

Петрова Людмила Витальевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКОБАКТЕРИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ, ОПТИМИЗАЦИЯ
АЛГОРИТМА ИХ ВЫЯВЛЕНИЯ**

1.5.11 – микробиология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Научный руководитель:

Кандидат медицинских наук

Смирнова Татьяна Геннадьевна

Официальные оппоненты:

Исаева Гузель Шавхатовна – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по инновационному развитию

Носова Елена Юрьевна – доктор медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», отдел проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

Защита диссертации состоится «__»_____ в ____ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «__»_____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Показатели заболеваемости и смертности по туберкулезу (ТБ) в Российской Федерации снижаются, но эпидемиологическая ситуация остается напряженной из-за роста лекарственно-устойчивого туберкулеза, и, особенно, туберкулеза с множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивостью, утяжеления форм туберкулезного процесса, а также достаточно высокого числа больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией (ТБ/ВИЧ) (Нечаева О.Б., 2019; Шилова М.В., 2019; Васильева И.А., 2022).

Эта тенденция характерна и для Республики Марий Эл (РМЭ). В 2019г. заболеваемость постоянных жителей Марий Эл (39,5 на 100 тыс. населения) была на 21,8% ниже показателя 2017 г. (50,5 на 100 тыс. населения), в 2021 г. – на 36,7% ниже, чем в 2019г. (25,0 на 100 тыс. населения) и на 7,1 % ниже показателя в 2021 г. по РФ, (26,9 на 100 тыс.). Показатель выявления туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза (МБТ) в республике держится на высоком уровне – в 2018 г. уровень туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью составлял 20,7%, в 2019г. – 19,8%, в 2021г. – 21,6%. Следует отметить, что Республику Марий Эл отличает низкий уровень миграции и сравнительно невысокий процент ежегодно выявляемых больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией.

Стоит отметить, что в сравнительно малом числе регионов Российской Федерации проводились исследования по распространенности генотипов микобактерий туберкулеза (МБТ) (Синьков В.В. и др., 2010; Умпелева Т.В. и др., 2013; Концевая И.С., 2014; Пасечник О.А. и др., 2018; Салина Т.Ю. и др., 2018; Павлов Н.Г. и др., 2021). В Марий Эл до настоящего времени такие исследования не выполнялись.

В последние годы в Марий Эл растет количество лиц, выделяющих нетуберкулезные микобактерии (НТМБ). Следует отметить, что распространенность нетуберкулезных микобактерий изучена лишь в небольшом числе регионов России (Эргешов А.Э. и др., 2016; Смирнова Т.Г. и др., 2017; Литвинов В.И. и др., 2019; Сюнякова Д.А., 2021). Поэтому представляется актуальным изучить региональные особенности популяции нетуберкулезных микобактерий, оценить видовое разнообразие и частоту их выделения у различных групп пациентов, определить спектр лекарственной устойчивости у наиболее часто встречающихся видов.

Необходимо систематизировать данные о циркулирующих в регионе микобактериях (МБ), а именно: в динамике проанализировать показатели уровня и распространенности лекарственной устойчивости (ЛУ) микобактерий туберкулеза для различных групп больных с изучением профилей резистентности, спектра мутаций, ассоциированных с резистентностью к основным противотуберкулезным препаратам (ППП), генотипов микобактерий туберкулеза.

Назрела необходимость оценить эффективность комплекса методов, используемых на разных этапах диагностики и оптимизировать региональный алгоритм исследований.

Степень разработанности темы исследования

В литературных источниках имеется достаточное количество данных по сравнению методов выявления микобактерий туберкулеза (Иртуганова О.А. и др., 2002;

Augustynowicz-Kopec E. et al., 2002; Cruciani et al., 2004; Steingart K.R. et al., 2006; Boehme C.C. et al., 2010; Chihota V.N. et al., 2010; Ерохин В.В. и др., 2012; Hasan M. et al., 2013; Севастьянова Э.В. и др., 2015, 2018; Солоненко И.И. и др., 2018; Шульгина М.В. и др., 2018). В России обследование пациентов на микобактерии в учреждениях общей лечебной сети проводится микроскопическим методом, что малоэффективно. Нередко туберкулез маскируется под неспецифические заболевания, или у пациентов имеется сочетанная с туберкулезом патология, поэтому основная масса больных туберкулезом выявляется уже в учреждениях туберкулезного профиля после дообследования (Кривонос П.С. и др., 2010; Bhatt M. et al., 2012; Лушникова А.В. и др., 2013; Московчук А.Ф. и др., 2013; Лаушкина Ж.А. и др., 2016). Имеются единичные публикации по выявлению микобактерий туберкулеза в учреждениях нетуберкулезного профиля у пациентов с различным предварительным диагнозом (Дейкина О.Н. и др., 2007; Русакова Л.И. и др., 2011; Кашуба Е.В. и др., 2013; Мишин В.Ю., 2013; Павлушин А.В. и др., 2014; Валиев Р.Ш. и др., 2016; Бородулина Е.А. и др., 2019; Дубровская И.И. и др., 2020). Внедрение в качестве скринингового метода выявления микобактерий туберкулеза в учреждениях общей лечебной сети метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) более эффективно по сравнению с микроскопическим. Однако нередко в этих учреждениях, также как и в противотуберкулезных, встает вопрос об интерпретации результатов ПЦР в реальном времени, полученных на поздних циклах амплификации: обнаружена истинная ДНК микобактерий туберкулеза или материал контаминирован на преаналитическом этапе. Данных по исследованиям на эту тему в литературных источниках не найдено. Как в мире, так и в Российской Федерации достаточно много публикаций по сравнению результатов тестирования лекарственной чувствительности (ТЛЧ) микобактерий туберкулеза различными методами (Heifets L., 1998; Pfyffer G.E. et al., 2002; Hillemann D. et al., 2005; Rosales S. et al., 2009; Васильева И.А. и др., 2012; Адамбекова А.Д. и др., 2013; Feng Y. et al., 2013; Марьяндышев А.О. и др., 2014; Скорняков С.Н. и др., 2014; Ким Т.М. и др., 2015; Сафонова С.Г. и др., 2016; Черноусова Л.Н. и др., 2017; Чункаева Д.Д. и др., 2017; Li S. et al., 2017; Ершов В.И. и др., 2021), однако, в отличие от Марий Эл, исследования в основном проводились среди пациентов конкретных учреждений, а не региона Российской Федерации в целом. В отдельных регионах Приволжского федерального округа (ПФО), куда относится и Марий Эл, проводился анализ спектра мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, генотипических линий микобактерий туберкулеза, распространенных на территориях (Концевая И.С., 2014; Морозова Т.И. и др., 2015; Салина Т.Ю. и др., 2019; Андреевская С.Н. и др., 2020). В Республике Марий Эл таких данных до настоящего исследования не было.

В литературных источниках имеются публикации по видовому разнообразию нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в ряде территорий России (Оттен Т.Ф., 2005; Смирнова Т.Г. и др., 2017; Елисеев П.И. и др., 2018; Литвинов В.И. и др., 2019; Старкова Д.А. и др., 2019). В республике Марий Эл до настоящего исследования не было данных по изучению штаммов нетуберкулезных микобактерий.

Цель исследования: Изучить биологические свойства циркулирующих в Республике Марий Эл микобактерий и оптимизировать методы их выявления для

повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулёза и микобактериоза.

Задачи исследования:

1. С использованием разных методов исследования провести сравнительный анализ эффективности выявления микобактерий из различных видов диагностического материала и для различных форм туберкулёзного процесса у лиц, обследованных с целью диагностики в клинико-диагностических лабораториях нетуберкулезных учреждений и в бактериологической лаборатории Республиканского противотуберкулезного диспансера.

2. Ретроспективно оценить динамику уровня и спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, выделенных от различных контингентов больных туберкулезом в Республике Марий Эл за 20-летний период наблюдения.

3. Оценить совпадение результатов лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, полученных с использованием фенотипических и молекулярного тестов. Описать спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, и установить принадлежность лекарственно-чувствительных и лекарственно-устойчивых культур микобактерий туберкулеза, выделенных от разных контингентов больных, к определенному генетическому кластеру.

4. Изучить видовое разнообразие и частоту выявления у обследуемых пациентов различных видов нетуберкулезных микобактерий, определить спектр лекарственной устойчивости часто встречающихся видов.

5. Оценить результаты диагностических исследований по выявлению ДНК микобактерий туберкулеза методом ПЦР в реальном времени на поздних циклах амплификации.

6. Разработать оптимальный алгоритм диагностики и дифференциальной диагностики микобактерий в Республике Марий Эл с включением в него классических микробиологических и молекулярно-генетических методов.

Научная новизна исследования

Впервые в Республике Марий Эл обобщены результаты 20-летнего мониторинга лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. Установлено, что уровень лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в республике высокий и имеет тенденцию к росту – с 42,20% в 1998г. до 46,25% в 2007г. и 52,35% в 2019г.– за счет штаммов микобактерий с множественной лекарственной устойчивостью среди всех контингентов больных туберкулезом легких – с 14,86% в 1998г. до 33,24% в 2007г. и 36,82% в 2019г.

Показано, что среди всех контингентов больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью на территории республики преобладают штаммы микобактерий туберкулеза с мутацией в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser→Leu (83,42%), в 315 кодоне гена *katG* с заменой Ser→Thr1 (75,68%) и в 94 кодоне гена *gyrA* (68,97%) с наиболее частой заменой Asp→Gly среди мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам соответственно.

На территории Марий Эл установлено значительное доминирование штаммов микобактерий туберкулеза генетического семейства Beijing (77,68%). На втором месте по

встречаемости регистрировались штаммы группы T (9,87%) с преобладанием генотипа T1 и на третьем – LAM9 (3,43%), что нехарактерно для других территорий Российской Федерации.

С использованием молекулярно-генетических методов исследования, изучено видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в Республике Марий Эл. В отличие от других регионов Российской Федерации, установлено преобладание видов *M.intracellulare* (25,40%), *M.gordonae* (22,22%) и *M.avium* (16,40%) в убывающем порядке.

Впервые проведен анализ случаев выделения нетуберкулезных микобактерий у больных с различными неспецифическими заболеваниями органов дыхания и у лиц с установленным диагнозом «туберкулез». Чаще всего нетуберкулезные микобактерии выделялись у лиц с неспецифическими заболеваниями респираторной системы – 50,83%, несколько реже у лиц с подозрением на туберкулез легких – 29,28% и у лиц с верифицированным диагнозом и пролеченных от туберкулеза ранее – 19,89%.

На большом объеме данных впервые проведена оценка результатов выявления ДНК микобактерий методом ПЦР в реальном времени на поздних циклах амплификации и установлено, что ДНК микобактерий туберкулеза на поздних циклах амплификации были получены в 28,42% случаев среди всех позитивных результатов, из них у 80,12% лиц результат был истинным, то есть с подтвержденным при дообследовании диагнозом «туберкулез».

Оптимизирован региональный алгоритм микробиологической диагностики туберкулеза и микобактериоза, предусматривающий использование как традиционных, так и современных быстрых методов исследования, в частности, скрининговое обследование кашляющих больных в учреждениях нетуберкулезного профиля (Информационное письмо Министерства Здравоохранения Республики Марий Эл руководителям медицинских организаций № 6580 от 10 июля 2023г.).

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены новые данные о распространенности и структуре лекарственной устойчивости современной популяции штаммов туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих на территории Республики Марий Эл. Результаты исследования свидетельствуют о значительном бациллярном ядре лиц с широкой лекарственной устойчивостью, сформировавшемся в основном за счет прочего контингента больных туберкулезом.

Результаты ретроспективного анализа уровня и спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, спектра мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью, а также данные по распространенности генотипических линий микобактерий туберкулеза дают представление о характеристике свойств возбудителя. Полученные данные позволяют прогнозировать постепенное накопление в Республике Марий Эл штаммов микобактерий туберкулеза с широким спектром резистентности, что может неблагоприятно отразиться на эпидемиологической ситуации по туберкулезу в перспективе.

Проведенный комплексный анализ эффективности применения микробиологических и молекулярно-генетических методов выявления микобактерий и определения лекарственной чувствительности в условиях Республики Марий Эл обосновывает необходимость широкого использования молекулярно-генетических тестов для пациентов медицинских учреждений нетуберкулезного профиля.

Полученные знания о больных, выделяющих нетуберкулезные микобактерии, и структуре лекарственной устойчивости часто встречающихся нетуберкулезных микобактерий, выделенных в республике, могут быть использованы клиницистами при диагностике и лечении микобактериоза.

Результаты исследования выявления ДНК микобактерий туберкулеза методом ПЦР в реальном времени на поздних циклах амплификации, свидетельствующие о высокой вероятности наличия туберкулеза, особенно у лиц с первоначально диагностированными неспецифическими заболеваниями, могут быть востребованы клиницистами при диагностике заболеваний.

Сформирована региональная рабочая коллекция штаммов микобактерий с различными спектрами лекарственной устойчивости, которая может быть использована для создания тест-систем для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза с лекарственной устойчивостью, изучения механизмов развития резистентности к противотуберкулезным препаратам. Штаммы коллекции могут быть использованы для изучения вновь разрабатываемых лекарственных препаратов с антимикобактериальной активностью.

На основании проведенных исследований в Республике Марий Эл с 2015 года внедрен и в дальнейшем усовершенствован с учетом роста показателя выявления нетуберкулезных микобактерий оптимальный алгоритм диагностики туберкулеза и микобактериоза микробиологическими методами исследования (Акт внедрения от 17 января 2022г.).

Результаты проведенного исследования включены в программу практических занятий и лекций на кафедре биохимии, клеточной биологии и микробиологии ФГБОУ ВО «Марийский государственный университет» (Акт внедрения от 18 ноября 2021г.); используются в учебном процессе в отделении телемедицины и организации последипломного обучения ФГБНУ «ЦНИИТ» в цикле профессиональной переподготовки по специальности «Фтизиатрия» и «Пульмонология» по теме: «Клиника, диагностика и лечение туберкулеза в современных условиях», в цикле повышения квалификации (новые технологии) «Диагностика, лечение туберкулеза с МЛУ МБТ», цикле обучения на рабочем месте (новые технологии) «Микробиология туберкулеза» для врачей–фтизиатров, пульмонологов, врачей–бактериологов (Акт внедрения от 12.04.2022г.).

Методология и методы исследования

Для достижения цели и задач диссертационного исследования использован комплексный подход в применении методов исследования на большом объеме данных. Предметом исследования на микобактерии являлись образцы диагностического материала, полученные из медицинских учреждений нетуберкулезного профиля и профиля «фтизиатрия» муниципального и республиканского уровней Республики Марий Эл,

штаммы выделенных микобактерий. Объектом исследования являлись пациенты учреждений общей лечебной сети и противотуберкулезной сети Марий Эл. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (протокол № 7/7 от 28.10.2020г.).

Микроскопические исследования на микобактерии нативного диагностического материала с окраской по Цилю-Нильсену проводили сотрудники всех клинико-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений Республики Марий Эл. Осадки диагностического материала от пациентов амбулаторного и стационарных отделений противотуберкулезного диспансера Республики Марий Эл методом люминесцентной микроскопии, культуральные и молекулярно-генетические исследования по выявлению, идентификации микобактерий, тестированию микобактерий туберкулеза на лекарственную чувствительность проводили на базе бактериологической лаборатории (БЛ) государственного бюджетного учреждения Республики Марий Эл «Республиканский противотуберкулезный диспансер» (ГБУ РМЭ «РПТД»). Применяемые виды исследований регламентированы Приказом Минздрава РФ от 29.12.14 № 951.

Анализ результатов выявления микобактерий и тестирования на лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза проведен путем ретроспективного изучения лабораторной документации и данных лабораторной информационной системы, в базу которой занесены результаты анализов жителей республики, обследованных на микобактерии с начала 90-х годов 20 века.

Исследования по определению принадлежности микобактерий к генотипу Beijing проводили на базе бактериологической лаборатории Республиканского противотуберкулезного диспансера Марий Эл, к генетическим линиям non Beijing – в отделе микробиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (ФГБНУ «ЦНИИТ»).

Тестирование лекарственной чувствительности нетуберкулезных микобактерий проводили на базе микробиологической лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ФПИ» МЗ РФ).

Методы выявления микобактерий

Микроскопические методы. Методики проведения микроскопических исследований регламентированы Приказом Минздрава России от 21.03.2003 № 109.

Культуральные методы выявления микобактерий. Культуральные исследования на плотных питательных средах (ППС) – Левенштейна-Йенсена и Финна-II – проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109. С 2015 года в РМЭ диагностический материал (кроме крови и мочи) от пациентов с подозрением на ТБ исследовали культуральным методом в жидкой питательной среде (ЖС) Middlebrook 7H9 с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 в соответствии с Руководством по работе с системой ВАСТЕС MGIT 960.

Выявление МБТ методом ПЦР – РВ. Метод используется в БЛ ГБУ РМЭ «РПТД» с 2012г. с диагностической целью для пациентов из учреждений, кабинетов, стационаров противотуберкулезной службы. Также в БЛ проводятся скрининговые исследования методом ПЦР-РВ для учреждений нетуберкулезного профиля.

Выделение и определение ДНК МБТ из диагностического материала и культуры проводили комплектами реагентов «М–СОРБ–ТУБ», «Экспресс-Туб», «Амплитуб–РВ» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Для постановки реакции амплификации использовали приборы «CFX-96» («BioRad», США) и «АНК-32» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия).

Идентификация микобактерий

Родовую идентификацию культур микобактерий проводили в соответствии с Приказом МЗ РФ от 21.03.2003 № 109 и Руководством по работе с системой ВАСТЕС MGIT 960. При необходимости проводили исследование культуры методом ПЦР-РВ на наличие специфического фрагмента ДНК МБТ *IS6110*.

Для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий в БЛ ГБУ РМЭ «РПТД» использовали ДНК-стриповую технологию с применением наборов GenoTypeSM/AS (Hain Lifescience, Германия).

Методы тестирования ЛЧ/ЛУ микобактерий

Определение лекарственной чувствительности МБТ культуральными методами. ТЛЧ МБТ методом абсолютных концентраций проводили в соответствии с Приказом МЗ РФ от 21.03.2003г. № 109 к ПТП 1 ряда – стрептомицину (S), изониазиду (H), рифампицину (R), этамбутолу (E), а также к ПТП 2 ряда – канамицину (Km), капреомицину (Cm), офлоксацину (Ofl), этионамиду (Etio), ПАСКу (Pas) и циклосерину (Cs) в концентрациях, регламентированных данным документом.

ТЛЧ МБТ модифицированным методом пропорций в ЖС проводили в соответствии с Руководством по работе с системой ВАСТЕС MGIT 960 к ПТП 1-го и 2-го ряда в критических концентрациях, рекомендованными Российским обществом фтизиатров (РОФ), – S, H, R, E, пиразинамиду (Z), амикацину (Am), моксифлоксацину (Mox) (0,5 мкг/мл), левофлоксацину (Lfx) (1,5 мкг/мл).

Тестирование ДНК МБТ на выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью к H, R, фторхинолонам (Fq) в образцах ДНК МБТ, а также накопление специфических локусов генов, ассоциированных с устойчивостью, проводили наборами «Амплитуб-МЛУ-РВ», «Амплитуб-FQ-РВ», «Multi» и «Multi-FQ» (ООО «Синтол», Россия). Все реакции проводили согласно инструкциям производителя.

Тестирование чувствительности *M. intracellulare* и *M. avium* к антибактериальным препаратам проводили количественным методом двукратных серийных разведений с помощью тест-системы Sensititre SLOMYCO (TREK Diagnostic Systems Ltd., Великобритания). Для оценки результатов ТЛЧ МБТ использовали критерии минимальных ингибирующих концентраций (МИК), рекомендованные Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) США.

Определение генотипа микобактерий туберкулеза

Принадлежность к генотипу Beijing определяли методом ПЦР-РВ с использованием

набора реагентов «Амплитуб–Beijing» (ООО «Синтол», Россия), согласно инструкции производителя. Принадлежность МБТ к другим генетическим линиям определяли методом спוליготипирования набором реагентов «СПОЛИГО–БИОЧИП» (Биочип–ИМБ, Россия), согласно инструкции производителя. Результаты гибридизации регистрировали с помощью Комплекса универсального аппаратно-программного (УАПК) для анализа биологических микрочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006) с использованием программы «ImaGeWare»®. Идентификацию спוליгопрофилей проводили согласно международной базе данных SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe).

Статистическая обработка данных

Все полученные данные обработаны методами статистики с помощью программы Statgraphics Plus 5.0. Значимость различий между параметрами оценивали с помощью критериев Мак-Немара с поправкой Йетса ($p < 0,05$) и 95% доверительного интервала (ДИ).

Личное участие автора в получении результатов

Результаты культуральных и молекулярно-генетических исследований по выявлению микобактерий туберкулеза, их идентификации, тестированию на лекарственную чувствительность, изложенные в диссертации, получены при непосредственном участии автора. Лично автором проведена идентификация нетуберкулезных микобактерий до вида. Также автор провела исследования по определению принадлежности микобактерий туберкулеза к генотипу Beijing. Автором обобщены, сгруппированы и проанализированы данные результатов исследований по всем разделам диссертации, а также проведена статистическая обработка полученных данных. Исследования по определению принадлежности микобактерий туберкулеза к генетическим семействам, не принадлежащим к Beijing, получены совместно с Андреевской С.Н., ведущим научным сотрудником отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» на базе отдела и на базе бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «Республиканский противотуберкулезный диспансер». Результаты тестирования нетуберкулезных микобактерий на лекарственную чувствительность получены совместно с Поповым С. А. на базе лаборатории клинической микробиологии ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний " Минздрава РФ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. В Марий Эл высокий уровень лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза обусловлен ростом удельного веса больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью. Большинство штаммов с лекарственной устойчивостью принадлежат к семейству Beijing и имеют мутации в 531 кодоне гена *proB* с заменой Ser-Leu и в *katG315* с заменой Ser-Thr1.
2. Среди циркулирующих на территории Республики Марий Эл видов нетуберкулезных микобактерий преобладающим является *M.intracellulare*. Нетуберкулезные микобактерии выделялись как у лиц с установленным туберкулезом легких, так и у лиц с предварительно диагностированными неспецифическими заболеваниями органов дыхания.

3. На основании проведенных исследований оптимизирован алгоритм выявления микобактерий в Марий Эл, включающий применение метода ПЦР в реальном времени в качестве скринингового в медицинских учреждениях нетуберкулезного профиля.

Степень достоверности и апробация результатов

Все методики по выявлению, идентификации, тестированию лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза и нетуберкулезных микобактерий проводились с соблюдением нормативных документов, принятых в Российской Федерации, и инструкций производителей тест-систем. Исследования проводились с использованием современного сертифицированного и поверенного оборудования.

Достоверность результатов основана на больших объемах проведенных исследований, охватывающих все лечебные учреждения Республики Марий Эл. Результаты исследований обрабатывались с помощью статистических коэффициентов достоверности.

Работа выполнена в рамках тем НИР «Микробиологическая диагностика туберкулеза и инфекционный контроль в бактериологических лабораториях противотуберкулезных учреждений РФ», 2017-2018гг. № 0515-2016-0026, РК АААА–А16–11611150004–5; «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам», 2019-2021гг., №0515-2019-0015, РК АААА-А16-116032560092-3, выполняемых в отделе микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза».

Апробация диссертации состоялась на заседании отделов микробиологии, иммунологии, патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, отдела дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (протокол № 1 от 26 апреля 2022г.).

Основные результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на II, III, IV и V Российских конгрессах лабораторной медицины (2016–2019 гг.) и на заседаниях секции микробиологии и иммунологии туберкулеза Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (2018–2019 гг.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, 9 статей в других изданиях, 2 тезисов – в рецензируемых изданиях, 3 тезисов – в материалах конференций.

Структура и объем диссертации

Текст работы изложен на 177 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, пяти глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки, списка сокращений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 26 таблицами и 7 рисунками. Список литературы содержит 222 источника, из которых 151 – отечественные и 71 – зарубежные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Сравнительная характеристика эффективности методов выявления микобактерий туберкулеза в Республике Марий Эл

В РМЭ до 2015 года в учреждениях ОЛС для выявления больных ТБ максимально использовались микроскопический метод и, в отличие от других регионов РФ, широко применялся метод посева на ППС. С 2015г. в качестве скринингового для выявления больных ТБ в данных учреждениях стали использовать метод ПЦР-РВ вместо культурального.

Было установлено, что наибольшую эффективность выявления МБ у пациентов из ОЛС показал метод ПЦР-РВ (Таблица 1).

Таблица 1 – Эффективность выявления МБТ из мокроты у пациентов с подозрением на туберкулез, обследованных в учреждениях нетуберкулезного профиля

Метод	Микроскопия 2015-2018г.г.	Культуральный 2012-2014г.г.	ПЦР-РВ 2015-2018г.г.
Обследовано лиц	53240	24757	4005
из них с положительным результатом	251	518	205
Эффективность (%)	0,47	2,09	5,12

Достоверно чаще МБТ выявляли методом ПЦР-РВ по сравнению с культуральным на ППС у лиц с первоначальными диагнозами «пневмония» ($p < 0,002$) - 5,19% (71/1369) против 3,41% (256/7769), «подозрение на туберкулез» ($p < 0,001$) - 16,78% (96/572) и 2,38% (42/1765) и прочими неспецифическими заболеваниями органов дыхания ($p < 0,001$) - 3,39% (24/709) и 0,6% (10/1630) соответственно. При дообследовании у всех лиц с положительными посевами на ППС и положительными результатами ПЦР-РВ был диагностирован ТБ.

Выявляемость МБТ из различных видов диагностического материала показана в таблице 2.

Таблица 2 – Выявляемость МБ из различных видов диагностического материала при исследовании одного образца разными методами в 2015-2018 гг.

Методы	Вид диагностического материала									
	Мокрота (N=6816)		Моча (N=895)		Плевральный экссудат (N=442)		Операционный материал (N=260)		Промывные воды бронхов (N=162)	
	Число образцов с положительным результатом									
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
ПЦР-РВ	1437	21,08	25	2,79	66	14,93	238	91,54	25	15,43
Культуральные	1203	17,65	7	0,78	35	7,92	69	26,54	9	5,56
Микроскопия	737	10,81	1	0,11	11	2,49	212	81,54	6	3,70

Анализ параллельных результатов исследований показал достоверно более высокую эффективность выявления МБТ методом ПЦР-РВ для всех видов диагностического материала ($p = 0,007$ и меньше) (Таблица 2), что особенно ценно для олигобациллярных материалов. Стоит отметить сравнительно низкую эффективность культурального метода при исследовании операционного материала.

При сравнении результатов выявления МБТ в ЖС и на ППС было установлено, что достоверно выше ($p < 0,05$) высеваемость МБТ наблюдалась в ЖС – 18,32% (956/5218), чем на ППС - 15,56% (864/5218). В то же время, у впервые выявленных (в/в) больных ТБЛ незначительно преобладала выявляемость МБТ на ППС ($p > 0,05$) – 71,60% (711/993) против 67,78% (673/993) в ЖС. Объяснить это можно тем, что в первом случае анализировались результаты *высеваемости* МБТ, полученные из одного и того же образца, а во втором случае анализировалось выявление *бактериовыделителей* МБТ.

Полученные данные показали, что для максимально эффективного выявления МБТ необходимо использовать комплекс микробиологических методов.

Оценка достоверности результатов диагностики туберкулеза, полученных методом ПЦР в режиме реального времени на поздних циклах амплификации

Из 1168 лиц, имевших положительный результат теста ПЦР-РВ из мокроты в 2013-2018гг., в 332 (28,42%) случаях позитивный результат был получен на поздних циклах амплификации (35 и выше).

В 80,12% (266/332) этих случаев при дообследовании был диагностирован ТБ. Достоверно чаще ТБ подтверждался у лиц с подозрением на ТБ, при обследовании по поводу длительного кашля, при первоначально диагностированной пневмонии ($p < 0,001$) (Таблица 3). У 193 из 266 человек, что составляет $72,56\% \pm 5,55$ (ДИ 95%; 67,01%; 78,11%), в дальнейшем результат анализа ПЦР-РВ подтвердился культуральными методами. Характер мокроты не влиял на подтверждение диагноза туберкулеза, достоверных различий не выявлено ($> 0,05$).

Таблица 3 – Подтверждение диагноза туберкулез при дообследовании лиц с различными предварительными диагнозами и положительным результатом ПЦР-РВ, полученным на поздних циклах амплификации

Первоначальный диагноз при направлении на обследование методом ПЦР-РВ	Число лиц с положительным результатом ПЦР-РВ на поздних циклах		Из них в дальнейшем диагностирован ТБ	
	Абс.	%	Абс.	%
ХОБЛ	20	6,02	5	25,00
Пневмония	35	10,54	23	65,71
Контакт по ТБ	7	2,11	1	14,29
Обследование по поводу длительного кашля	63	18,98	42	66,67
Подозрение на ТБ	207	62,35	195	94,20
Всего	332	100	266	80,12

Довольно часто поздние циклы амплификации отмечались при исследовании промывных вод бронхов, плеврального экссудата и ликвора – 51,06% (24/47), 26,19% (22/84), 27,78% (5/18); при этом ТБ подтвердился у 75,0% (18/24) лиц, у 86,36% (19/22) и у 100% (5/5) лиц соответственно.

Таким образом, при получении положительных результатов ДНК МБТ на поздних циклах амплификации вероятность наличия у пациента ТБ в 20 раз выше, чем его отсутствие (ОШ=20,326; ДИ 95% 13,640-30,289). Исследования показали, что

положительные результаты теста ПЦР-РВ, получаемые на поздних пороговых циклах амплификации, целесообразно принимать во внимание при условии соблюдения всех требований для предотвращения контаминации.

Определение уровня и спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, выделенных на территории Республики Марий Эл

По итогам более чем 20 летнего периода мониторинга уровня ЛУ МБТ отмечается рост данного показателя среди всех контингентов больных ТБЛ, который обусловлен, в основном, увеличением уровня МЛУ МБТ (Рисунок 1).

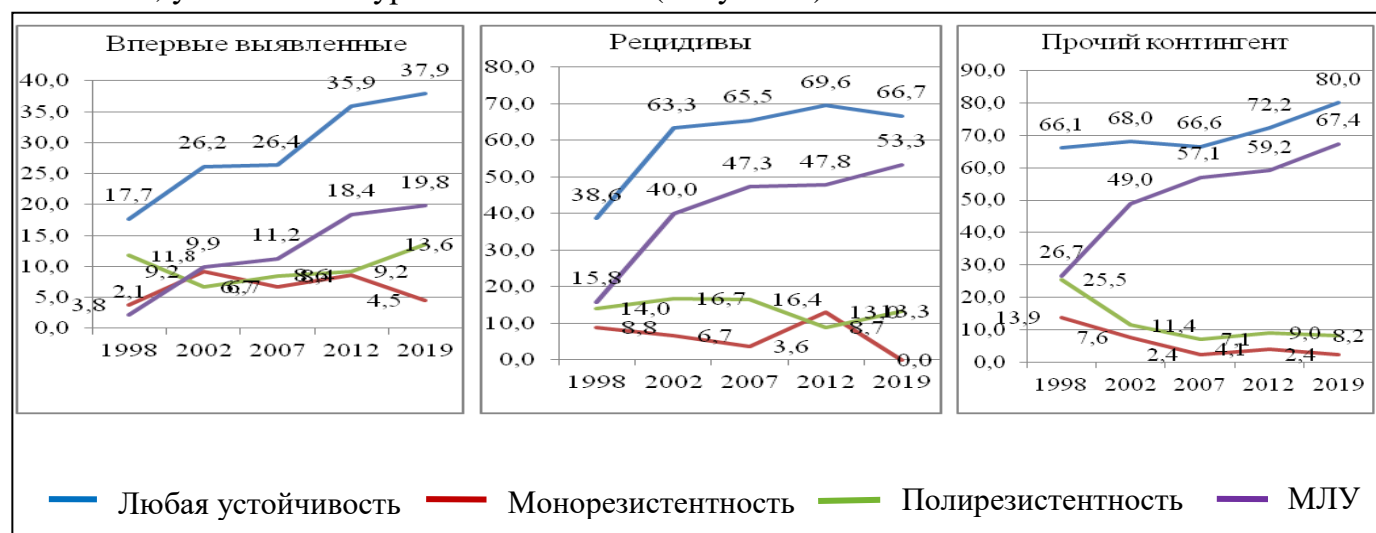


Рисунок 1 – Динамика уровней ЛУ МБТ для различных профилей резистентности у различных категорий больных ТБЛ (%)

Так, уровень МЛУ МБТ в 2019г. по сравнению с 1998г. среди в/в больных достоверно ($p < 0,001$) вырос в 9,4 раза, среди рецидивов в 3,4 раза ($p < 0,05$), среди прочего контингента в 2,6 раз ($p < 0,001$). Среди прочего контингента, в отличие от в/в больных ТБЛ и больных с рецидивами ТБЛ, уровни полирезистентности и монорезистентности достоверно снизились в 2019г. по сравнению с 1998г. ($p < 0,001$ и $p < 0,05$ соответственно).

За 10-летний период с 2010г. по 2019г. наблюдения уровень ЛУ МБТ в целом, как и спектр ЛУ, существенно не изменился у всех контингентов больных ТБЛ (Таблица 4).

Таблица 4 – Спектр ЛУ МБТ у разных контингентов больных ТБЛ

Показатели	Впервые выявленные		Рецидивы		Прочий контингент	
	2010 (N=326)	2019 (N=177)	2010 (N=58)	2019 (N=15)	2010 (N=218)	2019 (N=85)
	Абс./%	Абс./%	Абс./%	Абс./%	Абс./%	Абс./%
Любая устойчивость к ПТП	127/39,0	67/37,9	39/67,2	10/66,7	163/74,8	68/80,0
Монорезистентность	21/6,4	8/4,5	6/10,3	-/-	6/2,8	2/2,4
Полирезистентность	40/12,3	24/13,6	5/8,6	2/13,3	13/6,0	7/8,2
Всего Н+R + др. препарат	66/20,3	35/19,8	28/48,3	8/53,3	144/66,1	59/69,4

Среди всех контингентов больных с ЛУ наибольший удельный вес составляли лица с устойчивостью к HR с преобладающим спектром ЛУ к ПТП 1-го и 2-го ряда. Достоверно вырос уровень широкой ЛУ у прочего контингента больных – с 19,27% (42/218) в 2010г. до 38,82% (33/85) в 2019г. ($p < 0,001$). А также за данный период достоверно снизился уровень преШЛУ у этого контингента с 33,49% (73/218) до 21,18% (18/85) ($p = 0,05$). Рост

уровня ШЛУ МБТ среди прочего контингента коррелируется с достоверным ростом уровня устойчивости к офлоксацину с 33,95% (74/218) в 2010г. до 48,24% (41/85) в 2019г.

Таким образом, в РМЭ среди больных ТБЛ сформировалось значительное ядро лиц с устойчивостью к HR с широким спектром резистентности за счет прочего контингента лиц.

В РМЭ, также как и в большинстве регионов РФ и в странах СНГ, среди мутаций, ассоциированных с устойчивостью к H и R, из диагностического материала и культур МБТ у всех контингентов лиц с МЛУ и полирезистентностью отмечается, что в 2013–2019 гг. преобладающей, связанной с ЛУ к H, являлась мутация в гене *katG315* с заменой Ser–Thr1 – 94,6% (746/789), преобладающей, связанной с ЛУ к R – мутация в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu – 83,3% (490/588).

Достоверно чаще ($p < 0,05$) в РМЭ у всех контингентов больных ТБЛ с МЛУ образцы ДНК МБТ имели сочетание мутаций в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu и в *katG315* с заменой Ser-Thr1 – 63,64% (371/583), вторым по встречаемости, кроме больных с ТБ/ВИЧ, встречалось сочетание мутаций в гене *rpoB* 531 с заменой Ser-Leu с одновременными мутациями в генах в *katG315* (Ser–Thr1) и *inhA* C(-15)T (Таблица 5).

Таблица 5 – Спектр мутаций, ассоциированных с резистентностью к R и H, у больных ТБЛ с МЛУ в Республике Марий Эл (2013– 2019гг.) (%)

Гены и кодоны	Мутации	В/в (N=310)	Рецидивы (N=64)	Прочие (N=170)	ТБ/ВИЧ (N=39)	Всего (N=583)
<i>rpoB531; katG 315</i>	Ser-Leu; Ser-Thr1	64,2	68,8	63,5	51,3	63,6
<i>rpoB531; katG 315+inhA</i>	Ser-Leu; Ser-Thr1;C(-15)T	14,5	12,5	17,1	5,1	14,4
<i>rpoB 533; katG 315 +inhA</i>	Leu-Pro; Ser-Thr1;C(-15)T	2,3	1,6	2,9	5,1	2,6
<i>rpoB531; katG 315+inhA</i>	Ser-Leu; Ser-Thr1;T(-8)A/C	2,6	1,6	1,8	2,6	2,2
<i>rpoB531; katG 315</i>	Ser-Leu; Ser-Thr2	2,3	3,1		7,7	2,1
<i>rpoB 516; katG 315 +inhA</i>	Asp-Val; Ser-Thr1;C(-15)T	1,3	6,3	1,2	5,1	2,1
<i>rpoB 516; katG 315</i>	Asp-Val; Ser-Thr1	1,3	1,6	1,8	2,6	1,5
<i>rpoB 526; katG 315</i>	His-Tyr; Ser-Thr1	2,6			2,6	1,5
<i>rpoB 533; katG 315</i>	Leu-Pro; Ser-Thr1	1,0		2,4	5,1	1,5
Прочие	22 сочетания мутаций	8,1	4,7	9,4	12,8	8,4
Всего мутаций к изониазиду (абс.)		387	80	220	49	736
Всего мутаций к рифампицину (абс.)		310	64	171	40	585

Так же, как в РФ, в РМЭ среди образцов ДНК МБТ с МЛУ у всех контингентов больных наиболее часто встречались мутации в 94 кодоне гена *gyrA* – 68,97% (40/58), ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам, при этом наиболее часто отмечалась замена Asp-Gly – 55,0% (22/40). Второй по частоте встречаемости являлась мутация в гене *gyrA* 90 с заменой Ala-Val –20,7% (12/58).

При сопоставлении результатов тестирования ЛУ МБТ генотипическим и фенотипическими методами были получены следующие результаты: чувствительность и специфичность к H в ЖС в системе ВАСТЕС MIGT 960 при исследовании 706 культур МБТ составили 100% и 98,7% соответственно, к R – 97,8% и 100%, к S – 100% и 97,8%, к E – 100% и 95,0% относительно метода абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Чувствительность и специфичность метода ПЦР-РВ относительно метода абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена для 930 тестов к H составила 94,7% и 96,6% соответственно, к R – 94,0% и 98,0%. При этом расхождения результатов определения ЛУ отмечаются, главным образом, в тех случаях, когда отсутствуют мутации к H и R при наличии фенотипической устойчивости.

Из 19 образцов ДНК МБТ с мутациями к Fq у 18 (94,74%) штаммов МБТ выявлено совпадение генотипической и фенотипической устойчивости к OfI; только 1 штамм имел фенотипическую устойчивость к Mox; все 19 штаммов были фенотипически чувствительны к Lfx.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о необходимости применения метода ПЦР-РВ для быстрого получения результатов ЛУ МБТ, однако, в дальнейшем, при получении культуры МБТ, он должен быть продублирован одним из фенотипических методов ТЛЧ.

Изучение принадлежности к генетическому кластеру штаммов микобактерий туберкулеза, выделенных от различных групп больных туберкулезом

Было изучено 233 образца ДНК МБТ, полученных из диагностического материала и культур МБТ в 2017–2018 гг., из них 43 получены от больных с ТБ/ВИЧ.

Как и в большинстве регионов РФ среди всех контингентов лиц с ТБЛ, включая ТБ/ВИЧ, преобладали штаммы МБТ генетического семейства Beijing – 77,68% (181 из 233) (Рисунок 2).

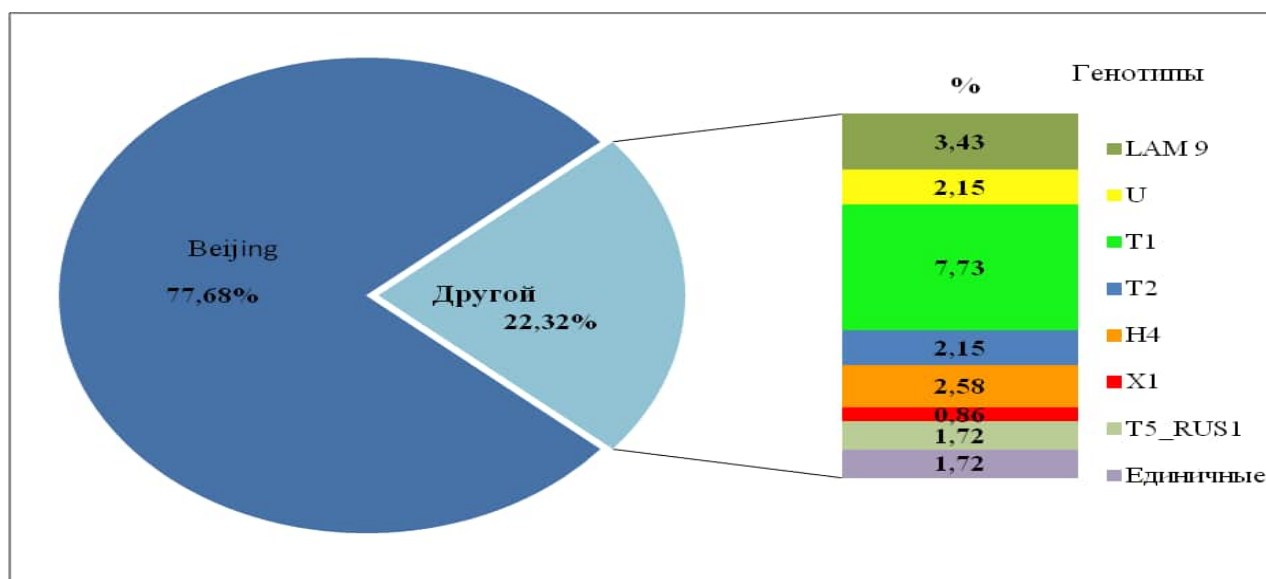


Рисунок 2 – Генотипы МБТ, циркулирующие на территории РМЭ (%)

Среди 52 штаммов *M. tuberculosis* nonBeijing выявлено 26 сполиготипов 11 генетических семейств. В РМЭ, в отличие от других регионов ПФО, установлено преобладание штаммов

группы Т – 44,23% (23/52), при этом генотип Т1 определялся в 34,62% (18/52) случаях. В группе Т преобладали штаммы сполиготипа SIT53 – 43,48% (10/23). Третьими по распространенности отмечены штаммы МБТ семейства LAM (Рисунок 2). Аналогичная распространенность генотипических кластеров МБТ была отмечена в Калининградской области, в приграничных районах Монголии и китайской провинции Хэбэй. Остальные обнаруженные генотипы (4 из 52) были представлены единичными изолятами МБТ.

Не выявлено достоверных различий во встречаемости генотипа Beijing среди штаммов МБТ с МЛУ и полирезистентных (ПР) ($\chi^2 = 1,48$; $p > 0,05$) – 86,99% (107 из 123) и 79,1% (53 из 67) соответственно. Однако, достоверно реже штаммы кластера Beijing встречались среди чувствительных МБТ – 48,84% (21 из 43). У ВИЧ-позитивных лиц штаммы семейства Beijing преобладали независимо от чувствительности/устойчивости МБТ.

Выявление нетуберкулезных микобактерий и изучение особенностей их популяции, циркулирующей в Республике Марий Эл

За период 2015–2019гг. в РМЭ было получено 395 культур НТМБ от 185 человек, из них 177 выделяли НТМБ из мокроты. Четыре пациента последовательно выделили 2 вида НТМБ. При сравнении бактериовыделения среди в/в больных ТБЛ и бактериовыделителей НТМБ, было выявлено, что в обеих группах преобладали мужчины – 829/1067 и 101/177 соответственно ($p < 0,001$); лица, выделявшие НТМБ, были значительно старше. Их максимальный возрастной диапазон составлял от 55 и старше – 58,19% (103/177), а у бактериовыделителей МБТ от 25 до 54 лет – 70,85% (756/1067). Среди выделенных культур НТМБ преобладали медленнорастущие, чаще однократно ($p < 0,001$) (Таблица 6).

Таблица 6 – Частота выделения различных видов НТМБ у пациентов в 2015–2019гг.

Вид НТМБ	Неоднократно		Однократно		Всего	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Быстрорастущие	8	14,55	30	22,39	38	20,11
<i>M.fortuitum</i>	3	5,45	13	9,7	16	8,47
<i>M.peregrinum</i>	1	1,82	4	2,99	5	2,65
<i>M.phlei</i>	1	1,82	-	-	1	0,53
<i>M.smegmatis</i>	-	-	2	1,49	2	1,06
<i>M.abscessus</i>	2	3,64	3	2,24	5	2,65
<i>M.chelonae</i>	1	1,82	8	5,97	9	4,76
Медленнорастущие	46	83,64	94	70,15	140	74,07
<i>M.intracellulare</i>	29	52,73	19	14,18	48	25,40
<i>M.avium</i>	12	21,82	19	14,18	31	16,40
<i>M.gordonae</i>	3	5,45	39	29,10	42	22,22
<i>M.kansasii</i>	2	3,64	2	1,49	4	2,12
<i>M.xenopi</i>	-	-	2	1,49	2	1,06
<i>M.scrofulaceum</i>	-	-	2	1,49	2	1,06
<i>M.celatum</i>	-	-	2	1,49	2	1,06
<i>M.genavense</i>	-	-	1	0,75	1	0,53

Продолжение таблицы 6

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<i>M.lentiflavum</i>	-	-	2	1,49	2	1,06
<i>M.shimoidei</i>	-	-	1	0,75	1	0,53
<i>M.simiae</i>	-	-	3	2,24	3	1,59
<i>M.malmoense</i>	-	-	1	0,75	1	0,53
<i>M.asiaticum</i>	-	-	1	0,75	1	0,53
Средняя скорость роста	-	-	2	1,49	2	1,06
<i>M.intermedium</i>	-	-	2	1,49	2	1,06
вид не определен	1	1,82	8	5,97	9	4,76
Итого	55	100	134	100	189	100

Также, как и в большинстве регионов РФ, среди лиц с медленно растущими НТМБ наиболее часто (при любой кратности) выделяли НТМБ комплекса МАС – 56,43%. При этом, в отличие от данных, имеющих в литературных источниках, в РМЭ преобладающим видом были *M.intracellulare*. Вторым по встречаемости видом НТМБ в РМЭ был *M.gordonae*, третьим – *M.avium* (Таблица 6). Среди лиц, выделявших НТМБ, 6 человек были ВИЧ инфицированы. Из них 4 человека неоднократно выделяли *M.avium*, и 2 – однократно *M.gordonae* и *M.intermedium*.

Наиболее часто НТМБ выделяли у лиц с неспецифическими заболеваниями респираторной системы – 50,83%, реже у лиц с подозрением на ТБЛ – 29,3% и в 19,89% случаев у лиц с установленным диагнозом ТБ и пролеченных от ТБ ранее. Среди лиц, обследованных по поводу ТБ, в 30,56% случаев НТМБ выявили одновременно с МБТ в интенсивную фазу лечения. Из 177 лиц, выделявших НТМБ, 47 (26,56%) человек были микроскопически позитивны. Таким образом, в алгоритме обследования на ТБ необходимо учитывать возрастающую вероятность выделения НТМБ.

Определение спектра лекарственной устойчивости нетуберкулезных микобактерий

Как наиболее часто выделяемые и вызывающие микобактериоз, 23 штамма вида *M.intracellulare* и 12 штаммов вида *M.avium* были протестированы на ЛЧ. Не было выявлено существенных различий МИК для штаммов *M.intracellulare* и *M.avium* в отношении следующих препаратов: Am, доксицилина (Dox), линезолида (Lzd), рифабутина (Rfb), S, ципрофлоксацина (Cip). Определена 100% чувствительность штаммов *M.intracellulare* к Am, кларитромицину (Cla), Rfb и 91,7%, 83,3% и 100,0% чувствительность штаммов *M.avium* к указанным ПТП соответственно. Не выявлено чувствительных штаммов обоих видов к Dox, Lzd, S, Cip.

Среди штаммов *M.intracellulare*, отмечено значительное число культур с промежуточной чувствительностью/устойчивостью к Mox – 73,9% и E – 56,5%.

Отмечено, что среди штаммов *M.intracellulare*, устойчивых к Cip, большинство (81,8%) ингибировалось концентрациями препарата $\geq 8,0$ мкг/мл, находящимися за пределами МИК, обозначенными CLSI.

Оптимизация регионального алгоритма выявления микобактерий

Проведенные исследования показали, что в условиях централизованной

специализированной БЛ все используемые методы являются взаимодополняющими, что позволяет оптимизировать алгоритм выявления МБ (Рисунок 3).

Одной из особенностей выявления МБ является централизация культуральных, молекулярно-генетических, а также микроскопических исследований с окраской флюорохромами на базе бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «РПТД».

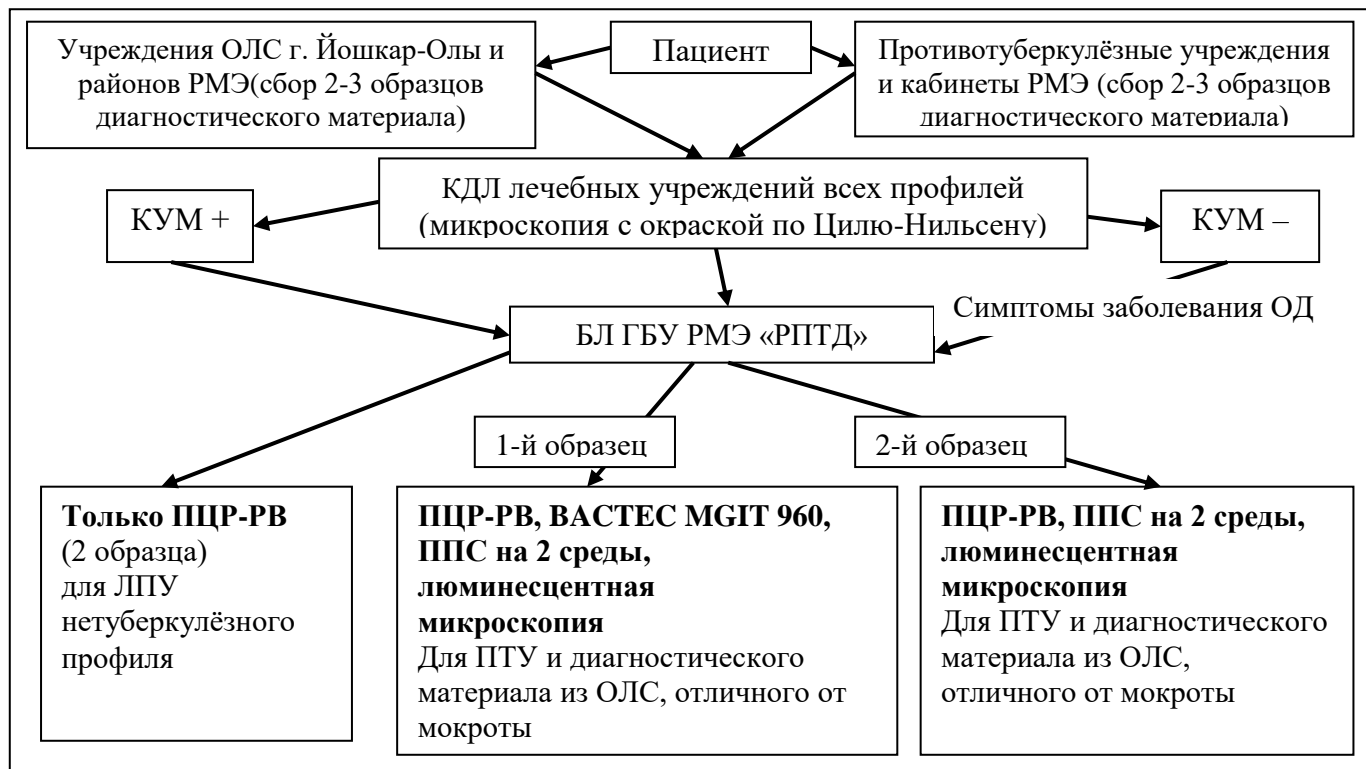


Рисунок 3 – Алгоритм обследования на наличие микобактерий, выполняемый с целью диагностики туберкулёза и микобактериоза в Республике Марий Эл

Согласно этому алгоритму, в лечебных учреждениях ОЛС основным методом, по-прежнему, остается метод микроскопии по Цилю-Нильсену. При отсутствии КУМ, но наличии у пациента клинико-рентгенологической симптоматики, характерной для заболеваний органов дыхания, пациенту проводится исследование диагностического материала, собранного в месте обращения за медицинской помощью, методом ПЦР-РВ на наличие маркеров ДНК МБТ на базе БЛ РПТД. Методом ПЦР-РВ на наличие ДНК МБТ в обязательном порядке обследуются лица с ХОБЛ и пневмонией.

Особенностью регионального алгоритма является скрининговое обследование кашляющих больных из учреждений ОЛС методом ПЦР-РВ в БЛ РПТД. Данный вид исследования в обязательном порядке проводится в ОЛС и при обнаружении КУМ микроскопическим методом, так как в РМЭ отмечается рост выявления НТМБ.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что при исследованиях на микобактерии туберкулеза с диагностической целью, наибольшую эффективность показал метод ПЦР в реальном времени ($p < 0,01$) в сравнении с культуральным и микроскопическим для всех видов диагностического материала – 20,89%, 15,43% и 11,28% соответственно. Выявляемость микобактерий

туберкулеза методом ПЦР в реальном времени у лиц с первоначальным диагнозом «пневмония» составила 5,19%, культуральным – 3,41%; «подозрение на туберкулез» – 16,78% и 2,38%; обследованных по поводу длительного кашля – 3,39% и 0,6% соответственно.

2. Среди положительных тестов ПЦР в реальном времени по обнаружению ДНК микобактерий туберкулеза, в 28,42% случаев результат зарегистрирован на поздних циклах амплификации. У 80,12% пациентов при дообследовании был диагностирован туберкулез. При этом у лиц с первоначально диагностированной пневмонией туберкулез установлен в 65,71% случаев, у лиц, обследованных по поводу длительного кашля – в 66,67%, у лиц с подозрением на туберкулез – в 94,20%.

3. В Республике Марий Эл за период с 1998г. по 2019г. отмечен достоверный рост уровня лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в 1,2 раза ($p=0,008$), в основном за счет увеличения в 2,5 раза показателя множественной лекарственной устойчивости среди всех категорий больных туберкулезом ($p<0,001$). Среди популяции штаммов микобактерий туберкулеза с генотипической устойчивостью к рифампицину, циркулирующих на территории, в 83,33% штаммов установлено преобладание мутаций в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu; среди штаммов с генотипической устойчивостью к изониазиду в 92,52% штаммов установлено преобладание мутаций в 315 кодоне гена *katG* с заменой Ser-Thr1. Среди штаммов МБТ с генотипической устойчивостью к фторхинолонам в 68,97% случаев доминировали штаммы с мутацией в 94 кодоне гена *gyrA*, среди них с заменой Asp-Gly в 55,0% случаев.

4. В результате проведенных исследований установлено преобладание штаммов микобактерий туберкулеза генетического семейства Beijing – 77,68%. Из других семейств наиболее часто определялись штаммы микобактерий группы T – 9,87% с превалированием сполиготипа SIT53 генотипа T1 (43,48%); семейства LAM 9 – 3,43%. Остальные семейства представлены единичными штаммами.

5. Среди нетуберкулезных микобактерий превалировали медленно растущие (74,07%), представленные 13-ю видами. Преобладающими видами являлись *M.intracellulare* (25,40%), *M.gordoniae* (22,22%), *M.avium* (16,40%). Наиболее часто нетуберкулезные микобактерии выделялись у лиц с неспецифическими заболеваниями респираторной системы – 50,83%, реже у лиц с подозрением на туберкулез легких – 29,28% и в 19,89% случаев у лиц с установленным туберкулезом и пролеченных от туберкулеза ранее.

6. Установлено, что к амикацину, кларитромицину, рифабутину чувствительны 100% штаммов *M.intracellulare* и 91,7%, 83,3% и 100,0% штаммов *M.avium*. Не зарегистрировано чувствительных штаммов обоих видов к доксициклину, линезолиду, стрептомицину, ципрофлоксацину.

7. Оптимизирован региональный алгоритм микробиологической диагностики туберкулеза и микобактериоза. Особенностью предложенного алгоритма является обследование больных с изменениями на рентгенограмме легких, с длительным кашлем неуточненной этиологии, с клинической симптоматикой, характерной для заболеваний органов дыхания, больных с пневмонией и хронической обструктивной болезнью легких,

независимо от результатов микроскопического исследования, из учреждений нетуберкулезного профиля методом ПЦР в реальном времени.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В целях повышения эффективности выявления туберкулеза и микобактериоза рекомендуется использовать предложенный алгоритм всеми лечебными учреждениями Республики Марий Эл.
2. На основании полученных данных по уровню совпадения генотипической и фенотипической устойчивости микобактерий туберкулеза к офлоксацину при наличии генотипической устойчивости к фторхинолонам, предлагается исключить из рутинных исследований тестирование лекарственной чувствительности к офлоксацину на плотных питательных средах.
3. Полученные данные о свойствах популяции возбудителя туберкулёза могут быть использованы для разработки комплекса дополнительных мер по предупреждению распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью на территории республики.
4. Результаты исследований по обнаружению микобактерий туберкулеза на поздних циклах амплификации методом ПЦР в реальном времени могут быть использованы клиницистами для выбора методов дообследования, тактики дальнейшего наблюдения для данной категории пациентов.
5. На основании полученных результатов по выявлению нетуберкулезных микобактерий, учреждениям общей лечебной сети Марий Эл предлагается использовать культуральные методы выявления микобактерий при отрицательных результатах ПЦР исследований на микобактерии туберкулеза и наличии клинико-рентгенологической симптоматики, подозрительной на туберкулез.
6. Результаты тестирования на лекарственную чувствительность/устойчивость *M.intracellulare* и *M.avium* могут быть рекомендованы лечащим врачам лечебно-профилактических учреждений Республики Марий Эл для использования в схемах лечения микобактериоза, вызванного данными видами микобактерий.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Учитывая высокий уровень множественной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза среди всех контингентов больных туберкулезом легких, а также расширение спектра лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам, необходимо провести тестирование и мониторинг лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к новым резервным препаратам с целью их эффективного применения.
2. Учитывая рост выделения нетуберкулезных микобактерий, целесообразно изучить их территориальную распространенность в Республике Марий Эл.
3. Необходимо выявить и изучить факторы, способствующие инфицированию жителей республики нетуберкулезными микобактериями, а также установить связь с источниками

заболевания микобактериозом с применением современных молекулярно-генетических методов, в частности, полногеномного секвенирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Петрова, Л. В. Мониторинг лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Республике Марий Эл / Э. В. Севастьянова, Л. В. Петрова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 9. – С. 13-16.
2. Петрова, Л.В. Разработка критериев оценки качества и эффективности микробиологических исследований в учреждениях противотуберкулезной службы и общей лечебной сети / Э. В. Севастьянова, О. А. Иртуганова, Л. В. Петрова, В. И. Голышевская // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – Т. 86, № 3. – С. 55-60.
3. Петрова, Л.В. Оценка эффективности микроскопического выявления туберкулеза в Республике Марий Эл /Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова // Актуальные проблемы и перспективы развития противотуберкулезной службы в Российской Федерации: I Конгресс Национальной Ассоциации фтизиатров, 18–20 октября 2012г., г.Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 203-204.
4. Петрова, Л.В. Выделение нетуберкулезных микобактерий у больных разных категорий / Л. В. Петрова, Т. М. Родионова, В. А. Пузанов // Клиническая лабораторная диагностика, Второй российский конгресс лабораторной медицины, Дни лабораторной медицины России, 12–14 октября 2016 г., г. Москва. – Москва, 2016. – Т. 61. – С. 635.
5. Petrova, L. V. Comparative Characteristic of Cases of Mycobacteriosis and Tuberculosis among HIV-Infected Patients / I. V. Petrov, M. O. Novikova, A. A. Almukhametov, L. V. Petrova, F. S. Petrova // Helix. – 2017. – Vol. 8 (1). – Pp. 2988-2991.
6. **Петрова, Л.В. Выявление нетуберкулёзных микобактерий в Республике Марий Эл / Л. В. Петрова, Е. И. Мельникова, Ю. А. Соловьев, Е. Е. Ларионова, Э. В. Севастьянова // Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96 (2). – С.41-46.**
7. Петрова, Л.В. Мониторинг распространения лекарственной резистентности микобактерий туберкулеза в Республике Марий Эл / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова // Актуальные проблемы туберкулеза: VII межрегиональная научно-практическая и учебно-методическая конференция с международным участием, 16 марта 2018 г., г. Тверь. – Тверь, 2018. – С. 73-78.
8. **Петрова, Л. В. Анализ показателей лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза в Республике Марий Эл за 2007-2017 гг. / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова, А. Э. Эргешов // Уральский медицинский журнал. – 2018. – № 8 (163). – С. 79-82.**
9. Петрова, Л. В. Оценка эффективности различных методов выявления микобактерий туберкулеза в Республике Марий Эл / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова // Лабораторная служба, IV Российский конгресс лабораторной медицины, 3–5 октября 2018 г., г. Москва. – Москва, 2018. – Т. 7 (3). – С. 29-30.
10. **Петрова, Л. В. Влияние применения в диагностическом алгоритме метода ПЦР в реальном времени на эффективность лечения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова, А. М.**

Васильева, Е. А. Куклина, Ю. А. Соловьев, Л. Н. Черноусова // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97, № 9. – С.40-44.

11. Петрова, Л. В. Эффективность использования отечественной технологии ПЦР в реальном времени для диагностики и лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза в Республике Марий Эл / Е. А. Куклина, Л. В. Петрова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза, Конференция молодых ученых ФГБНУ «ЦНИИТ», 21–22 марта 2019г., г. Москва. – Москва, 2019. – № S1. – С. 68-69.

12. Петрова, Л. В. Микобактериоз среди иммунокомпрометированных пациентов (на примере ВИЧ-инфекции) / И. В. Петров, Т. Х. Амирова, Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова, Ф. С. Петрова, С. И. Рассказова // Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции, Международная научно-практическая конференция, 10–11 июня 2019г., г. Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 329-330.

13. Петрова, Л. В. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в Республике Марий Эл / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова, Е. Е. Ларионова, И. В. Петров, Л. Н. Черноусова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза, Межрегиональная научно-практическая конференция, Туберкулезная инфекция – актуальные вопросы и пути их решения (4-е Ерохинские чтения), 24 мая 2019г., г. Саратов. – Саратов, 2019. – № S2. – С.58-60.

14. **Петрова, Л. В. Микробиологические и эпидемиологические особенности микобактериозов / И. В. Петров, Т. Х. Амирова, Л. В. Петрова, Ф. С. Петрова, Э. В. Севастьянова, Р. И. Валиев // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2020. – № 3 (19). С. 89-94.**

15. Петрова, Л. В. Мутации, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, у штаммов *M. tuberculosis* линии beijing, выделенных в республике Марий Эл / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова, С. Н. Андреевская, Л. Н. Черноусова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза, Межрегиональная научно-практическая конференция, Фундаментальные и прикладные научные исследования в современной фтизиатрии в условиях пандемии COVID-19 (5-е Ерохинские чтения), 5–6 ноября 2020 г., г. Москва. – Москва, 2020. – №S2. – С. 78-79.

16. Петрова, Л. В. Микобактериоз: обзор доказанных клинических проявлений у человека / Ф. С. Петрова, И. В. Петров, Т. Х. Амирова, Л. В. Петрова // Вестник Авиценны (Паеми Сино). – 2020.– №3(22). – С.484-490.

17. **Петрова, Л. В. Проблемы лабораторной диагностики и идентификации видов микобактерий / В. Х.Фазылов, И. В. Петров, Л. В. Петрова, Ф. С. Петрова, Т. Х. Амирова // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2021. – Т. 10, № 3(38). – С. 118-126.**

18. Петрова, Л. В. Эффективность различных методов выявления микобактерий в Республике Марий Эл / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова, С. Н. Андреевская, Л. Н. Черноусова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2021. – № 2. – С. 41-48.

19. Петрова, Л. В. Оценка достоверности положительных результатов диагностики туберкулеза, полученных методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени на поздних циклах амплификации / Л. В. Петрова, Э. В. Севастьянова, Т. Г. Смирнова, Л. Н. Черноусова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2022. – №1. – С.29-35.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ОЛС – общая лечебная сеть

ОШ – отношение шансов

СНГ – Содружество Независимых Государств

ТЛЧ – тестирование на лекарственную чувствительность

Fq – фторхинолоны

CLSI –Clinical and Laboratory Standards Institute – Институт по клиническим и лабораторным стандартам, США