complex. Представленный в табл. 54 вид нетуберкулёзных микобактерий – *M. marinum* встречался редко.

Таблица 6.2.1-Видовая идентификация микобактерий с помощью тест-системы «MAIS-диф» в сравнении с микробиологическими методами

№	Вид микобактерий		Микробиологическая идентификация	ПДРФ гена <i>hsp65</i> (тест-система MAIS-диф)
1.	<i>MAC</i>	<i>M.avium</i>	94 (29, 47%)	96 (30, 09%)
		<i>M.intracellulare</i>		7 (2, 19%)
				Всего 103 (32,28%)
2.	<i>M.fortuitum/M.chelonae</i>	<i>M.fortuitum</i>	66 (20, 69%)	69 (21, 63%)
		<i>M.chelonae</i>	8 (2, 51%)	
3.	<i>M.kansasii</i>		50 (15, 67%)	54 (16, 93%)
4.	<i>M.xenopi/M.gordoniae</i>	<i>M.xenopi</i>	44 (13, 79%)	48 (15, 05%)
		<i>M.gordoniae</i>	10 (3, 13%)	
5.	<i>M.tuberculosis complex</i>		42 (13, 17%)	42 (13, 17%)
6.	<i>M.marinum</i>		5 (1, 57%)	3 (0, 94%)
<i>Итого:</i>			319 (100%)	319 (100%)

При сравнении полученных результатов идентификации с помощью классических микробиологических методов и тест-системы «MAIS-диф» были получены следующие данные (см. табл. 6.2.2).

Таблица 6.2.2-Сравнение результатов видовой идентификации культур микобактерий методом ПДРФ гена *hsp65* (тест-система MAIS-диф) и микробиологической идентификации

Варианты сравнения	Абсолютные числа	%
Совпадения	291	91,22%
Несовпадения	28	8,78%
ВСЕГО	319	

Полученный процент совпадений (91,22%) отражает специфичность этого способа идентификации микобактерий и совпадает со специфичностью, заявленной авторами тест-системы «MAIS-диф» [234], причем при значительно большем количестве исследованного материала в данной работе.

Основными причинами несовпадений результатов идентификации, в первую очередь являются сложности определения вида в смешанных культурах (возможность дифференциации между ними).

Ранее было показано, что при идентификации музейных референс-штаммов проблема идентификации смешанных культур перед исследователями не стояла, эта проблема стала актуальной при исследовании культур, выделенных из биологического материала. Причем, интересно отметить, что несовпадения при анализе смешанных культур распределяются поровну между классическими методами и тест-системой «MAIS-диф», то есть каждый из методов может не выявлять в смешанной культуре еще один вид или при анализе различных по культурально-морфологическим свойствам колоний, полученных после посева исходной культуры по результатам идентификации будет превалировать (доминировать) только один вид микобактерий. На данный момент проблема идентификации смешанных культур требует дальнейших исследований.

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. goodii*, *M. marinum*, *M. fortuitum* – по данным литературы и исследований, выполненных в МНПЦБТ, наиболее часто определяемых в диагностическом материале видов микобактерий. На рисунке 6.2.2 представлена специфичная картина гибридизации на биочипе «IMS-7».



*a*

*б*

Рис. 6.2.2 Картина гибридизации на биологическом микрочипе «IMS-7»

*a* – картина гибридизации характерная для *M. Intracellulare*

*б* – картина гибридизации характерная для *M. Kansasii*

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. Данные, полученные после проведения видовой идентификации классическими микробиологическими методами (культуральные и биохимические тесты) и с помощью биочипов «IMS-7» представлены в табл. 6.2.3.

Приведенные в таблице данные подчеркивают возможность применения для видовой идентификации технологии биологических микрочипов микобактерий.

Таблица 6.2.3 Видовая идентификация микобактерий с помощью экспериментальной версии микрочипов «IMS-7» и микробиологическими методами

№ п/п	Вид микобактерий		Микробиологическая идентификация	«IMS-7»
1.	MAC	<i>M. avium</i>	64(35,56%)	51(28,33%)
		<i>M. intracellulare</i>		3(1,67%)
2.	<i>M. tuberculosis</i>		22(12, 22%)	23(12, 78%)
3.	<i>M. bovis</i>		-	1(0, 56%)
4.	<i>M. bovis BCG</i>		1(0, 56%)	1(0, 56%)
5.	<i>M. xenopi</i> <sup>1</sup>		32(17, 78%)	-
6.	<i>M. kansasii</i>		20(11, 11%)	15(8, 33%)
7.	<i>M. fortuitum</i>		18(10, 00%)	16(8, 89%)
8.	<i>M. gordonae</i>		15(8, 33%)	10(5, 56%)
9.	<i>M. flavescens</i> <sup>1</sup>		4(2, 22%)	-
10.	<i>M. scrofulaceum</i>		3(1, 67%)	1(0, 56%)
11.	<i>M. chelonae</i>		1(0, 56%)	1(0, 56%)
12.	<i>M. marinum</i>		-	3(1, 67%)
13.	Вид определить не удалось		-	55(30, 56%)
Итого:			180(100%)	180(100%)

Примечание <sup>1</sup>- культуры *M. xenopi* и *M. flavescens* использовали в качестве отрицательного контроля для экспериментальной версии микрочипов «IMS-7».

В таблице 6.2.4 приведены данные сопоставления совпадений результатов идентификации культур, полученных изолятов микобактерий с помощью экспериментальной версии биологических микрочипов «IMS-7» и традиционных методов микробиологической идентификации (микробиологическим и биочипов).

Таблица 6.2.4- Сравнение результатов видовой идентификации культур микобактерий с помощью экспериментальной версии биологических микрочипов «IMS-7» и микробиологической идентификации

Варианты сравнения	Абсолютные числа	%
Совпадения	157	87,22%
Несовпадения	23	12,78%
Всего,	180	

Ранее было показано, что при анализе 28 культур кислотоустойчивых микобактерий (21 референс- и 7 штаммов, выделенных из биологического материала) совпадение результатов идентификации этими методами было получено для 91,3% культур [2]. Исходя, из представленных 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.

Также в группе микобактерий, вид которых определить не удалось, были 10 культур, идентифицированных классическими методами как *M.A.C.* (таблица 6.2.5). Так 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, вследствие чего 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.

Таблица 6.2.5-Результаты идентификации микобактерий, полученные после проведения секвенирования

№ п/п	Микробиологическая идентификация	Биочип «IMS-7»	Секвенирование
1.	MAC-10	отриц- 10	<i>M. avium spp-7</i> <i>M. asiaticum-3</i>
2.	отриц-3	<i>M. marinum-3</i>	<i>M. intracellulare-3</i>
3.	<i>M. scrofulaceum-1</i>	<i>M. gordonae-1</i>	<i>M. gordonae-1</i>

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 МНПЦБТ молекулярно-генетические методы показали высокую информативность при идентификации нетуберкулезных микобактерий. Был определен большой процент совпадений их результатов с данными, полученными микробиологическими методами. Важно отметить, что перспективным является использование биологических микрочипов, поскольку этот метод является стандартным и автоматизированным, однако необходимо увеличить спектр НТМ, 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.).

## ГЛАВА VII.

### ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ТУБЕРКУЛЕЗОМ.

#### 7.1. Оценка противотуберкулезных программ и их влияние на заболеваемость

Эпидемиологический надзор за туберкулезом в Кыргызской Республике в конце XX века регламентировался Приказом МЗ СССР № 527 от 05.07.1988 г. «О совершенствовании противотуберкулезной помощи в стране» [241].

Предпосылкой разработки и внедрения данного приказа явилась тенденция к уменьшению темпов снижения показателей заболеваемости. Наиболее высокий уровень заболеваемости туберкулезом отмечался в республиках Средней Азии, Казахстане, Азербайджанской и Молдавской ССР, где показатели заболеваемости превышали в два раза союзный. В Казахстане показатели заболеваемости регистрировались в диапазоне 78,7 - 114,1, в Кыргызстане - от 49,9 – 61,8, в Таджикистане - 54,5-95,8, в Узбекистан – 48,1-80,1 и Туркмении - 48,8-76,3 на 100 тысяч населения. В данном приказе основное внимание было направлено: на раннюю диагностику туберкулеза – массовое флюорографическое обследование различных групп населения, организацию туберкулинодиагностики, вакцинопрофилактику и диспансеризацию туберкулезных больных в зависимости от клинического течения. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в республиках Средней Азии и Казахстана после внедрения 527приказа с небольшим снижением уровня заболеваемости сохраняла стабильную тенденцию. Показатели заболеваемости варьировали от 49,1 в 1989 до 58,7 на 100 тысяч населения в 1994 году в нашей республике, а в Казахстане, Узбекистане, Таджикистане и Туркмении в пределах 61,7-80,5; 43,8-53,3; 38,9-51,1 и 54,1-70,2 соответственно рисунок 7.1.1.

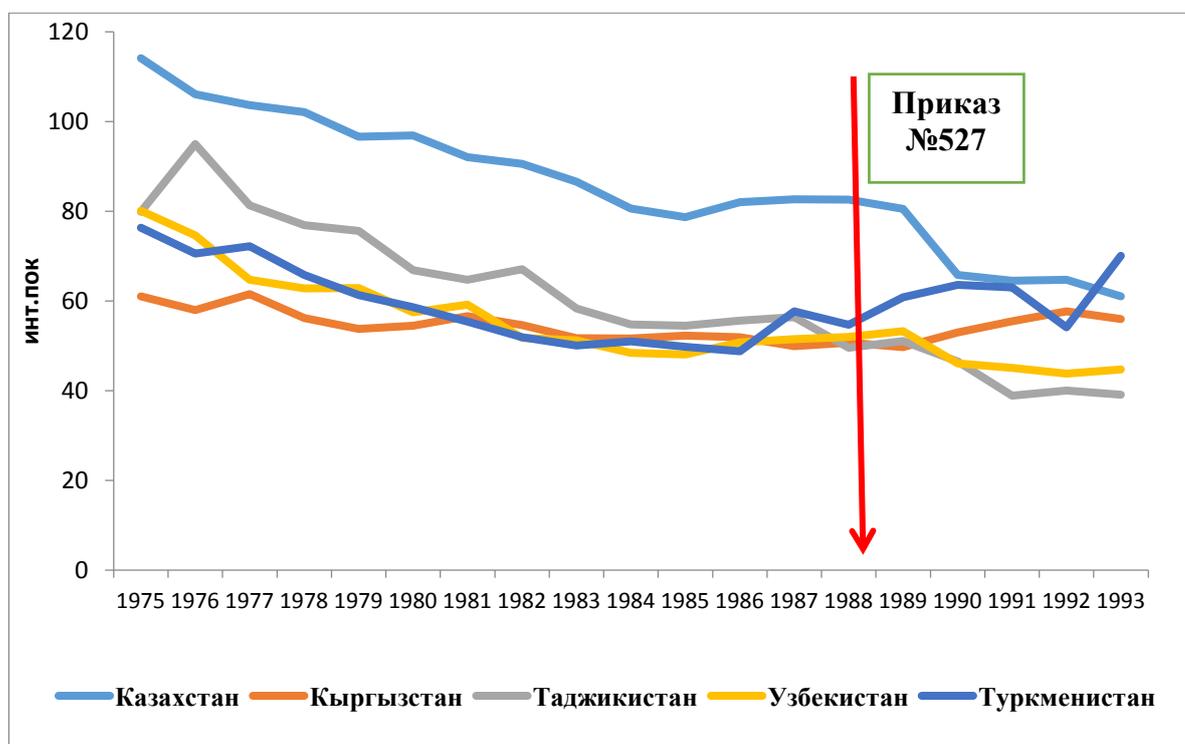


Рис 7.1.1. Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом населения республик Средней Азии и Казахстана.

Сложившиеся в середине 90-х годов неблагоприятные социально экономические условия обусловили ухудшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу в Кыргызской Республике. Начиная с 1995 года, наблюдается выраженная тенденция роста уровня заболеваемости туберкулезом. К концу XX века показатель заболеваемости вырос в 2 раза, составив 114,4 на 100 тысяч населения в 1999 году.

В связи со сложившейся неблагополучной ситуацией по туберкулезу в республике были приняты ряд безотлагательных мер по стабилизации распространения туберкулезной инфекции среди населения. Были разработаны и приняты: Приказ МЗ КР № 285 от 30.08.2000 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию противотуберкулезной помощи населению Кыргызской Республики» [242], где сроки и контингенты для флюорографического обследования остались прежними, но наблюдение за всеми контингентами рентгеноположительных лиц было передано участковой сети поликлиник. В

постановке туберкулиновых проб были определены критерии, по которым проводилась диагностика. Профилактическое обследование детей на туберкулез проводилось на территориях с показателем заболеваемости выше 150 на 100 тысяч населения, среди контактных и в семейных очагах. Данным приказом был рекомендован простой, доступный и экономичный метод бактериологической диагностики туберкулеза.

Были разработаны и внедрены национальные программы «Туберкулез - 1,2,3» [243,244,245], при содействии ВОЗ начато внедрение стратегии ДОТЦ. В 2004 году в рамках реализации гранта Глобального фонда для борьбы 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 2006 году была принята Национальная программа «Туберкулез -III» на 2005-2010. В 2007 году разработана «Концепция развития противотуберкулезной службы в КУР на 2008-2016 гг.»; Национальная программа «Туберкулез-IV» на 2012-2016 годы[246,247].

В результате принятых мер и внедрения международных рекомендаций по борьбе с туберкулезом была улучшена инфраструктура, кадровые ресурсы и нормативная база, повысилось качество диагностики и лечения больных туберкулезом, уменьшился резервуар туберкулезной инфекции, снизились уровни заболеваемости и смертности от туберкулеза среди населения. Так, показатель заболеваемости туберкулезом с 192,4 на 100 тысяч, в 2000 году был снижен до 101,1 на 100 тысяч к 2015 г., показатель распространенности с 363,8 в 2000 году снижен до 179,8 в 2015 году, показатель смертности с 13,8 в 2000 году снижен до 6,1 на 100 тысяч населения в 2015г. Рисунок 6.1.

В последующем были разработаны и внедрены: Приказ МЗ КР № 670 от 27.11.2013 года «О мерах по совершенствованию противотуберкулезной помощи населению Кыргызской Республики», выделяется раздел эпидемиологического надзора за туберкулезом и расписываются

противоэпидемические мероприятия в очаге, а также рекомендуется использование автоматизированной системы диагностики туберкулеза, основанной на методе полимеразной цепной реакции, что позволяет выявить ДНК возбудителя в мокроте и определить устойчивость к рифампицину в течение двух часов [248].

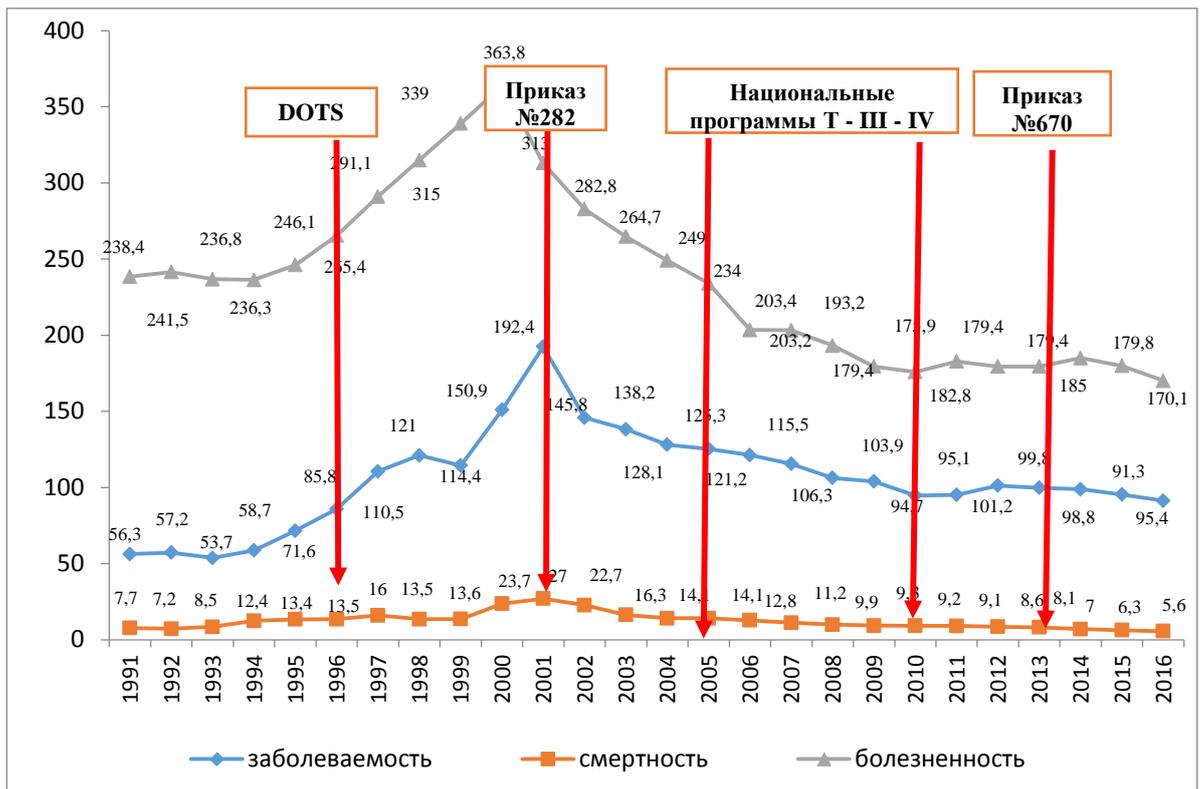


Рис.7.1.2. Многолетняя динамика заболеваемости, распространенности и смертности от туберкулеза в КР за период 1994-2016гг.

Кыргызская Республика одна из первых стран Содружества Независимых Государств приступила к реализации стратегии ДОТЦ в рамках Национальной противотуберкулезной программы, что способствовало появлению тенденции к стабилизации и снижению показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза среди населения, что безусловно, привело к уменьшению распространения туберкулезной инфекции в стране. В результате проводимых противоэпидемических и профилактических мероприятий, регламентируемых директивными документами, наблюдается снижение показателей смертности,

заболеваемости и распространенности туберкулеза. Средние многолетние данные смертности, заболеваемости и распространенности туберкулеза за 10 лет (1996-2005гг.) действия противотуберкулезных программ составили 13,0; 131,2 и 291,7 соответственно. В последующие 10 лет (2006-2015гг.) эти показатели были снижены на 36,2%, 26,5% и 36,7% составив 8,3, 103,7 и 184,7 соответственно. Эти данные свидетельствуют об эффективности проводимых противотуберкулезных программ в республике. 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 лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого ТБ за счет обеспечения всеобщего доступа к услугам по профилактике, диагностике и лечению ТБ и М/ШЛУ-ТБ во всех государствах-членах Европейского региона ВОЗ. 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 к возрастанию числа случаев туберкулеза с МЛУ-ТБ и ко-инфекции 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 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 расписаны методики и алгоритмы выявления ЛУ-ТБ, принципы и схемы лечения больных. Методическое руководство «Инфекционный контроль туберкулеза в организациях здравоохранения Кыргызской Республики» 2013г., в котором

расписана система организационных, противоэпидемических и профилактических мероприятий, направленных на предупреждение внутрибольничного распространения туберкулеза среди пациентов и персонала[249].

По оценке специалистов, 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. В приказе МЗ КР № 670 нет четкой дифференциации между вновь выявленным случаем и рецидивом с описанием мероприятий в каждом случае. Межсекторальная и межведомственная интеграция развита слабо, нет обратной связи между службами здравоохранения и ветеринарной. Для выявления и лечения каждого больного туберкулезом создана трехступенчатая (национальная, областная, районная) координирующая система мониторинга, которая является связующим звеном между противотуберкулезной и первичной медико-санитарной службой. В каждой области работают центры мониторинга где осуществляется регистрация впервые выявленных больных туберкулезом и контроль выполнения DOTS стратегии.

Как видно из рисунка 7.1.3. информация о заболеваемости поступает снизу-вверх и на всех уровнях наблюдается обратная связь, которая обеспечивает контроль учета выявленных больных и мониторинг лечебных и противоэпидемических мероприятий. К качественным атрибутам эпидемиологического надзора относятся ее простота, гибкость и приемлемость. В существующей системе эпидемиологического надзора по мнению специалистов простота не отработана, нет четкости в определении случая и поэтому один и тот же больной по АИС может быть зарегистрирован несколько

раз в течении какого-то периода времени, что создает определенные трудности. Гибкость системы эпидемиологического надзора также слаба и ее качество зависит от уровня организации работы. Республиканский уровень более гибок по сравнению с областными и районными уровнями.

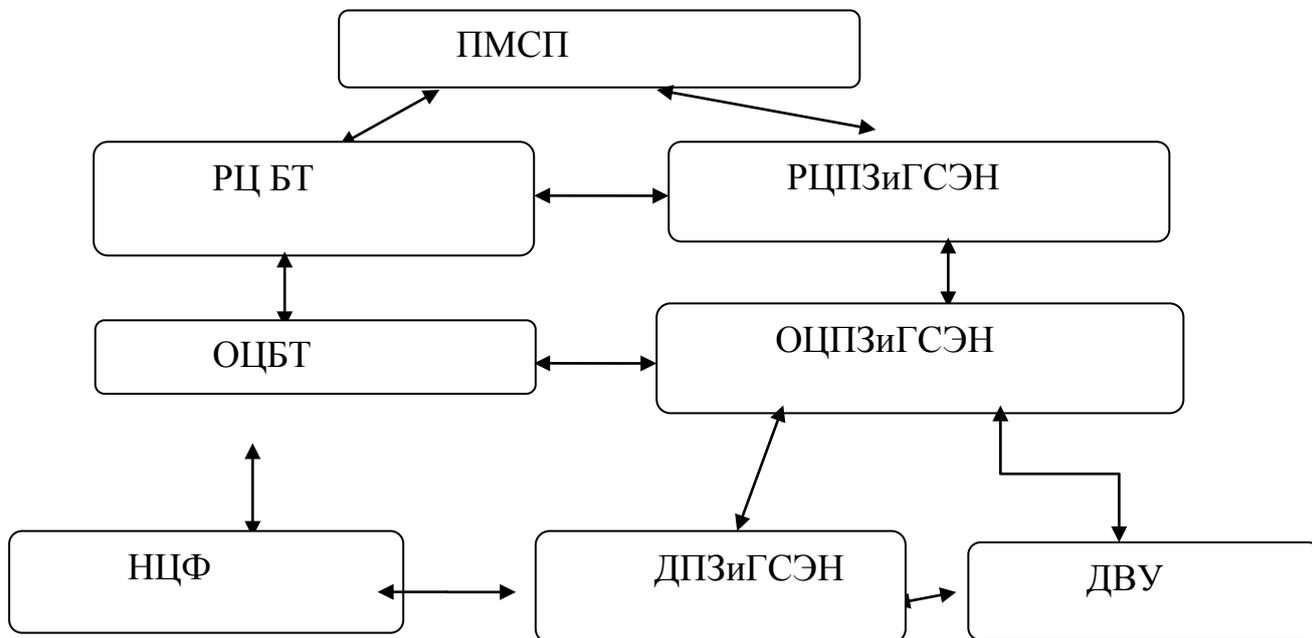


Рис. 7.1.3 Алгоритм выявления и учета больных туберкулезом.

Приемлемость эпидемиологического надзора за туберкулезом существует так как все уровни своевременно предоставляют информацию о заболеваемости. В то же время специалисты отмечают о недостаточной обратной связи между секторами здравоохранения.

Количественные атрибуты эпидемиологического надзора включают ее чувствительность, специфичность, положительное прогностическое значение, репрезентативность и своевременность.

Репрезентативность данных заболеваемости и распространенности туберкулеза среди населения определяется полнотой учета и регистрации случаев заболевания. Однако страдает своевременная диагностика, т.к. среди вновь выявленного больного туберкулеза наблюдаются от 0,5% в Чуйской области до 3,9% в Нарынской области запущенные случаи. У более 17%

больных туберкулезом отмечается лекарственно устойчивый туберкулез, свидетельствующий о несвоевременном и неправильном лечении.

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. Отмечается слабая межсекторальная, и межведомственная интеграция по контролю за зоонозным туберкулезом и нет четкости по учету случаев туберкулеза в АИС.

## **7.2. Особенности эпидемиологического надзора за туберкулезом на современном этапе.**

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 2015 году удельный вес его вырос до 20,7%. Число больных туберкулезом среди ВИЧ, инфицированных выросло с 153 в 2011 году до 206 в 2015 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%.

Выбор основных направлений борьбы с туберкулезом должен базироваться на комплексной оценке эпидемиологической ситуации и знания реальной обстановки для планирования противотуберкулезных мероприятий и определения приоритетов.

ВОЗ разработала масштабную глобальную стратегию на период после 2015 г. «Положить конец ТБ», которая была утверждена Всемирной ассамблеей здравоохранения. Основная цель – профилактика передачи лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого ТБ за счет обеспечения всеобщего доступа к услугам по профилактике, диагностике и лечению ТБ и М/ШЛУ-ТБ во всех государствах-членах Европейского региона ВОЗ. 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%; и показатель успешности лечения больных МЛУ-ТБ на уровне как минимум 75%. В Кыргызской республике показатель успешного лечения МЛУ-ТБ в 2015 году составил 58,0%. Для успешного решения поставленных задач в первую очередь необходимо своевременная диагностика случаев ЛУ туберкулеза для с определением

По оценке специалистов, 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%. 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. Распространение штаммов туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью представляет собой серьезную угрозу здоровью общества и требует новых подходов к лечению заболевания. Длительность лечения (от 20 до 33 мес.) и высокий риск возникновения нежелательных реакций на прием противотуберкулезных препаратов негативно отражается на приверженности пациентов к завершению назначенного курса. Ситуация

осложняется тем, что пациентам с МЛУ ТБ и туберкулезом с широкой лекарственной устойчивостью необходимы особые лекарства[249,250,251].

Таким образом, противотуберкулезные мероприятия, проводимые в республике, имеют следующие сильные стороны:

1. Политическая поддержка Государства и наличие нормативно-правовой базы по диагностике, лечению и профилактике туберкулеза.
2. Обеспеченность вакциной БЦЖ и хороший охват детей вакцинопрофилактикой – 97,3%.
3. Наличие прививочных кабинетов в родильных домах и ПМСП с подготовленным медперсоналом.
4. Поствакцинальные осложнения в допустимых пределах - 0,011% (ВОЗ - 0,1%).
5. Широкий охват флюороосмотром (85,1% подлежащего контингента) и туберкулинодиагностикой;
6. Внедрение молекулярно-генетических методов диагностики ТБ и МЛУ ТБ;
7. Утверждены клинические руководства, клинические протоколы и стандарты лечения больных туберкулезом и М/ШЛУ ТБ;
8. Бесперебойное полное обеспечение ПТП 1,2,3 ряда;
9. Высокая эффективность лечения ТБ (82,3%).

Слабые стороны противотуберкулезных мероприятий:

1. Низкая выявляемость в ряде регионов тубинфицированных детей (высокий удельный вес сомнительных реакций пробы Манту – от 10 до 52,2%).
2. Низкий уровень адвокации, коммуникации и социальной мобилизации.
3. Дезинтегрированность ПМСП и ПТО.
4. Низкая выявляемость ТБ методом флюорографии среди обследованных (2,2%) и микроскопическим методом (6,8%).
5. Низкая доступность молекулярно-генетических экспресс методов диагностики ТБ и МЛУ ТБ.
6. Низкая эффективность лечения МЛУ ТБ (58,0%);

7. Недостаточная психосоциальная помощь больным ТБ на амбулаторном этапе лечения.
8. Все стационары в стране, выделенные для изоляции и оказания паллиативной помощи больным, страдающим хронической заразной формой туберкулеза, не соответствуют требованиям инфекционного контроля.
9. Дефицит врачебных квалифицированных кадров в гражданском и пенитенциарном секторах из-за непрестижности специальности «фтизиатрия» и отсутствия устойчивых программ по привлечению молодых специалистов.

Необходимо отметить, что вышеперечислены основные факторы, которые не способствуют улучшению эпидемиологической ситуации по туберкулезу.

Таким образом, для достижения рекомендаций ВОЗ по снижению заболеваемости и распространенности туберкулезом, снижения передачи возбудителей необходимо своевременное выявление МЛУ, ШЛУ, запущенных форм туберкулеза и туберкулеза среди групп риска (контингент ГСИН и ВИЧ инфицированные), которое возможно при внедрении современных и быстрых методов диагностики.

## ВЫВОДЫ

1. Благодаря внедрению противотуберкулезных программ уровень заболеваемости снизился в 2 раза (170 и 98,7 на 100 000 населения, 2001 и 2015г, соответственно) и установилась стабильная тенденция интенсивных показателей. Однако, эпидемиологическая ситуация в республике остается неблагоприятной, так как добиться снижения заболеваемости <50 на 100 000 населения не удалось.
2. Высокие показатели заболеваемости населения ( $98,7 \pm 0,005$ ), в том числе детей ( $31,9 \pm 0,035$ ) и подростков ( $85,4 \pm 0,063$ ), смертности ( $7,5 \pm 0,011$ ), доли запущенных ( $1,38 \pm 0,1\%$ ) и лекарственно устойчивых форм ( $17,8 \pm 1,2\%$ ) туберкулеза, определяет высокое бремя болезни туберкулеза в КР.
3. 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). Время исследования на системе ВАСТЕСМГИТ 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, примерно, 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 ВАСТЕСМГИТ 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

1. Использовать GenoTypeMTBDRplus тест, для сокращения времени диагностики туберкулеза, определения устойчивости к рифампицину и изониазиду, что значительно ускорит назначение правильного курса лечения для пациентов.
2. 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.
3. Исследование теста XpertMTB/RIF целесообразно включить в объем диагностического минимума обследований для больных туберкулезом легких. В виду того, что зачастую в лабораториях, где проводится анализ отсутствуют требования по биологической безопасности, а также для совершенствования методов диагностики заболевания и инфекционного контроля при туберкулезе данный тест можно шире использовать во фтизиатрической практике.
4. 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.
5. Внедрить учет и регистрацию МЛУ/ШЛУ форм туберкулеза в Автоматизированную информационную систему (АИС) для своевременного проведения противоэпидемических мероприятий и вторичной, третичной профилактики.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2013.
2. WHO/HTM/TB/2011.16. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2011.
3. WHO (World Health Organisation). Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. Geneva, WHO, 2009 (WHO/HTM/TB/2009.411).
4. World Health Organization. Policy framework for implementing new tuberculosis diagnostics. Geneva: World Health Organization, 2011.
5. World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. WHO/HTM/TB/2011.4. Geneva: World Health Organization, 2011.
6. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England Journal of Medicine*, 2010; Sep; 363(11):1005-15.
7. Effective Diagnosis, Treatment, and Control of Tuberculosis. - WHO/SEARO, 1999. – 33 p.
8. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing WHO Report. – WHO, 1994. – 221 p.
9. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing WHO Report. - WHO, 2006. – 227 p.
10. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing WHO Report. - WHO, 2007. – 212 p.
11. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing WHO Report. - WHO, 2008. – 304 p.
12. WHO: Global tuberculosis control - A short up date to the 2009 report.
13. WHO: Global tuberculosis control - A short up date to the 2016 report.
14. Аналитическая справка НЦФ по реализации противотуберкулезных мероприятий и Закона КР «О защите населения от туберкулеза» за 2014 г.

15. Руководство по борьбе с туберкулезом в Кыргызской Республике. Под редакцией профессора, д.м.н. А.Ш.Алишерова. - 2008.
16. Туберкулез. Руководство для врачей / Под ред. З.А. Лебедевой, Н.А.Шмелева. - Москва, 1955. - 653 с.
17. Epidemiological and clinical study of tuberculosis in the district of Kolin, Czechoslovakia / Styblo et al. // Bull. WHO. - 1967. - N. 37. - P.819-874.
18. Руководство по туберкулезу органов дыхания / Под ред. С.М. Княжецкого. - Л., 1972. – 602 с.
19. Prospects for worldwide tuberculosis control under the WHO DOTS strategy / C. Dye, G.P. Garnett, K. Sleeman, B.G.Williams // The Lancet. - 1998. - N.352. - P.1886-1891.
20. Tuberculosis. Handbook. - WHO, 1998. - 222 p.
21. Туберкулез в Российской Федерации 2008 г.: Аналитический обзор. - Москва, 2009. – 221 с.
22. Palomino, J.C. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care / J.C. Palomino, S.C. Leao, V. Ritacco // [www.tuberculosis textbook.com](http://www.tuberculosis textbook.com).
23. WHO Global TB report, Geneva, 2013.
24. Nava-Aguilera, E. Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis / E. Nava-Aguilera, N. Anderson, E. Harris et al. // Inter. J. Tub. Lung Dis. - 2009. - Vol.13, N 1. - P. 17-26.
25. Аналитические обзоры по туберкулезу. [mednet.ru](http://mednet.ru)
26. Аналитические обзоры по туберкулезу. 2011.М..2013.
27. Стратегия ВОЗ «Остановить ТБ». Женева. 2014
28. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации. Туберкулез в Российской Федерации 2009 г. – М., 2009. – 192 с.
29. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации. Туберкулез в Российской Федерации. – М., 2010. – 224 с.;

30. Коломиец В.М. Современные оценки эпидемической ситуации по туберкулезу / IX Съезд фтизиатров России. // Туберкулез и болезни легких. –2011. - № 4. – С. 200-201.
31. Туберкулез в Российской Федерации. Аналитический обзор основных статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации // Под ред. М.И. Перельмана, Ю.В. Михайловой. - М., 2006. – 172 с.
32. Белиловский Е.М. , Борисов С.Е. , Скачкова Е.И., Сон И.М., Галкин В.Б., Данилова И.Д., Пашкевич Д.Д. Сравнение заболеваемости туберкулезом в мире, Европейском регионе ВОЗ и в Российской Федерации. 2011. № 491 - 492
33. Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. ITS Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999; 282: 677–686.
34. Туберкулез: выявление, лечение и мониторинг по К.Томеу. Вопросы и ответы
35. Tuberculosis in the Russian Federation 2011: an analytical review of statistical indicators used in the Russian Federation and in the world (in Russian). Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation et al., 2013
36. Исакова Ф.А. Совершенствование эпидемиологического надзора хронического туберкулеза в современных условиях. Авторефер. 2011.Бишкек. 46с.
37. Закирова К..А. Современная эпидемиологическая ситуация и организационные аспекты совершенствования профилактики туберкулеза в республике Таджикистан. Автореферат диссер. На соискание ученой степени д.м.н. Москва 2012 г.
38. Тилляшайхов М.Н, Мамарасулева О.У. Эпидемиологические показатели туберкулеза в Узбекистане в период внедрения стратегии DOTS Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр фтизиатрии и пульмонологии, г. Ташкент, Узбекистан

Научная библиотека

киберЛенинка: <http://cyberleninka.ru/article/n/epidemiologicheskie-pokazateli-tuberkuleza-v-uzbekistane-v-period-vnedreniya-strategii-dots#ixzz4f3JlO5Pj>

39. Orenstein EW, Basu S, Shah NS, Andrews JR, Friedland GH, et al. (2009) Treatment outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9: 153–161. doi: 10.1016/s1473-3099(09)70041-6
40. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *European Respiratory Journal* 2008; 32(5):1165–74.
41. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England Journal of Medicine*, 2010; Sep; 363(11):1005-15.
42. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of Clinical Microbiology* 2010. Jan; 48(1):229-37.
43. Argulian E., Hewinson C., Faqirzai J., Hurtado N. Treatment success for isoniazid-resistant tuberculosis patients according to treatment status. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Abstract book. 38th World Conference on Lung Health of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Cape Town – South Africa 8-12 November 2007. - Vol. 11. (11). - P.S264.*
44. Althomsons S.P., Holtz T.H., Armatrong L.R. Delay and decline in reporting Drug susceptibility test results, United States 2000-2005. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Abstract book. 38th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). CapeTown - SouthAfrica 8-12November 2007. - Vol. 11. (11). - P.S152.*
45. ВОЗ. 2010. Туберкулез с множественной и широкой лекарственной устойчивостью [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.who.int/tb/publications/2010/mdr\\_report/ru](http://www.who.int/tb/publications/2010/mdr_report/ru).

46. ВОЗ. 2015. ШЛУ-ТБ. [Электронный ресурс]. – Режим доступа:
47. Hewison C., Sizaire V., Kalon S., Cox H., Hurtado N. Development of extremedrug resistance in multidrug-resistant tuberculosis patients. // Int. J. Tuberc. Lung
48. Dis. Abstract book. 38th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Cape Town - South Africa 8-12 November 2007. - Vol. 11. (11). - P.S63.
49. Boman G., Ljung U., Romanus V. Long-term follow-up of patients with MDRTB in Sweden. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. Abstract book. 38th World Conference on Lung Health of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Cape Town - South Africa 8-12 November 2007. - Vol. 11. (11). - P.S125.
50. World Health Organization, Global, report on surveillance and response 2010: Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) WHO/HTM/TB-2010.3
51. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации. Туберкулез в Российской Федерации. – М., 2009. – 192 с.
52. Аналитический обзор статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации. Туберкулез в Российской Федерации г. М., 2010. – 224 с.;
53. Коломиец В.М. Современные оценки эпидемической ситуации потуберкулезу / IX Съезд фтизиатров России. // Туберкулез и болезни легких. –2011. - № 4. – С. 200-201.
54. Туберкулез в Российской Федерации. Аналитический обзор основных статистических показателей по туберкулезу, используемых в Российской Федерации // Под ред. М.И. Перельмана, Ю.В. Михайловой. - М., 2006. – 172 с.
55. Аналитический обзор по туберкулезу в Российской Федерации за 2012-2014 годы. -mednet.ru/ru/czentr./analiticheskie-obzory.html

56. Global tuberculosis report 2015 WHO (2015)
57. Фаворов М.О. Формирование стратегии реформирования общественного здравоохранения в регионе Центральной Азии// Материалы региональной конференции по вопросам общественного здравоохранения и управления в здравоохранении. -Ташкент,2003.-С.5-6
58. Boehme CC, et al. 2010. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 363:1005-1015.
59. Crudu V, et al. 2012. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J. Clin. Microbiol.*
60. Johnston JC, Shahidi NC, Sadatsafavi M, Fitzgerald JM (2009) Treatment outcomes of multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 4: e6914. doi: 10.1371/journal.pone.0006914
61. Исакова Ж.Т. Молекулярно-эпидемиологический анализ рифампицина и изониазид-устойчивых штаммов *M. Tuberculosis*, циркулирующих в Кыргызской Республике //Респираторная медицина. – 2008. - №1. - С.63-66.
62. Chaisson RE, Nuermberger EL. Confronting multidrug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine.* 2012; 366(23): 2223–4.
63. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *Journal of Clinical Microbiology* 2010. Jan; 48(1):229-37.
64. Щербакова Е. Около 70% ВИЧ-инфицированных проживают в странах Африки, расположенных южнее Сахары. М. 2014 г. Институт демографии № 599 - 600.
65. Осколкова О.Б. СПИД в Африке: угроза демографическому развитию «Народонаселение» №2 2002 с. 90-99)
66. ВИЧ-инфекция // Информ. бюлл. Краснодар. - 2004. - N 8. - 30с.
67. Бабаева И.Ю. Туберкулез у больных ВИЧ-инфекцией в новых эпидемиологических условиях. Автореф. диссер. д.м.н. М.2010 43 с.

68. VonReynC.F., KimamboS., MteiL.LyimaJ. MateeM. Deathsfrom unrecognized disseminated tuberculosis in HIV infection. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. Abstract book. 38th World Conference on Lung Health of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Cape Town - South Africa 8-12November 2007. - Vol. 11. (11). - P. S294.
69. King L., Ahuja S.D., Munaiff S. Is a tuberculosis treatment success target of 85% achievable for HIV-infected persons? // Int. J. Tuberc. Lung Dis. Abstract book.
70. Ndelu L. Tuberculosis and HIV summit action plans. // Int. J. Tuberc. Lung Dis.: 44th World Conference on Lung Health of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Abstract book. Paris. France 30-October – 3 November 2013. - Vol. 17. (12). - P.S48.
71. Islam Z., Filippovych S., Denisiuk O., Geliukh E., Smetanina O. Partnership between civil society and state structures in response to fighting HIV-TB epidemic in Ukraine. // Int. J. Tuberc. Lung Dis.: 44th World Conference on Lung Health of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). Abstract book. Paris. France 30-October – 3 November 2013. - Vol. 17. (12). - P.S81-82.
72. Kubica and Dye, 1967, Laboratory Methods for Clinical and Public Health Mycobacteriology, PHS Publication №.1547, U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C.
73. Musser J.M: Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. Clin Microbiol 1995, 8:496-514.
74. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJ. The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis. Science. 2006 Jun 30;312(5782):1944-6.
75. Батыров Ф.А. Динамика основных эпидемиологических показателей по внелегочному туберкулезу за последние 9 лет у постоянных жителей Москвы. /Батыров Ф.А., Шмакова Л.Н., Хоменко А.Г. и др. УП Рос. съезд фтизиатров. М., 2003. – С. 175.

76. Руководство. Определения и система отчетности по туберкулезу-пересмотр 2013 года. WHO/HTM/TB/2-13.2
77. Богородская, Е.М. Первые результаты внедрения приказа Минздрава РФ № 50 «О введении в действие учетной и отчетной документации мониторинга туберкулеза» / Е.М. Богородская, К.Г. Пучков, С.Е. Борисов, М.И. Перельман // Пробл. туб. бол. легких. – 2007. – №5. – С.3-7.
78. Фтизиатрия. Национальное руководство//Под ред. М.И.Перельмана. Москва, «Гэотар- медиа», 2007. -506 с.
79. Shankar P., Manjunath N., Mohan K. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by PCR. Lancet, 1991;387:5-7
80. Имангазинов, С.Б. Научно-методическое обоснование инновационных медико-организационных технологий в профилактике ВИЧ-инфекции: автореф. дисс... д-ра мед наук / С.Б. Имангазинов. - Астана, 2005. – 31 с.
81. Хаертынова, И.М. Совершенствование ранней диагностики туберкулеза и особенности его течения у больных ВИЧ-инфекцией: автореф. дисс... д-ра мед.наук / И.М. Хаертынова И.М. - М., 2008. – 27 с.
82. Михайловский А.М., Сазыкин В.Л.Туберкулез у больных ВИЧ-инфекцией в условиях неблагоприятной эпидемической обстановки по обоим заболеваниям //Сборник трудов XIX Национального Конгресса по болезням органов дыхания. — М.: ДизайнПресс, 2009. — С. 16-17.
83. THE STOP TB STRATEGY: Building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals. - WHO, 2006.
84. Малеев, А.И. Научное обоснование медицинской помощи больным туберкулезом с сопутствующей патологией: автореф.дисс...канд. мед. наук/ А.И. Малеев. - СПб, 2008. – 21 с.
85. Gabriel C, E.D. Charlebois, Padmini S. Mycobacterium tuberculosis: Microbiologic and Clinical Treatment Outcomes in a Randomized Trial of Immediate versus CD4+-Initiated Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Adults with a high CD4+ Cell Count //Clinical Infectious Diseases 2010;51(3),000-000

86. New WHO guidelines: TB prevention for people with HIV. The guidelines show how people with HIV can be protected from TB with regular, low-cost preventive medication // Editors: WHO Department of HIV/AIDS; Stop TB Department 2011; 187 p.
87. Аббасова, Д.М. Дозорный эпидемиологический надзор за ВИЧ-инфекцией как основа разработки и реализации просветительской работы в уязвимых группах населения Согдийской области Республики Таджикистан [Текст]: автореферат дис. ... канд. мед. наук / Д.М. Аббасова. - Душанбе, 2009. – 32 с.
88. Hutanon M.S., Wiriyakijar M.S., Boonnak M.S., Boonpendej M.S. The success model of holistic health care for TB and TB-HIV // Int. J. Tuberc. Lung Dis. Abstractbook. 38th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union). CapeTown – SouthAfrica 8-12November 2007. - Vol. 11. (11). - P.S219-220.
89. Козулицына Т.И. Микробиологические исследования. /Руководство для врачей: Туберкулез органов дыхания. М.,1981.- с.136-149.
90. Weyer K. et al. Laboratory services in tuberculosis control. Part III: culture. Geneva, World Health Organization, 1998 (document WHO/TB/98.258).
91. Финкель Е.А., Алишерова А.Ш., Михайлова Л.В. Бактериологическая диагностика туберкулеза. Бишкек. Илим. 1998 . 347 с.
92. Hobby G.L. et al. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1973, 4:94–104.
93. Canetti G. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion; histobacteriology and its bearing on the therapy of pulmonary tuberculosis. New York, Springer, 1955.
94. Kim T.C. et al. Acid fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pre-treatment and positive smears post-treatment. *American Review of Respiratory Disease*, 1984, 129: 264–268.

95. Туберкулез: выявление, лечение и мониторинг по К. Томену. Вопросы и ответы. /Пер. с англ. – 2-ое издание. Всемирная организация здравоохранения, 2006 г. 406 стр.
96. SteingartKR, HenryM, NgV, HopewellPC, RamsayA, CunninghamJ, et al. Fluorescence versus conventional sputum smearmicroscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases* 2006; 6(9):570–81.
97. Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Diseases* 2006; 6(10): 664–74
98. Harries A.D. et al. Sputum smears for diagnosis of smear"positive pulmonary tuberculosis. *Lancet*, 1996, 347:834"835.
99. Getahun H, Harrington M, O'Brien R, and Nunn P. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet* 2007;369(9578):
100. Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *Journal of Infectious Diseases* 2007; 196(Suppl 1):S15–27.
101. Weyer K. et al. Laboratory services in tuberculosis control. Part II: microscopy. Geneva, World Health Organization, 1998 (document WHO/TB/98.258)
102. 102. ATS/CDC/Council of the Inf Dis Society of America: Diagnostic Standards and Classification of tuberculosis in adults and children/ *Am j Respir Crit Care Med* 2000; 161:1376-1395)].
103. Cruikshank D.B. Bacteriology. In: Sellors TH, Livingstone JL, eds. *Modern practice of tuberculosis*. Vol. 1. London, Butterworths, 1952:53–77.
104. Grzybowski S 1991. Tuberculosis in the third world. *Thorax* 46: 689-69.
105. Cole ST, Telenti A., Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J Suppl*. 1995. Sep; 20:701S-713S 3.
106. Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Clinical interest of a new simple system for Isolating *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Clin ESP* 1997b; 197:148–151.

107. Deutsches Institut für Normung. 1986. Medical microbiology. Diagnosis of tuberculosis. Parts 3. 32. Beuth Verlag, Berlin, Germany.
108. N.K. Jain. Laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis: conventional and newer approaches, *Ind.J.Tub.*,1996,43,107
109. Murray, P. 1992. Laboratory diagnosis of mycobacteriosis. In *Clinical Microbiology Updates*. Hoechst-Roussel Pharmaceuticals, Somerville, NJ
110. Калюк А.Н. Комплексные бактериологические исследования в диагностике туберкулеза. // *Туберкулез и экология*. - 1995. - № 3.-с.28-31.
111. World Health Organization. Multidrug and Extensively Drug-Resistant TB (M/XDR-TB): 2010 Global Report on Surveillance and Response. WHO/ATM/TB2010.3. Geneva, World Health Organization, 2010.
112. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. 2009. Drug- susceptibility testing in TB: status and future prospects. *Expert Rev. Respir. Med.* 3:497-510.
113. Cohn D. et al. Drug-resistance in TB: review of the worldwide situation and WHO/IUATLD global surveillance project. // *Clin. Infect. Dis.*1997, 24,(suppl.1):121-130;
114. Kubin M. et al. A MDR-TB microepidemic caused by genetically closely related *Mycobacterium Tuberculosis* strains. // *J. Clin. Microbiol.* 1999, Aug.37, (8):2715-6.
115. Pablos-Mendez Ariel et al. Global surveillance for anti-TB drug-resistance 1994-1997. // *The New Eng. J. Med.*, 1998, vol.338, #23, pp.1041-49
116. Sbarbaro JA 1995. Tuberculosis in the 1990s. Epidemiology and therapeutic challenge. *Chest* 108: 58S-62S
117. Peerbooms PG, Doornum GJ, Van Deutekom H, Coutinho RA, Van Soolingen D1995. Laboratory-acquired tuberculosis. *The Lancet* 345: 1311-1312
118. Nicol MP. Wilkinson RJ (2008). The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tran R Soc Trop Med Hyg* 102 (10) 955-65.
119. Steingart K. Retal. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults (Review). *Cochrane Data base of Systematic Reviews* 2013, Issue 1. Art. No.: CD009593. 2013.

120. World Health Organization, Global tuberculosis control – epidemiology, strategy financing. WHO report 2009.WHO/HTM/TB-2009411. Geneva, World Health Organization, 2009.
121. Mycobacteriology laboratory manual. First Edition, April 2014. GlobalLaboratoryInitiative. 154 с.
122. Оттен Т.Ф. Особенности бактериологической диагностики и этиотропной терапии микобактериоза легких: Автореф. дис. д-ра мед. наук. - СПб. 1994.-41 С.
123. Miotto P, Bigoni S, Migliori GB, Matteelli A, Cirillo DM. 2012. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert MTB/RIF. Eur. Respir.J. 39: 1269-1271.
124. Hillemann, S. Rusch-Gerdes, E. Richter, Evaluation of the GenoType MTBDR plus assay for Rifampin and isoniazid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates and clinical specimens, J. Clin. Microbiol. 45 (2007) 2635–2640.
125. The Global Plan to Stop TB, 2011–2015. Geneva, World Health Organization, 2010(WHO/HTM/STB/2010.2).[http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB\\_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf](http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf)<http://www.un.org/sg/management/beyond2015.shtml>.
126. Jacob Creswell, SuvanandSahu, Kuldeep Singh Sachdeva, LucicaDitiu, DraurioBarreira, AndreiMariandyshev, ChenMingting&YoganPillayТуберкулезвстранахБРИКС: задачиивозможностидлялидерствавповесткеднянапериодпосле 2015 года
127. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. Emerg Infect Dis 2002; 8: 843-9.
128. Katoch V. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM) // Indian J. Med. Res. 2004. - v. 120. - p. 290-304.
129. Salman H. Siddiqi, Sabine Rusch-Gerdes. Руководство по работе с Системой BACTEC MGIT 960. FIND 2006. 74 p.

130. LoBue P.A., Enarson D.A., Thoen T.C. Tuberculosis in humans and its epidemiology, diagnosis and treatment in the United States. // Int. J. Tuberc. LungDis. – 2010. – Vol. – 14, N 10/ - P.1226-1232.
131. Информационный бюллетень ВОЗ № 360. Июль 2015 г.
132. Hoffner S.E., Svenson SA, Norberg R, Dias F, Ghebremichael S, Kallenius G 1993. Biochemical heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Guinea-Bissau. J Clin Microbiol 31: 2215-2217.
133. ВАСТЕС MGIT 960 SIREKit Для исследования чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* к противомикобактериальным препаратам, Руководство пользователя.
134. Приказ МЗ КР № 670 от 27.11.2013 года «О мерах по совершенствованию противотуберкулезной помощи населению Кыргызской Республики»,
135. Katoch V. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM) // Indian J. Med. Res. 2004. - v. 120. - p. 290-304.
136. Иртуганова О.А., Смирнова Н.С., Мороз А.М., Литвинов В.И. Ускоренная культуральная диагностика туберкулеза с использованием систем ВАСТЕС MGIT и MB/Bact // Метод. рекомендации МНПЦБТ. – М., 2001. – 16 с.
137. Badak F Z, Kiska D L, Setterquist S, Hartley C, O’Connell M A, Hopfer R L. Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube with ВАСТЕС 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol 1996; 34:2236–2239.
138. Salman H. Siddiqi Sabine Rusch-Gerdes. Руководство по работе с Системой ВАСТЕС MGIT 960 FIND. 2006. 74p
139. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez A, Bouza E, García de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. J Clin Microbiol. 2011 Jul;49(7):2688-90.
140. Maloney S., Welbel S., Daves B. et al. *Mycobacterium abscessus* pseudoinfection traced to an automated endoscope washer: utility of

- epidemiologic and laboratory investigations // *J. Infect. Dis.* 1994. - v. 169. -p. 1166-1169.
141. Timpl A., Runyon E. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease: a preliminary report // *J. Lab. Clin. Med.* 1954. — V. 44.-p. 202-209.
142. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, et al. (2011) Feasibility and impact of decentralized use of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistance—results from a multi-center implementation study. *Lancet* 377: 1495–1505.
143. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. ISBN 978 92 4 154880 9. World Health Organization 2014. WHO/HTM/TB/2014.11/
144. РУКОВОДСТВО К ПОЛЬЗОВАНИЮ Genotype MTB DR plus version 2.0, Hein Lifescience, GMBH, 02/2012. GenoType MTB DR plus VER 2.0; molecular Genetic Assay for Identification of *M.tuberculosis* and its Resistance to Rifampicin and Isoniazid from Clinical Specimens and Cultivated Samples. Instructions for Use. Hein Lifescience, 2012
145. ИсаковаЖ.Т., ГончароваЗ.К., ЮсуповаЭ.У. и др. Эффективность применения биочип-анализа для быстрого молекулярно-генетического определения мульти-резистентных штаммов *M.Tuberculosis*// молекулярная медицина. – 2008. -№1. –С.51-55.
146. Katoch V. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM) // *Indian J. Med. Res.* 2004. - v. 120. - p. 290-304.
147. Crudu V, Stratan E, Romanenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances. *J Clin Microbiol* 2012; Epub ahead of print, doi: 10. 1128/JCM. 05903-11.
148. Cepheid. Brochure: Xpert®MTB/RIF. Two-hour detection of MTB and resistance to rifampicin. <http://www.cepheid.com/media/files/eu/brochures/Xpert MTB Broch R9 EU.pdf>. Sunnyvale Accessed 17 June 2012.

149. Литвинов В.И., Макарова М.В., Краснова М.А. Нетуберкулезные микобактерии. М.: МНПЦБТ. -2008.- 256 С.
150. Оттен Т.Ф. Чувствительность некоторых видов нетуберкулезных микобактерий к антибиотикам и химиопрепаратам широкого спектра действия//Проблемы и перспективы развития бактериологии во фтизиатрии. -М.- 1988.-с. 87-91.
151. Оттен Т. Ф. Микобактериоз легких: клинико-бактериологические критерии диагностики // БЦЖ. 1999. - № 3. - с. 17-19.
152. Вишневская Е.Б. Особенности выделения ДНК для ПЦР при туберкулезе внелегочных локализаций. // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 5.-с.23-26.
153. Дзадзиева М.Ф., Жербутович Н.В. Диагностическая ценность ПЦР притуберкулезе. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. -1997. - № 5.-с.10-13.
154. Musser JM: Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights.*Clin Microbiol* 1995, **8**:496-514.
155. K. Y. Yuen, K. S. Chan, W. C. Yam, K. H. Yim, W. F. Ng, and M. H. Ng 1996. Single tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. *JClinPathol*. 1996 April; 49(4): 290–294.
156. Вишневский Б.И., Мирлина Е.Д. ПЦР-диагностика микобактерий туберкулеза методом полимеразной цепной реакции при туберкулезе различных локализаций. // В сб.: Проблемы ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза. Материалы научно-практической конференции. Обнинск, 1996. -с. 14.
157. Нестеренко Л.Н. Использование молекулярно-биологических методов в диагностике и типировании штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. / В сб.: Молекулярные основы патогенеза и диагностики туберкулеза и другой легочной патологии. Материалы научно-практической конференции. М., 1995.с.50.
158. WHO. Guidance on ethics of tuberculosis prevention, care and control. Geneva: World Health Organization, 2010.



168. Ablordey A., Kotlowski R., Swings J. et al. PCR amplification with primers based on IS2404 and GC-rich repeated sequence reveals polymorphism in *Mycobacterium ulcerans* // J. Clin. Microbiol. 2005. - v. 43. - p. 448-451.
169. Mohamed A., Kuyper D., Iwen P. Et al. Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium* species//J. Clin. Microbiol. 2005. - v. 43. - p. 3811-3817.
170. Макаревич Н.М. Чувствительность атипичных микобактерий к различным противотуберкулезным препаратам//Сб. научн. тр. т. 20. -М.: ЦНИИТ. - 1976. - с. 148-150.
171. Оттен Т.Ф. Чувствительность некоторых видов нетуберкулезных микобактерий к антибиотикам и химиопрепаратам широкого спектра действия//Проблемы и перспективы развития бактериологии во фтизиатрии. -М.- 1988.-с. 87-91.
172. Оттен Т. Ф. Микобактериоз легких: клинико-бактериологические критерии диагностики // БЦЖ. 1999. - № 3. - с. 17-19.
173. Kuze F., Kurasawa T., Bando K. et al. In vitro and in vivo susceptibility of atypical mycobacteria to various drugs // Rev. Infect. Dis. — 1981.-v. 3.-P- 885-897.
174. Heifets L. Synergistic effect of rifampin, streptomycin, ethionamide, and ethambutol on *Mycobacterium intracellulare* // Am. Rev. Respir. Dis. 1982. - v. 125. - p. 43-48.
175. Heifets L. MIC as a quantitative measurement of the susceptibility of *Mycobacterium avium* strains to seven antituberculosis drugs // Anti-microb. Agents Chemother. 1988. - v. 32. - p. 1131-1136.
176. Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria // Semin. In Respir. Crit. Care Med. 2004. - v. 25 (3). - p. 283-295
177. Woodley C., Kilburn J. In vitro susceptibility of *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* strains to a spiro-piperidyl rifamycin // Am. Rev. Respir. Dis. 1982. - v. 126. - p. 586-587.

178. Gay J., De Young D., Roberts G. In vitro activities of norfloxacin and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, and *M. kansasii* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984. - v. 26. - p. 94-96.
179. Steadham J., Stall S., Simmank J. Use of the BACTEC system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, and *M. avium* complex // *Diagn. Microbiol. Infect.* 1985. - v. 3. - p. 33-40.
180. Leysen D., Haemers A., Pattyn S. *Mycobacteria and the new quinolones* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989. - v. 33. - p. 1-5.
181. Biehle J., Cavalieric S., Saubolle M. et al. Evaluation of E test for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria // *J. Clin. Microbiol.* — 1995.-v. 33.-p. 1760-1764.
182. Kiehn T., Cynamon M., Inderlied C. et al. Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*: tentative standards // National Committee for Clinical Laboratory Standards document M24-T, December. 1995. - v. 15.-p. 1-31.
183. Leysen D., Haemers A., Pattyn S. *Mycobacteria and the new quinolones* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989. - v. 33. - p. 1-5.
184. Biehle J., Cavalieric S., Saubolle M. et al. Evaluation of E test for susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria // *J. Clin. Microbiol.* — 1995.-v. 33.-p. 1760-1764.
185. Kiehn T., Cynamon M., Inderlied C. et al. Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis*: tentative standards // National Committee for Clinical Laboratory Standards document M24-T, December. 1995. - v. 15.-p. 1-31.
186. Fabry W., Schmid E., Ansorg R. Comparison of the E test and proportional dilution methods for susceptibility testing of *Mycobacterium kansasii* // *Chemotherapy.* 1995. - v. 41. - p. 247-252.

187. Wallace R., Glassroth J., Griffith D. et al. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria (American Thoracic Society Statement) // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997. - v. 156. - p. 125.
188. Heifets L. (ed.) Clinical Mycobacteriology // WB Saunders, Philadelphia. 1996. - 639 P.
189. Kent PT, Kubica GP (1985). Public health mycobacteriology. A guide for a level III laboratory. Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
190. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. ISBN 978 92 4 154880 9. World Health Organization 2014. WHO/HTM/TB/2014.11
191. Ichiyama S, Suzuki K. 2005. Clinical application of testing methods on acid-fast bacteria. Kekkaku 80:95-111. (In Japanese.) Barnard et al
192. Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, et al. (2011) Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol 49: 1621–1623.
193. Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, Michael JS, Gotuzzo E, et al. (2011) Feasibility and impact of decentralised use of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistance—results from a multi-center implementation study. Lancet 377: 1495–1505.
194. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary TB in adults and children. Policy update. WHO/HTM/2013.16
195. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Cole S, Colston MJ, et al. (1993) Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 341: 647–650.
196. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menendez A, Bouza E, Garcia de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. J Clin Microbiol 2011; 49: 2688-2690

197. Crudu V, Stratan E, Romanenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances. *J Clin Microbiol* 2012; Epub ahead of print, doi: 10. 1128/JCM. 05903-11.
198. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *M.tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 1320-1330.
199. Токтогонова А.А.Уровень распространенности монорезистентности к противотуберкулезным препаратам первого ряда в Кыргызской Республике. 2012.
200. Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menendez A, Bouza E, Garcia de Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2688-2690
201. Billington O, McHugh TD, Gillespie SH. Physiological cost of rifampin resistance induced *in vitro* in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* (1999) 43:1866–9
202. M Palaci, S Y Ueki, D N, 1999. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens.
203. Pfyffer G E, Welscher H-M, Kissling P, Cieslak C, Casal M J, Gutierrez J, Rüscher Gerdes S. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997; 35:364–368.
204. S. RUSCH-GERDES, C.DOMEHL, G. NARDI, M.R. GISMONDO, H. WELSCHER, G.E. PFYFFER. Multicenter Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to First-Line Drugs, *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Jan. 1999, p. 45–48.

205. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, Stover CK. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1996. 14; 272(5268)-p.1641-1643.
206. Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y., Taniguchi, H. (1998). Detection of Kanamycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Identifying Mutations in the 16S rRNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1220-1225
207. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, and Bodmer T., Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993. 37:2054-2058.
208. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Shopfer K., Bodmer T., Detection of Rifampin Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae*. *Lancet*. 1993. 341:647-650.
209. Telzak EE, Sepkowitz K, Alpert P, et al. Multidrug-resistant tuberculosis inpatients without HIV infection. *N Engl J Med* 1995; 333:907-911.
210. Walters, S. B., B. A. Hanna, S. E. Kodosi, D. T. Stitt, P. M. Tierno, and L. J. Tick. 1994. Rapid detection of multi drug resistant tuberculosis (MDR-TB) directly from patient specimens with the Mycobacterial Growth Indicator Tube, abstr. C-113, p.510. In Program and abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology 1994. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 764 NOTES J. CLIN. MICROBIOL.
211. Malik AN, Godfrey-Faussett P (2005) Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* 5 (3) 174–183. doi: 10.1016/s1473-3099(05)01310-1
212. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S (2005) Use of Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 43 (8) 3699–3703.
213. Makinen J, Marttila HJ, Marjamaki M, Viljanen MK, Soini H (2006) Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection

- of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2006 44 (2) 350–352.
214. Miotto P, Piana F, Penati V, Caducci F, Migloiori GB, et al. (2006) Use of Genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. J Clin Microbiol 44 (7) 2485–2491.
215. Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W (2006) Performance of the genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium tuberculosis* with low- and high-level resistance. J Clin Microbiol 44 (10) 3659–3664.
216. Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, Bosman ME (2008) Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am J Respir Crit Care Med 177: 787–792.
217. Evans J, Stead MC, Nicol MP, Segal H (2009) Rapid genotypic assays to identify drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in South Africa. J Antimicrob Chemother 63 (1) 11–16.
218. Neeraj Raizada, K. S. Sachdeva, D. S. Chauhan, et al. //A Multi-Site Validation in India of the Line Probe Assay for the Rapid Diagnosis of Multi-Drug Resistant Tuberculosis Directly from Sputum Specimens. Published: February 19, 2014 DOI: 10.1371/journal.pone.0088626
219. Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: Guide for the Level III Laboratory. US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control, USA, 1985.
220. Genotype MTBDR<sup>plus</sup><sup>TM</sup>, version 2.0 [User's Manual]. Nehren, Germany: Hain Lifescience, GmbH. Hain lifescience website. Available: [http://www.hainlifescience.com/pdf/304xx\\_pbl.pdf](http://www.hainlifescience.com/pdf/304xx_pbl.pdf). Accessed 2013 Nov.

221. Rigouts L, Nolasco O, de Rijk P et al. Newly developed primers for comprehensive amplification of the *rpoB* gene and detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 252–
222. Hazbo'n MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2640–9.
223. Yu S, Giroto S, Lee C et al. Reduced affinity for isoniazid in the S315T mutant of *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a key factor in antibiotic resistance. *J Biol Chem* 2003; 278: 14769–75.
224. Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, Andersson DI. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. Apr; 48(4):1289-94.
225. Hillemann D, Kubica T, Agzamova R, Venera B, Rusch-Gerdes S, et al. (2005) Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis* 9 (10) 1161–1167.
226. Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, and Soyler I (2006) Evaluation of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol* 44 (7) 2338–2342.
227. Miotto P, Piana F, Penati V, Canducci F, Migliori GB, et al. (2006) Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in Italy. *J Clin Microbiol* 44 (7) 2485–2491.
228. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamaki M, Viljanen MK, Soini H (2006) Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44 (2) 350–352.
229. Brossier F, Veziris N, Tuffot-Pernot C, Jarlier V, Sougakoff W (2006) Performance of the Genotype MTBDR line probe assay for detection of resistance to rifampin and isoniazid in strains of *Mycobacterium*

- tuberculosis* with low- and high-level resistance. *J Clin Microbiol* 44 (10) 3659–3664.
230. Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML (2009) Direct susceptibility testing for multi-drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. *BMC Infect Dis* 9: 67.
231. Albert Heidi, Bwanga Fred, Mukkada Sheena, Nyesiga Barnabas, Ademu Patrick, et al. (2010) Rapid screening of MDR-TB using molecular Line Probe Assay is feasible in Uganda. *BMC Infectious Diseases* 10: 41.
232. Telenti A, Imbonden P, Marshesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, Matter L, Schopfer K, Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993, 341: 647-650.
233. Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDR*plus* assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* 2007; 45: 2635–40
234. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79:3–29
235. Qian L, Abe C, Lin T.P, Yu M.C, Cho S.N, Wang S, Douglas J.T. *rpoB* genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from east Asian countries. *J. Clin. Microb.* 2002, 40, 1091-1094
236. Afanas'ev MV, Ikryannikova LN, Il'ina EN, Sidorenko SV, Kuz'min AV, Larionova EE, Smirnova TG, Chernousova LN, Kamaev EY, Skorniakov SN, et al.: Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *J Antimicrob Chemother* 2007, 59(6):1057-1064
237. Guerrero C., Bernasconi C., Burki D. et al. A novel insertion element from *Mycobacterium avium*, IS 1245, is a specific target for analysis of strain relatedness// *J. Clin. Microbiol.* 1995. - v. 33. - p. 304-307.

238. Kasai H., Ezaki T., Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences//. Clin. Microbiol. 2000. - v. 38. - p. 301-308.
239. Patel J., Leonard D., Pan X. et al. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system // J. Clin. Microbiol. 2000. - v. 38. - p. 246-251.
240. Laussucq S., Baltch A., Smith R. et al. Nosocomial Mycobacterium fortuitum colonization from a contaminated ice machine // Am. Rev. Respir. Dis. - 1988.- v. 138.-p. 891-894.
241. Приказ МЗ СССР № 527 от 05.07.1988 г. «О совершенствовании противотуберкулезной помощи в стране».
242. Приказ МЗ КР № 285 от 30.08.2000 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию противотуберкулезной помощи населению Кыргызской Республики»,
243. Национальная программа «Туберкулез-II» на 2001-2005 годы. Утверждена Постановлением Правительства Кыргызской республики №263 от 6 июня 2001 года.
244. Национальная программа «Туберкулез -III» на 2006-2010 годы. Утверждена Постановлением Правительства Кыргызской республики №331 от 6 мая 2006 года.
245. Национальная программа «Туберкулез -IV» на 2013-2016 годы. Утверждена Постановлением Правительства Кыргызской республики №325 от 10 июня 2013 года.
246. «Концепция развития противотуберкулезной службы в КР на 2008-2016 гг.»;
247. Приказ Министерства здравоохранения Кыргызской Республики от 27 ноября 2013 года № 670 «О мерах по совершенствованию противотуберкулезной помощи населению Кыргызской Республики»

248. Приказ Министерства здравоохранения Кыргызской Республики «О мерах по дальнейшему усовершенствованию противотуберкулёзной помощи населению Кыргызской Республики» №285 от 30.08.2000 г.
249. Методическое руководство «Инфекционный контроль туберкулеза в организациях здравоохранения Кыргызской Республики», 2013 г. 97 стр.
250. World Health Assembly Resolution 67.1. Global strategy and targets for TB prevention, care and control after 2015. Geneva: World Health Organization, 2014.
251. Стратегия Всемирной Организации Здравоохранения «Остановить ТБ»/World Health organization, Strategy “Stop TB partnership”. Женева. 2014