

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

На правах рукописи

Петрова Людмила Витальевна

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

1.5.11 – микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
кандидат медицинских наук  
Смирнова Татьяна Геннадьевна

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
Актуальность темы исследования .....	5
Степень разработанности темы исследования .....	7
Цель исследования .....	9
Задачи исследования: .....	9
Научная новизна исследования .....	10
Теоретическая и практическая значимость работы .....	11
Методология и методы исследования .....	13
Методы выявления микобактерий .....	14
Идентификация микобактерий .....	18
Методы тестирования лекарственной чувствительности/устойчивости микобактерий .....	22
Определение генотипа микобактерий туберкулеза .....	26
Статистическая обработка данных .....	27
Личный вклад автора в получение результатов .....	27
Основные положения диссертации, выносимые на защиту .....	28
Степень достоверности и апробация результатов .....	28
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	30
1.1. Выявление микобактерий .....	30
1.1.1. Выявление и диагностика туберкулеза в медицинских учреждениях различного профиля .....	30
1.1.2. Сравнительная характеристика методов выявления микобактерий .....	32
1.1.3. Алгоритмы обследования больных по выявлению микобактерий .....	37
1.2. Лекарственная устойчивость <i>M.tuberculosis</i> .....	38
1.2.1. Лекарственно-устойчивый туберкулез в XXI веке .....	38
1.2.2. Сопоставление методов тестирования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза .....	43
1.2.3. Распространенность мутаций, связанных с устойчивостью .....	49
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам ....	49

1.2.4. Распространенность генотипов микобактерий туберкулеза в мире и Российской Федерации.....	51
1.3. Нетуберкулезные микобактерии .....	53
1.3.1. Эпидемиологические аспекты.....	53
1.3.2. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий и распространенность микобактериоза в мире и Российской Федерации .....	55
1.3.3. Лекарственная устойчивость нетуберкулезных микобактерий .....	57
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	61
ГЛАВА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ .....	61
2.1. Оценка эффективности первичного выявления <i>M.tuberculosis</i> различными методами у лиц, обследуемых в учреждениях нетуберкулезного профиля .....	61
2.2. Эффективность выявления микобактерий туберкулеза по данным специализированной бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «Республиканский противотуберкулезный диспансер» .....	64
2.3. Оценка достоверности результатов диагностики туберкулеза, полученных методом ПЦР в режиме реального времени на поздних циклах амплификации .....	68
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ И СПЕКТРА ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ МАРИЙ ЭЛ.....	76
3.1. Ретроспективный анализ динамики уровня распространенности и структуры лекарственной устойчивости <i>M.tuberculosis</i> , выделенных в Республике Марий Эл на протяжении 20 лет исследования у различных групп больных туберкулезом .....	77
3.2. Тестирование развернутого спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, циркулирующих на территории Республики Марий Эл, фенотипическими методами .....	80

3.3. Определение спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам у штаммов <i>M.tuberculosis</i> , выделенных в Республике Марий Эл.....	86
3.4. Изучение принадлежности к генетическому кластеру штаммов микобактерий туберкулеза, выделенных от различных групп больных туберкулезом .....	93
3.5. Сопоставление результатов тестирования лекарственной устойчивости <i>M.tuberculosis</i> генотипическим и фенотипическими методами и анализ целесообразности включения их в региональный диагностический алгоритм...	96
ГЛАВА 4. ВЫЯВЛЕНИЕ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИХ ПОПУЛЯЦИИ, ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ.....	101
4.1. Выделение нетуберкулезных микобактерий и анализ результатов их идентификации .....	101
4.2. Определение спектра лекарственной устойчивости нетуберкулезных микобактерий.....	107
ГЛАВА 5. ОПТИМИЗАЦИЯ РЕГИОНАЛЬНОГО АЛГОРИТМА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ .....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	118
ВЫВОДЫ .....	137
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	139
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ .....	140
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	141
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Несмотря на снижение показателей заболеваемости и смертности, в РФ сохраняется напряженная эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу (ТБ), обусловленная как ростом лекарственно-устойчивого туберкулеза, особенно – распространённостью штаммов микобактерий туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, утяжелением форм туберкулеза, так и достаточно высоким числом больных с сочетанной инфекцией ВИЧ-туберкулез [10]. В Республике Марий Эл также отмечается снижение показателя заболеваемости туберкулёзом. В 2017 г. заболеваемость постоянных жителей республики составила 50,5 на 100 тыс. населения, в 2019 г. – 39,5 на 100 тыс. населения, в 2021 г. – 25,0 на 100 тыс. населения, что на 7,1 % ниже показателя в 2021 г. по России, (26,9 на 100 тыс.) [10]. Тем не менее, в Марий Эл показатель выявления туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью среди бактериовыделителей держится на высоком уровне: в 2018 г. данный показатель составлял 20,7%, в 2019г. – 19,8%, в 2021г. 21,6% (темп прироста показателя в 2021 г. по сравнению с 2019 г. составил 9%) [83]. Стоит отметить, что в Марий Эл количество ежегодно выявляемых больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией невысокое и поэтому не оказывает существенного влияния на статистические показатели. Так, в 2017 г. доля больных с ВИЧ-инфекцией среди впервые выявленных больных туберкулезом составляла 6,0%, в 2019 г. – 7,0%, в 2021 г. – 6,5% [83].

В связи с вышеизложенным, для прогнозирования тенденции дальнейшего развития эпидемиологической ситуации по туберкулезу в Республике Марий Эл необходимо в динамике проанализировать показатели уровня лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза для различных групп больных, а также оценить изменения профилей резистентности штаммов микобактерий туберкулеза, циркулирующих на территории Марий Эл, с изучением спектра мутаций, ассоциированных с резистентностью к основным противотуберкулезным

препаратам.

Не менее важно изучение генотипов штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), циркулирующих на территории Республики Марий Эл (РМЭ), так как имеется связь вирулентности, а также трансмиссивности и распространенности лекарственной устойчивости возбудителя с принадлежностью к генетическому семейству [9,112,113]. Указанное исследование актуально и для больных с ко-инфекцией ВИЧ-туберкулез. В Марий Эл практически отсутствует информация о частоте и характере формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, выделяемых от больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией, и о принадлежности этих штаммов к генетическим группам, изучение этих вопросов является важным, в том числе для определения тактики ведения таких больных.

В последние годы в Республике Марий Эл, наряду со снижением заболеваемости туберкулезом, растет число лиц, выделяющих нетуберкулезные микобактерии (НТМБ), что, по-видимому, обусловлено, как с совершенствованием методов лабораторных исследований, так и с увеличением числа иммунодефицитных состояний у больных. В этой связи, проблема диагностики микобактериоза становится всё более актуальной.

Следует отметить, что распространенность нетуберкулезных микобактерий на территории Российской Федерации малоизучена [12,53,61,95]. Кроме того, врачи-фтизиатры не всегда имеют достаточного опыта в постановке правильного диагноза, и назначении адекватного лечения, особенно в тех случаях, когда нетуберкулезные микобактерии выделяют больные с установленным ранее диагнозом «туберкулез» [22,24,61,77,90]. Это обстоятельство приводит к тому, что не всем больным микобактериозом устанавливают этот диагноз, даже в случаях неоднократного выделения пациентами культур микобактерий, не относящихся к комплексу туберкулезных, а эффективное лечение таких больных затруднено. Для повышения эффективности диагностики и лечения больных микобактериозом представляется актуальным изучить региональные особенности популяции нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в Марий Эл, оценить видовое разнообразие и частоту выделения у обследуемых пациентов, определить спектр

лекарственной устойчивости у наиболее часто встречающихся видов.

С учетом высокого уровня лекарственно-устойчивого туберкулеза, ростом числа выделяемых штаммов нетуберкулезных микобактерий, а также централизации исследований, назрела необходимость оценить эффективность используемого в Марий Эл на разных этапах диагностики комплекса микробиологических методов. На основании полученных результатов актуально оптимизировать алгоритм исследований для выявления, диагностики и дифференциальной диагностики микобактерий с учетом региональных особенностей. Оптимизация алгоритма микробиологической диагностики позволит выявлять бактериовыделителей на более ранних сроках, что будет способствовать снижению трансмиссии микобактерий туберкулеза, повышению эффективности лечения и улучшению эпидемиологической ситуации в Республике Марий Эл.

### **Степень разработанности темы исследования**

В литературных источниках имеется достаточное количество данных по сравнению методов выявления микобактерий туберкулеза, однако очень мало публикаций по выявлению бактериовыделителей среди пациентов с первоначально диагностированными неспецифическими заболеваниями органов дыхания [6,8,11,17,23,25,86,91,92,94,99,100,146,154]. В основном в Российской Федерации обследование пациентов в учреждениях нетуберкулезного профиля проводится микроскопическим методом, что малоэффективно [82,84,153,165,213]. Широкое внедрение в качестве скринингового метода выявления микобактерий туберкулеза в учреждениях общей лечебной сети ПЦР в реальном времени (ПЦР–РВ) показывает большую результативность по сравнению с микроскопическим [206]. 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. Данных по выявлению больных туберкулезом с

различным предварительным диагнозом в учреждениях общей лечебной сети (ОЛС) крайне мало [8,17,25,41,86,99,100,145].

Нередко при исследовании диагностического материала методом ПЦР в реальном времени встает вопрос об интерпретации положительных результатов, полученных на поздних циклах амплификации: действительно ли обнаружена истинная ДНК микобактерий туберкулеза или произошла контаминация на лабораторном преаналитическом этапе. Данных по исследованиям на эту тему в литературных источниках не найдено.

Как в мире, так и Российской Федерации достаточно много публикаций по сравнению результатов тестирования лекарственной чувствительности (ТЛЧ) микобактерий туберкулеза, полученных различными методами исследования. Но в основном анализ данных проводился в отношении пациентов конкретных медицинских учреждений, а не региона в целом и без учета категории больного туберкулезом [64,98,114,123,141,149,150,167,172,197].

В ряде субъектов Российской Федерации, в том числе входящих в Приволжский Федеральный округ, куда относится и Республика Марий Эл, проводились исследования по выявлению мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, а также исследования по изучению генотипических линий популяций микобактерий туберкулеза, циркулирующих в регионах [5,20,21,40,55,65,71,118,122]. В Республике Марий Эл такие исследования ранее не проводились.

В литературных источниках сравнительно мало данных о популяциях нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в регионах Российской Федерации [2,52,56,68,77,78]. Данных по изучению штаммов нетуберкулезных микобактерий, выделенных в Республике Марий Эл, до настоящего исследования не было.

Таким образом, является крайне актуальным изучить свойства микобактерий, циркулирующих на территории Республики Марий Эл, применение различных методов для их обнаружения, особенно в учреждениях нетуберкулезного профиля.



## **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.

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[84].

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 по 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**

Для выявления и изучения биологических свойств микобактерий туберкулеза в Республике Марий Эл применяли микроскопические, культуральные и молекулярно-генетические методы исследований.

#### *Микроскопические методы*

Микроскопические исследования с окраской по Цилю-Нильсену проводили

из нативной мокроты, для обесцвечивания практически во всех клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) использовался 3% солянокислый спирт [82].

Методом люминесцентной микроскопии исследовали осадки, полученные после деконтаминации и гомогенизации диагностического материала с дальнейшим центрифугированием и нейтрализацией, которые одновременно использовали для культуральной диагностики. Окрашивание препаратов проводили смесью флуорохромных красителей аурамина О (Sigma-Aldrich, США) и родамина В (Carl Roth GmbH & Co.KG, Германия), обесцвечивание проводили 3% солянокислым спиртом, гашение фона – метиленовым синим [82].

#### *Культуральный метод на плотных питательных средах (ППС)*

Культуральные исследования на плотных питательных средах проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109 [82]. Если одновременно проводили посев в жидкую питательную среду или ПЦР исследование, то для предпосевной обработки использовался реагент BBL MycoPrep («Becton Dickinson and Company», США), содержащий NALC в сочетании с 2 % NaOH. Если проводилось исследование диагностического материала только на плотных питательных средах, то диагностический материал в соотношении 1:1 гомогенизировали и деконтаминировали с помощью 10% раствора трехзамещенного фосфорнокислого натрия [82]. Далее, после 18–20 часов инкубации при 37° С, после центрифугирования и удаления супернатанта, проводили отмывку стерильной дистиллированной водой. Затем осадок (по 0,2 – 0,3 мл) инокулировали в две пробирки с плотными яичными средами: Левенштейна–Йенсена (солевая основа HiMedia Laboratories, Индия) и Финна-П лабораторного приготовления [82]. Первые 2–3 суток пробирки в термостате при 37° С размещали в наклонном положении, затем переводили в вертикальное. Далее посеvy с еженедельным просмотром инкубировали 12 недель. Пробирки с ростом культуры отбирали для дальнейшей идентификации микроорганизмов. Количественную оценку роста микобактерий проводили в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109 [82]. Чаще всего рост

кислотоустойчивых микобактерий появлялся через 3–4 недели. Отрицательный результат выдавали после 12 недель культивирования.

*Культуральный метод с использованием жидкой питательной среды (ЖС)*

С 2015 года диагностический материал (кроме крови и мочи) от пациентов с подозрением на туберкулез исследовали культуральным методом в жидкой среде Middlebrook 7H9 с помощью автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США). Посев в жидкую среду, как правило, проводили однократно. Исследование проводили в соответствии с протоколом производителя [210].

Гомогенизацию и деконтаминацию диагностического материала проводили реагентом BBL MycoPrep («Becton Dickinson and Company», США). После 15 минут обработки данным реагентом с периодическим перемешиванием, в центрифужную пробирку добавляли охлажденный раствор фосфатного буфера до метки 50 мл. Далее проводили центрифугирование, удаление супернатанта и ресуспендирование осадка. Посев осадка (0,5 мл) производили в предварительно подготовленную пробирку MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) («Becton Dickinson and Company», США). Для этого в пробирку с жидкой средой вносили обогатительную добавку BACTEC MGIT Growth Supplement OADC с комплексом антибактериальных препаратов PANTA («Becton Dickinson and Company», США) [210]. Одновременно готовили мазок для микроскопического исследования производили посев осадка на две плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финна II. Кроме того, при исследовании диагностического материала методом ПЦР в реальном времени из этого же осадка, в первую очередь, до посева отбирали аликвоту для этого метода.

Далее засеянные пробирки помещали в автоматизированную систему BACTEC MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США). Среднее время получения положительных результатов посевов составило 14 дней 8 часов. Отрицательные результаты выдавали после 42 дней инкубации.

*Полимеразно-цепная реакция в реальном времени*

Методом ПЦР в реальном времени на базе бактериологической лаборатории



Республиканского противотуберкулезного диспансера проводили исследования с диагностической целью для пациентов из учреждений, кабинетов, стационаров противотуберкулезной службы, а также скрининговые исследования длительно кашляющих пациентов и лиц с подозрением на туберкулез из учреждений нетуберкулезного профиля.

При направлении в бактериологическую лабораторию Республиканского противотуберкулезного диспансера диагностического материала из нетуберкулезных учреждений, как правило, кроме ПЦР в реальном времени другие методы микробиологической диагностики не проводили. Если материал поступал из учреждений туберкулезного профиля, то наряду с методом ПЦР в реальном времени из одного образца проводили культуральные исследования и микроскопические люминесцентным методом.

Для выделения ДНК микобактерий туберкулеза ручным методом из диагностического материала в бактериологической лаборатории Республиканского противотуберкулезного диспансера применяли комплект реагентов «М-СОРБ-ТУБ» (ООО «Синтол», Россия), для выделения ДНК микобактерий туберкулеза из культур использовали набор «Экспресс-Туб» (ООО «Синтол», Россия). Для выделения ДНК микобактерий с использованием автоматизированной станции для выделения нуклеиновых кислот «Freedom EVO4», (TECAN, Швейцария) применяли набор «М-Сорб-Туб□Автомат» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Обнаружение и определение ДНК микобактерий туберкулезного комплекса проводили с применением наборов реагентов «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия). Для постановки реакции амплификации использовали приборы «CFX-96» («BioRad», США) и «АНК-32» (ИАП РАН, г.Санкт-Петербург, Россия).

Перед началом выделения ДНК проводили предварительную обработку образцов в соотношении 1:1 реагентом «Амплитуб-Преп» (ООО «Синтол», Россия) с инкубацией не менее часа. При исследовании образцов только методом ПЦР в реальном времени, реагент добавляли непосредственно к нативному

диагностическому материалу, при одновременном культуральном исследовании – к деконтаминированному осадку в соответствии с инструкцией производителя.

При выделении ДНК с целью контроля контаминации на каждые 5 образцов диагностического материала ставили 1 отрицательный контроль (ОКО-В). В соответствии с инструкцией производителя процедура выделения ДНК включала следующие этапы: лизис, сорбцию, осаждение ДНК, двойную промывку ДНК, десорбцию ДНК. Далее, в этот же день проводили определение ДНК микобактерий туберкулеза. Учет результатов проводили в соответствии с инструкцией производителя.

### **Идентификация микобактерий**

#### *Родовая идентификация микобактерий*

Выделенные культуры идентифицировали как на принадлежность к кислотоустойчивым бактериям, так и на принадлежность к комплексу *M.tuberculosis* [60,82]. Подозрительные на нетуберкулезные микобактерии микроорганизмы в дальнейшем идентифицировали до вида.

Так как на базе бактериологической лаборатории Республиканского противотуберкулезного диспансера один из образцов диагностического материала от пациента исследовали сразу несколькими методами, то при получении культуры, в процессе идентификации учитывали данные люминесцентной микроскопии, исследования ПЦР в реальном времени, а при получении культуры на плотных питательных средах – и результаты роста микобактерий в жидкой питательной среде.

При положительном результате исследования ПЦР в реальном времени из данного образца, подтверждение на принадлежность культуры, выделенной в жидкой среде, к *M. tuberculosis complex* проводили посредством иммунохроматографического теста BD MGIT TBc ID («Becton Dickinson and Company», США). Также культуру исследовали на контаминацию путем посева на 5% кровяной агар на основе агара Мюллера-Хинтона (КА) (HiMedia Laboratories, Индия) [210].

При отрицательных результатах ПЦР в реальном времени и люминесцентной микроскопии или при положительном результате микроскопии, но отрицательной ПЦР в реальном времени, при получении культуры в жидкой среде проводили микроскопическое исследование с окраской по Цилю-Нильсену (ЗАО ЭКОлаб, Россия), посев на кровяной агар (основа HiMedia Laboratories, Индия), иммунохроматографический тест BD MGIT TBc ID («Becton Dickinson and Company», США) и, при необходимости, исследование культуры методом ПЦР в реальном времени на наличие специфического фрагмента ДНК микобактерий туберкулеза *IS6110*.

Идентификационный тест BD MGIT TBc ID («Becton Dickinson and Company», США) представляет собой хроматографический иммуноанализ для качественного определения комплекса MPT64, фракции белка микобактерий, выделяемой в процессе культивирования. Он позволяет провести идентификацию микобактерий туберкулеза в течение 15 минут [60].

Культуру, полученную на плотных питательных средах, первоначально идентифицировали по скорости роста колоний, их морфологии, наличию пигмента. Далее проводили микроскопическое исследование с окраской по Цилю-Нильсену (ЗАО ЭКОлаб, Россия) и, при необходимости, дополнительно иммунохроматографический анализ и ПЦР в реальном времени. Кроме того, выполняли биохимические тесты на средах Левенштейна-Йенсена с салициловокислым натрием (1000 мкг/мл) и с тиофен-2 гидразида карбоксиловой кислоты (2мкг/мл) (ТСН) [82].

#### *Видовая идентификация нетуберкулезных микобактерий*

Культуры микобактерий, выделенные в жидкой или на плотных питательных средах и идентифицированные как нетуберкулезные, подвергали дальнейшему исследованию на видовую принадлежность. За период 2015 – 2019г.г. было идентифицировано 395 штаммов нетуберкулезных микобактерий от 185 человек, являющихся постоянными жителями Республики Марий Эл. Для видовой идентификации штаммов использовали ДНК-стриповую технологию с применением наборов GenoTypeCM/AS (Hain Lifescience, Германия) [44,136].

Исследование проводили в соответствии с инструкциями производителя тестов, которое включает три этапа: выделение ДНК, мультиплексную амплификацию с биотинилированными праймерами и реверс-гибридизацию. Лизис микобактерий производили при 95°C 20 минут в твердотельном термостате, амплификацию ДНК проводили в приборах «CFX-96» («BioRad», США) или «АНК-32» (ИАП РАН, г. Санкт-Петербург, Россия) согласно протоколу производителя тестов. Этап гибридации проводили в автоматическом гибридателе GT-Blot 48 (Hain Lifescience, Германия), оценку результатов проводили визуально с помощью шаблонов интерпретации полос гибридации.

Первоначально для идентификации микобактерий использовали набор GenoTypeCM (Hain Lifescience, Германия), позволяющий дифференцировать наиболее часто встречающиеся виды – *M. avium ssp.*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*/*M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. tuberculosis complex*.

В случае положительного контроля рода (GC), но невозможности определения вида нетуберкулезных микобактерий по проявившимся на стрипе полосам, для дальнейшей идентификации применяли набор GenoTypeAS (Hain Lifescience, Германия). Данный набор позволяет идентифицировать 17 видов нетуберкулезных микобактерий – *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*. Если применение и этого тест-набора не позволяло определить вид микобактерий, то выдавали результат – «Выделены НТМБ. Вид не определен».

Сводные данные по количеству обследованных лиц, объему проведенных исследований образцов диагностического материала, изучению штаммов микобактерий и использованных методов выявления и идентификации микобактерий приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Объем исследований по выявлению микобактерий

<b><i>Пациенты</i></b>		
Показатель	Методы исследований	Количество обследованных пациентов
Выявление микобактерий туберкулеза у пациентов из учреждений нетуберкулезного профиля	Микроскопический с окраской по Цилю-Нильсену	53240
	Культуральный на плотных питательных средах	24757
	ПЦР-РВ	4005
<b><i>Пациенты</i></b>		
Показатель	Методы исследований	Количество обследованных пациентов
Выявление микобактерий туберкулеза у впервые выявленных больных туберкулезом легких	Микроскопические, культуральные на плотных и в жидкой питательных средах, ПЦР-РВ	1043
Сравнение выявления микобактерий туберкулеза у впервые выявленных больных туберкулезом легких фенотипическими методами	Культуральные на плотных и в жидкой питательных средах	993
Выявление ДНК МБТ на поздних циклах амплификации	ПЦР-РВ	332
<b><i>Образцы диагностического материала/штаммы микобактерий</i></b>		
Показатели	Методы	Количество образцов диагностического материала
Выявление микобактерий туберкулеза из одного образца диагностического материала разными методами	Микроскопические, культуральные на плотных и в жидкой питательных средах, ПЦР-РВ	8575
Сравнение выявления микобактерий туберкулеза из мокроты, исследованной с диагностической целью фенотипическими методами	Культуральные на плотных и в жидкой питательных средах	5218
Идентификация нетуберкулезных микобактерий	ДНК-стриповая технология	395 штаммов

## Методы тестирования лекарственной чувствительности/устойчивости микобактерий

Тестирование микобактерий туберкулеза на лекарственную чувствительность/устойчивость проводили фенотипическими методами – культуральными на плотных и жидких питательных средах, и молекулярно-генетическим методом – ПЦР в реальном времени на базе БЛ ГБУ РМЭ «Республиканский противотуберкулезный диспансер» (Таблица 2).

Таблица 2 – Объем выполненных исследований по тестированию микобактерий на лекарственную чувствительность

Показатель	Методы	Категория пациентов		
		Впервые выявленные больные туберкулезом легких	Больные с рецидивом туберкулеза легких	Прочий контингент больных туберкулезом легких
Динамика уровня лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза	Культуральные	1357	233	1218
Динамика спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза	Культуральные	503	73	303
Спектр мутаций ДНК микобактерий туберкулеза, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду и рифампицину	ПЦР-РВ	492	81	218

*Определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза методом абсолютных концентраций на плотных питательных средах*

Питательную среду Левенштейна-Йенсена для тестирования микобактерий на лекарственную чувствительность методом абсолютных концентраций готовили

самостоятельно из реагентов, прописанных в Приказе МЗ РФ от 21.03.2003г. № 109 [82], с использованием чистых субстанций противотуберкулезных препаратов (Sigma-Aldrich, Китай). Тестирование лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза, т.е. приготовление суспензии микобактерий туберкулеза и инокуляцию в пробирки с противотуберкулезными препаратами, инкубацию посевов, учет результатов также проводили в соответствии с Приказом МЗ РФ от 21.03.2003г. № 109 [82,128]. Лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза данным методом определяли к препаратам 1 ряда (параллельно с тестами на лекарственную чувствительность микобактерий в жидкой среде) в критических концентрациях, регламентированными Приказом МЗ РФ от 21.03.2003г. № 109 [82], – стрептомицину (S) (10 мкг/мл), изониазиду (H) (1 мкг/мл), рифампицину (R) (40 мкг/мл), этамбутолу (E) (2 мкг/мл), а также к препаратам 2 ряда – канамицину (Km) (30 мкг/мл), капреомицину (Cm) (30 мкг/мл), офлоксацину (Ofl) (2 мкг/мл), этионамиду (Etio) (30 мкг/мл), ПАСКу (Pas) (1 мкг/мл) и циклосерину (Cs) (30 мкг/мл). Периодичность постановки тестов на лекарственную чувствительность определяли в зависимости от категории больного и предыдущих результатов тестов на лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза.

После инкубации в течение 21 дня при обильном росте микобактерий туберкулеза в контрольной пробирке учитывали результат теста на лекарственную чувствительность. Культуру считали устойчивой к тому или иному противотуберкулезному препарату при росте более 20 колоний микобактерий туберкулеза. При скудном росте микобактерий туберкулеза в контроле, пробирки с противотуберкулезными препаратами инкубировали в термостате при 37° С еще 1–2 недели.

*Определение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза методом пропорций в жидкой питательной среде*

По своей сути метод тестирования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза в жидкой среде в системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США) представляет собой модифицированный для

жидкой среды метод пропорций [129,136,210]. На базе бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «Республиканский противотуберкулезный диспансер» тестирование лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза проводили к следующим противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда в критических концентрациях, рекомендованными Российским обществом фтизиатров [136,209]: – изониазиду (0,1мкг/мл), рифампицину (1,0 мкг/мл), этамбутолу (5,0 мкг/мл), стрептомицину (1,0 мкг/мл), пиразинамиду (100,0 мкг/мл), амикацину (1,0 мкг/мл), левофлоксацину (1,5 мкг/мл), моксифлоксацину (0,5 мкг/мл). Для приготовления разведений противотуберкулезных препаратов 1 ряда использовали лиофилизированные чистые субстанции, входящие в набор (Becton Dickinson, США). Для приготовления разведений противотуберкулезных препаратов 2 ряда использовали чистые субстанции препаратов (Sigma –Aldrich, Китай). Расчет навески проводили с учетом активности препарата, корректировку разведения проводили объемом растворителя. Готовые разведения аликвотили по 100, 200, 300, 400, 500 мкл и замораживали при – 20°С. Размораживание и повторная заморозка разведений препаратов не допускалась.

Перед процедурой постановки тестов на лекарственную чувствительность микобактерий туберкулеза в пробирки MGIT вносили обогатительную добавку ВАСТЕС 960 SIRE Supplement («Becton Dickinson and Company», США) и по 100 мкл противотуберкулезного препарата. Процедуру постановки тестов проводили после проверки культуры на контаминацию в соответствии с протоколом производителя [210]. Если определялся рост и в контрольной пробирке, и в пробирке, содержащей противотуберкулезный препарат, то штамм считали резистентным.

*Тестирование ДНК микобактерий туберкулеза на выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам*

Для выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду и рифампицину, в образцах ДНК микобактерий, выделенных из диагностического материала и культуры, использовали наборы «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия).



С помощью данных наборов, в соответствии с инструкцией производителя, выявляли мутации в следующих генах, связанных с устойчивостью к рифампицину: *rpoB531* (Ser-Leu, Ser-Trp), *rpoB526* (His-Tyr, His-Asp, His-Arg, His-Leu, His-Asn, His-Pro), *rpoB516* (Asp-Val, Asp-Tyr), *rpoB533* (Leu-Pro). Для выявления устойчивости к изониазиду проводили тестирование на наличие следующих мутаций: *katG315* (Ser-Thr1, Ser-Thr2, Ser-Asn), *inhA* (C(-15)T, T(-8)A/C).

Мутации, ассоциированные с устойчивостью ДНК микобактерий туберкулеза к фтохинолонам, определяли с помощью набора «Амплитуб-*FQ-PB*» (ООО «Синтол», Россия) в гене *gyrA* в следующих кодонах: в 90 кодоне (Ala-Val), в 91 кодоне (Ser-Pro), в 94 кодоне (Asp-Asn, Asp-Tyr, Asp-Gly, Asp-Ala).

Предварительно проводили мультиплексные реакции для накопления специфических локусов генов ДНК микобактерий туберкулеза, ассоциированных с устойчивостью, с помощью набора реагентов «Multi» и «Multi-*FQ*» (ООО «Синтол», Россия).

Все реакции проводили согласно инструкций производителя.

Реакцию амплификации проводили в приборах CFX-96 (BioRad, США) или «АНК-32» (ИАП РАН, г.Санкт-Петербург, Россия). Учет результатов амплификации производили по наличию/отсутствию роста сигнала флуоресценции по каналам FAM, HEX, ROX при условии наличия сигнала по каналу Cy5 с учетом пороговых циклов *C<sub>t</sub>*, прописанных производителем в инструкциях к наборам.

*Определение чувствительности медленнорастущих нетуберкулезных микобактерий к антибактериальным препаратам*

На лекарственную чувствительность протестировали 23 штамма *M.intracellulare* и 12 штаммов *M.avium*. Тестирование на лекарственную чувствительность проводили количественным методом двукратных серийных разведений с помощью тест-системы Sensititre SLOMYCO (TREK Diagnostic Systems Ltd., Великобритания) к 13 препаратам (Таблица 3).

Таблица 3 – Химиопрепараты и их концентрации в панели SLOMYCO (TREK Diagnostic Systems Ltd., Великобритания)

Препараты	Диапазон концентраций (мкг/мл)
Амикацин	1 - 64
Доксициклин	0,12 - 16
Изониазид	0,25 - 8
Кларитромицин	0,06 - 64
Линезолид	1 - 64
Моксифлоксацин	0,12 - 8
Рифабутин	0,25 - 8
Рифампицин	0,12 - 8
Стрептомицин	0,5 - 64
Триметоприм/сульфаметоксазол	0,12/2,38 - 8/152
Ципрофлоксацин	0,12 - 16
Этамбутол	0,5 - 16
Этионамид	0,3 - 20

Инкубацию проводили при 37°C, результаты определения чувствительности учитывали на 7–12 день. По отсутствию роста культуры определяли минимальные ингибирующие концентрации (МИК) каждого препарата к исследуемым штаммам.

Для оценки результатов определения лекарственной чувствительности использовали критерии минимальных ингибирующих концентраций, рекомендованные Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) США [161].

### **Определение генотипа микобактерий туберкулеза**

На принадлежность к генетическим линиям было протестировано 233 образца ДНК микобактерий туберкулеза, из них 43 получены от больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией. Принадлежность к генотипу Beijing определяли методом ПЦР в реальном времени набором реагентов «Амплитуб - Beijing» (ООО «Синтол») согласно инструкции производителя. Для этого смешивали реакционную смесь с *Syn Taq* ДНК-полимеразой и добавляли 5 мкл исследуемого образца. Реакция проводилась в приборе «CFX-96» (BioRad, США). Принадлежность образца к генотипу Beijing определялась согласно инструкции производителя.

Определение генетических линий non Beijing проводили методом споллиготипирования 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»®, поставляющейся вместе с комплексом. Идентификацию споллигопрофилей проводили согласно международной базе данных SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe) [212].

### **Статистическая обработка данных**

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

### **Личный вклад автора в получение 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 *rpoB* с заменой Ser-Leu и в *katG*315 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–А16–116111150004–5; «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.).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Выявление микобактерий

#### 1.1.1. Выявление и диагностика туберкулеза в медицинских учреждениях различного профиля

Одним из важнейших приоритетов в системе противотуберкулёзных мероприятий является выявление и диагностика туберкулеза. Согласно нормативной документации, принятой в Российской Федерации, выявлением ТБ занимаются учреждения первичной медико-санитарной помощи (ПМСП) [82,84]. Клиническая и рентгенологическая симптоматика туберкулеза легких разнообразна. Зачастую данный факт обуславливает постановку неверного первоначального диагноза [23,73]. Г.Р. Рубинштейн в 50-х годах XX века оценивал частоту расхождения первоначального и уточненного диагнозов при ТБЛ в пределах 35%–45% [106], А.Г. Хоменко в 1998 г. также приводит аналогичную частоту ошибочной диагностики туберкулеза в 34%–40% случаев [143]. По данным исследования ФГБНУ «ЦНИИТ», проведенного в 2017-2019гг. частота диагностических ошибок колеблется от 60,9% до 100% [26,115].

При туберкулезе легких ряд клиничко - рентгенологических симптомов характерны и для других заболеваний легких, поэтому в зависимости от клинической формы туберкулеза возникают трудности дифференциальной диагностики с внебольничной пневмонией, саркоидозом органов дыхания, онкопатологией легких [41,45,54,131,145,158,208]. Нередко течение ТБЛ осложняется присоединением неспецифического заболевания, вызванного оппортунистической микрофлорой, и наоборот, пациенты с неспецифическими заболеваниями легких находятся в группе риска по заболеванию туберкулезом [31,86,121,144,215]. К группе высокого риска по заболеванию ТБЛ относятся и пациенты, инфицированные ВИЧ, особенно больные СПИДом [117].

В ряде исследований отечественных и зарубежных авторов отмечается достаточно высокая распространенность хронических неспецифических заболеваний легких в мире, например, распространенность хронической

обструктивной болезни легких (ХОБЛ) у людей старше 40 лет составляет более 10%. Ряд публикаций посвящены исследованию взаимосвязи неспецифических заболеваний легких и развитию туберкулезного процесса. Отмечено, что у более 50% больных ТБЛ имеется сочетание с ХОБЛ [6,11,121]. Нередко дифференциация легочных заболеваний и окончательная диагностика проводится уже в стационарных отделениях противотуберкулезных учреждений. По данным исследования, проведенного в Нижегородском ОПТД, в спектре первоначальных диагнозов у лиц с туберкулезом, диагностированным в диспансере, в 29,9% случаях отмечалась острая пневмония, в 11,6% – рак легкого, в 1,8% – острый и хронический бронхит, по 1,2% – острое респираторное заболевание и плеврит неясной этиологии [100]. При ретроспективном анализе медицинской документации пациентов туберкулезных стационаров г. Новосибирска, у которых при дообследовании установлены неспецифические заболевания легких (НЗЛ), было выявлено, что подавляющее число больных были направлены на госпитализацию учреждениями ОЛС с различными формами туберкулеза. В структуре НЗЛ у данной категории больных преобладала внебольничная пневмония. Также у пациентов был диагностирован саркоидоз, ХОБЛ, онкология и пр. НЗЛ [45].

Стоит отметить, что не обнаружено литературных источников, в которых анализируется эффективность микробиологических методов выявления МБ у больных с длительным кашлем в учреждениях ОЛС. Так, например, в исследовании, проведенном в г.Омск, при анализе диагностики ТБ у лиц с ХОБЛ и внебольничной пневмонией в пульмонологическом стационаре в дополнение к клинико-рентгенологической картине анализировались результаты иммунологических тестов – пробы Манту и Диаскинтеста [17]. Имеющиеся в литературных источниках данные получены при обследовании пациентов в диагностических, консультативных и стационарных отделениях лечебных учреждений туберкулезного профиля. Многие авторы отмечают недостаточную эффективность лечебно-диагностических мероприятий в ОЛС, особенно в первичном звене. Зачастую пациенты направляются в противотуберкулезные

учреждения уже из стационарных отделений учреждений ОЛС [8,23,63,99,111]. Так, по результатам исследования, проведенного в пульмонологическом отделении многопрофильного стационара в г.Омске, у 10,7% пациентов был выявлен туберкулез, из них у 30,8% больных в промывных водах бронхов обнаружены ДНК МБТ [17,144].

Таким образом, в большинстве исследований по сравнению эффективности методов выявления микобактерий приводятся данные по бактериовыделению у лиц в учреждениях туберкулезного профиля без учета разделения больных по категориям, по цели обследования и первоначальным диагнозам, особенно у лиц с неспецифическими заболеваниями, что не позволяет дать полную объективную оценку.

### **1.1.2. Сравнительная характеристика методов выявления микобактерий**

Общеизвестно, что резервуар туберкулезной инфекции составляют все больные туберкулезом, выделяющие МБТ, независимо от метода выделения [138]. В последние годы в целом эпидемиологическая ситуация по туберкулезу улучшилась, о чем свидетельствует снижение показателя бациллярности пациентов в 2019 г. по сравнению с 2005 г. в 2,3 раза [79]. Однако, доля бактериовыделителей среди всех впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания возросла с 2000г. по 2018г. на 33,5% – с 36,1% до 48,2% [147].

Бациллярным считается больной туберкулезом, у которого МБТ обнаружены микроскопическими и/или культуральными методами. Самый доступный, дешевый из микробиологических методов, широко применяемых как в ОЛС, так и в противотуберкулезных учреждениях – микроскопический [214]. Особенно интенсивно данное направление развивалось в середине 2000-х годов, что связано с оснащением клиничко-диагностических лабораторий учреждений первичной медико-санитарной помощи (ПМСП) оборудованием и активной курацией как со стороны



курирующих организаций федерального уровня, так и на региональном уровне сотрудниками центральных лабораторий. Так, заболеваемость туберкулезом с бактериовыделением, определенным методом микроскопии в 2008г. по сравнению с 2000г. выросла с 13,6 до 21,0 на 100 тыс. населения [148].

В многочисленных работах по сравнению методов выявления микобактерий отмечается низкая чувствительность микроскопических методов, особенно с окраской по Цилю-Нильсену, в среднем она составляет 40%–60% у впервые выявленных больных ТБЛ и около 25% при внелегочной локализации процесса [91].

При обследовании пациентов с симптомами, подозрительными на ТБ, в КДЛ ОЛС доля лиц с положительным результатом КУМ, выявленным микроскопическим методом, составляет в среднем 0,6%–0,9% [25].

Лучших результатов позволяет достичь метод выявления КУМ с окраской флюорохромами для люминесцентной микроскопии. В Российской Федерации данный метод для выявления МБ используется в основном в противотуберкулезных учреждениях. Метаанализ показал, что он повышает эффективность микроскопии на 10%–15% [44, 91,153,213].

Для повышения результативности в медицинских организациях нетуберкулезного профиля, согласно приказу Минздрава от 29.12.14 № 951, рекомендовано проводить трехкратное обследование пациентов микроскопическими методами [84].

В противотуберкулезных учреждениях практического здравоохранения микробиологическая диагностика туберкулеза кроме микроскопических методов, как правило, включает в себя посевы в ЖС и на ППС, а также в настоящее время все шире используются молекулярно-генетические методы [39,44,92].

Отмечается, что по сравнению с методами микроскопии чувствительность культурального метода на ППС на 20%–25% выше [94].

С внедрением в практику лабораторий фтизиатрического профиля культуральных исследований в ЖС, практически все авторы отмечают

повышение выявляемости микобактерий. Для культивирования посевов в ЖС используют автоматизированную систему ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США). В основе технологии ВАСТЕС MGIT лежит использование пробирки BDBBL™ MGIT™ («Becton Dickinson and Company», США) с модифицированной средой Middlebrook 7H9 и встроенным флюоресцентным индикатором. Инокуляцию диагностического материала в ЖС проводят одновременно с посевом на плотную яичную среду [136,43,149]. Исследования, проведенные во многих лабораториях мира, показали, что применение автоматизированных систем в лабораторной практике позволяет сократить сроки выявления микобактерий туберкулеза из диагностического материала в среднем до 3–20 дней [1,132,150,151,156,219].

По данным метаанализа, проведенного Cruciani M. и соавт. (2004), система MGIT обладает большей аналитической чувствительностью по сравнению с чувствительностью для плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена – 81,5% и 67% соответственно [192].

Результаты сравнения данных культивирования МБТ показали, что в среднем, чувствительность культурального метода в жидкой среде с использованием системы ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США) на 10%–20% выше, чем на плотных питательных средах [92,94,187,172,188,197]. Однако имелись образцы диагностического материала, которые показали рост МБТ только на ППС [59].

В соответствии с приказом Минздрава от 29.12.14 № 951 в медицинских организациях фтизиатрического профиля при постановке диагноза «туберкулез» одним из обязательных методов исследования является молекулярно-генетический метод (МГМ) на наличие маркеров ДНК МБТ [84,92].

В 2010 году ВОЗ рекомендовала использовать устройство Xpert MTB/RIF (Cepheid, США) как для первичной диагностики туберкулеза, так и для выявления пациентов с подозрением на МЛУ-ТБ и туберкулез, связанный с ВИЧ/СПИДом. В настоящее время для выявления МБТ картриджная технология GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США) используется в большинстве лабораторий

противотуберкулезных учреждений Российской Федерации. Меньшее количество практических лабораторий используют методы ПЦР-РВ и Биочип технологию.

Основываясь на всестороннем обзоре литературы, можно сделать заключение о том, что специфичность вышеперечисленных МГМ составляет 99%, а аналитическая чувствительность различается. При применении GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США) и Биочип технологии чувствительность методов для респираторных образцов составляет в среднем 70% и 50% соответственно [94].

Метод ПЦР-РВ во всех исследованиях показал большую чувствительность по сравнению с другими методами, применяемыми в практической фтизиатрии [94,208]. В большинстве исследований приводятся данные по чувствительности и эффективности метода ПЦР-РВ в зависимости от позитивности/негативности микроскопического исследования мокроты. Авторы исследований отмечают высокую аналитическую чувствительность (98%–100%) метода для образцов с положительным микроскопическим анализом и более низкую чувствительность (57% до 76%) для микроскопически негативных образцов [152,164,208]. В среднем аналитическая чувствительность метода ПЦР-РВ для респираторных образцов составляет более 85%, что превосходит аналогичный показатель для GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США) [94].

Анализ метода ПЦР-РВ продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность для нереспираторных образцов диагностического материала – 70% и 99% соответственно [15,157].

Стоит отметить, что при использовании в диагностике туберкулеза метода ПЦР-РВ иногда амплификация проходит на поздних циклах, что создает трудности в интерпретации результата. В литературных данных нет источников, затрагивающих эту проблему.

При сравнении приведенных методов амплификации нуклеиновых кислот, некоторые авторы публикаций отмечают, что было бы идеальным использование системы GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США) для скрининга кашляющих больных на амбулаторном этапе в учреждениях нетуберкулезного профиля [206]. Однако, дороговизна исследования и большой поток пациентов в поликлинических

отделениях делают маловероятным эффективное внедрение данного метода [26,81]. Классическая ПЦР-РВ может быть более доступной, чем Xpert MTB/RIF (Cepheid, США), особенно в регионах с невысоким уровнем финансирования [167].

Стоит отметить, что имеется не так много публикаций, где сравнение выявляемости МБТ различными методами проводится из одного образца диагностического материала, особенно из нереспираторного.

В исследовании, проведенном сотрудниками ЦНИИТ, отмечается, что наибольшее количество положительных результатов было получено при обнаружении ДНК МБТ молекулярно-генетическими методами. Так, эффективность выявления МБТ лечащихся больных и обследуемых лиц в поликлиническом отделении ЦНИИТ составила: методом GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США) – 35,8%, ПЦР-РВ – 37,3%, культуральным методом на среде Финна-П – 12,9%, в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США) – 23,8%. Эффективность выявления КУМ методом люминесцентной микроскопии составила 15,7%. Также, в данной работе отмечается преимущество МГМ в отношении нереспираторных материалов. Так, для мочи эффективность ПЦР-РВ составила 8,8%, культурального метода на среде Финна-П – 0,8%, люминесцентной микроскопии – 0,7% [91].

Белорусские исследователи также показывают преимущество МГМ при диагностике туберкулеза [126]. Выявление ДНК МБТ у больных с туберкулезным плевритом из плеврального экссудата отмечается в 10%, из ткани плевры – в 50%; при исследовании резекционного материала выявление ДНК МБТ было в 100% случаев. У пациентов с БЦЖитом и спондилитом получены отрицательные результаты бактериоскопического и культурального исследования, однако обнаружены ДНК микобактерий [80].

В исследовании, проведенном в ГКУЗ ПК «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», ВИЧ-инфицированные больные с подозрением на ТБ также обследовались несколькими методами из одного образца мокроты – люминесцентной

микроскопией, ПЦР-РВ и посевами в ЖС и ППС. Полученные результаты были аналогичны тем, что определялись у больных без ВИЧ-инфекции, т.е. наиболее результативным был метод ПЦР-РВ, и самая низкая чувствительность отмечалась при использовании люминесцентной микроскопии [18,134].

В литературных источниках отсутствуют данные по скрининговому обследованию кашляющих больных методом ПЦР-РВ в учреждениях нетуберкулезного профиля. Имеются исследования, проведенные уже при дообследовании пациентов с различными направительными диагнозами в амбулаторных и стационарных отделениях противотуберкулезных учреждений.

В Российской Федерации в отчетных формах по туберкулезу ведется полицейской статистический учет бактериовыделителей. При анализе литературных источников в данном разделе по сравнению методов выявления микобактерий туберкулеза было установлено, что анализируются данные исследования образцов диагностического материала без указания категории больных (впервые выявленные или ранее леченые) или от впервые выявленных больных без учета полноты охвата методами, предусмотренными Приказом Минздрава от 29.12.14 № 951, что может привести к недооценке полученных результатов.

### **1.1.3. Алгоритмы обследования больных по выявлению микобактерий**

В Российской Федерации спектр и кратность, а также последовательность применения методов по выявлению микобактерий (МБ) регламентированы Приказом Минздрава от 29.12.14 № 951 и рядом документов, принятых Российским обществом фтизиатров [84,133,134,136].

Согласно приказу МЗ РФ от 29.12.14 № 951 в непрофильных лечебных учреждениях предусмотрено 3-х кратное обследование больных с подозрением на туберкулез микроскопическим методом по Цилю-Нильсену. При отрицательных результатах микроскопии, но при сохраняющейся симптоматике, рекомендовано обследование больных молекулярными методами. При положительных результатах микроскопии проводят дообследование пациента в

противотуберкулезном учреждении МГМ и культуральными методами на ППС и в ЖС [84].

Современными международными рекомендациями предлагается предпочтение при обследовании лиц с подозрением на туберкулез отдавать быстрым молекулярным тестам и культуральной диагностике в ЖС, а микроскопические методы предлагается использовать в качестве дополнительных [3]. Однако, на современном этапе в Российской Федерации микроскопические методы, определяющие наиболее эпидемиологически опасных больных, остаются актуальными, особенно для учреждений ПМСП и ОЛС в целом [3,28,92,110].

Во многих публикациях представлены данные по характеристике и сопоставлению эффективности методов выявления микобактерий, но каждый метод имеет свои преимущества и недостатки по скорости получения результата, экономическим составляющим, простоте, результативности [102,146].

Россия – очень большая страна, и регионы имеют свои территориальные, демографические, миграционные, экономические и др. особенности, поэтому в алгоритм выявления микобактерий могут вноситься свои коррективы, исходя из имеющихся диагностических методов исследований.

## **1.2. Лекарственная устойчивость *M.tuberculosis***

### **1.2.1. Лекарственно-устойчивый туберкулез в XXI веке**

Как и при большинстве инфекций, на эпидемиологическую ситуацию при туберкулезе большое влияние оказывают биологические свойства возбудителя.

Серьезной проблемой в этом плане является первичный лекарственно-устойчивый туберкулез, особенно впервые выявленный туберкулез с множественной (МЛУ) и широкой (ШЛУ) лекарственной устойчивостью [88]. По мнению экспертов ВОЗ, показатель уровня первичной МЛУ выше 10% оказывает отрицательное влияние на показатели эффективности лечения и смертности [125].

Следует отметить, что с 2006г. в РФ лекарственную устойчивость МБТ было принято разделять на следующие категории: монорезистентность, полирезистентность, МЛУ и ШЛУ. Монорезистентность – это устойчивость МБТ

к одному из противотуберкулезных препаратов (ПТП), полирезистентность – устойчивость к 2-м и более ПТП, исключая одновременную ЛУ МБТ к изониазиду и рифампицину, МЛУ – это ЛУ МБТ с одновременной резистентностью к изониазиду и рифампицину, ШЛУ – это МЛУ и дополнительно устойчивость к инъекционному препарату и фторхинолонам. Кроме того, в последние годы стали выделять пре-ШЛУ, которая представляет собой МЛУ и плюс резистентность МБТ к инъекционным препаратам или фторхинолонам [128].

В 2020 г. эксперты ВОЗ предложили изменить категории ЛУ, в частности, из определения ШЛУ рекомендуется исключить ЛУ МБТ к инъекционным ПТП и офлоксацину и включить в данное определение ЛУ к левофлоксацину или моксифлоксацину и к линезолиду или бедаквилину т.е. препаратам группы А [176,221].

Кроме того, повсеместно различают первичную ЛУ – у ранее не леченных больных туберкулезом и приобретенную – у ранее леченных больных [130].

По оценке ВОЗ Российская Федерация вошла в список из 30 стран с высоким уровнем МЛУ-ТБ, при этом более половины случаев туберкулеза с МЛУ-ТБ регистрируется в Индии, Китае и РФ [27,125,176].

В Российской Федерации в официальную статистическую отчетность по туберкулезу показатели по уровню устойчивости штаммов МБТ к изониазиду и рифампицину впервые включили в 1999 году. Но, данные показатели не отражали реальную картину по стране, так как не было полноты охвата как культуральными исследованиями по выявлению МБТ, так и тестированием МБТ на ЛЧ во всех регионах. Достоверные данные смогли представить только 8 регионов, включая Республику Марий Эл [4]. О недостаточной полноте данных по первичной ЛУ МБТ в первой половине 2000-х годов упоминал М. И. Перельман, связывая этот факт с недостатками в работе лабораторной службы в стране. Он отмечал наметившуюся в эти годы тенденцию к росту показателя первичной устойчивости [97].

Так, по официальным статистическим данным, в 1999г. частота первичной МЛУ у больных туберкулезом органов дыхания составляла в среднем 6,7%, а в 2004г. – от 2,5% до 17% в регионах, имевших такие сведения. Также, стоит отметить, что уровень первичной ЛУ МБТ к какому-либо противотуберкулезному препарату в 2004г. составлял от 20% до 40% [4]. Следует отметить, что к 2012 году в Российской Федерации почти все бактериовыделители были охвачены тестированием на лекарственную чувствительность МБТ, и в 2019 г. показатель охвата составил 97,3% [88].

В последующие годы тенденция к росту показателей ЛУ МБТ и МЛУ, как первичной, так и среди рецидивов, в РФ сохранилась. Данный факт связывается как с истинным ростом показателей, так и улучшением качества лабораторной диагностики. В 2010г. уровень первичной ЛУ МБТ составлял в среднем 37,0%, а в 2018г. – 49,3%. Уровень первичной МЛУ в 2005г. составлял 9,5%, в 2010г. – 14,4%, в 2018г. – 31,9%, а в 2019г. – 32,8% [29,79,88,148].

Особенно высокие значения уровня МЛУ МБТ, а также и рост этого показателя отмечаются среди больных с рецидивами ТБ. Так, если в 2010г. уровень МЛУ МБТ до начала химиотерапии у этого контингента составлял 34,7%, то в 2019г. – 54,8% [79,88,148].

Авторы аналитических отчетов по туберкулезу отмечают, что в РФ и за рубежом складывается негативная тенденция эпидемиологического процесса по ШЛУ-ТБ. По данным исследования Пекинского Национального клинического центра за период с 2011г. по 2015 г. доля ШЛУ МБТ увеличилась с 6,3 до 9,1% [151,191].

Уровень первичной ШЛУ МБТ в РФ вырос с 2,3% в 2016г. до 4,1% в 2018г. и 3,7% в 2019 г. Уровень изначальной ШЛУ МБТ у больных с рецидивами вырос с 6,8% в 2016 г. до 10,1% в 2019 г. Одним из факторов роста этого показателя авторы отмечают недостаточное использование молекулярно-генетических методов для раннего выявления ШЛУ МБТ [88].

В литературных данных имеются сведения об уровне пре-ШЛУ МБТ среди впервые выявленных больных туберкулезом. Так, уровень сочетания МЛУ МБТ с



устойчивостью к фторхинолонам в РФ в среднем составляет 10,3%, а в сочетании только к инъекционным противотуберкулезным препаратам – 14,1% [48]. В Ярославской области уровень пре-ШЛУ МБТ у впервые выявленных больных в среднем за период 2011–2017 гг. составил 10,2% [103].

В Российской Федерации отмечается как рост суммарной ЛУ МБТ, так и утяжеление ее структуры, причем при всех формах туберкулезного процесса [13].

В исследованиях, проведенных в ряде регионов России, отмечается тенденция увеличения доли штаммов микобактерий туберкулеза с полирезистентностью, МЛУ и ШЛУ с одновременным снижением доли монорезистентных штаммов МБТ. Например, в Смоленской области за период с 2005г. по 2010г. суммарная для всех категорий больных ТБЛ доля монорезистентных штаммов МБТ уменьшилась в 3,3 раза, а доля штаммов МБТ с МЛУ увеличилась в 3 раза [76]. В Иркутской области уровень монорезистентности МБТ у впервые выявленных больных за период с 2008–2010гг. снизился в 1,5 раза, у ранее леченных больных – в 2 раза. Одновременно зарегистрировано увеличение в 1,2 раза уровня полирезистентных и штаммов с МЛУ МБТ у впервые выявленных и в 1,4 раза у ранее леченных больных туберкулезом [151].

При анализе уровня первичной ЛУ МБТ к отдельным препаратам (при монорезистентности и в комбинации с другими противотуберкулезными препаратами) практически все исследователи в Российской Федерации отмечают, что наиболее высокий уровень ЛУ МБТ у больных туберкулезом отмечается к стрептомицину, изониазиду и рифампицину [29,46,69,87,103,104]. Причем в публикациях отмечается негативная тенденция к росту данных показателей.

Также в исследованиях отмечается достаточно высокий уровень ЛУ МБТ к этамбутолу и ПТП 2-го ряда, к которым определение ЛУ регламентировано нормативными документами РФ. Так, в Москве в 2017 г. первичная ЛУ МБТ к этамбутолу отмечалась на уровне 18%, к этионамиду – в более чем 22%, а также почти у каждого пятого пациента наблюдалась устойчивость к пипразинамиду [104].

Особую озабоченность вызывает высокий уровень первичной ЛУ МБТ к инъекционным препаратам и фторхинолонам. Например, ЛУ МБТ к канамицину у впервые выявленных больных в Ярославской области в 2011–2018 гг. составляла 24,6%, к капреомицину – 13%, офлоксацину – 18% [103]. В исследовании, проведенном Курским ОПТД, в спектре первичной МЛУ МБТ также отмечается высокий уровень ЛУ МБТ к канамицину и офлоксацину – 39,2% и 16,5% соответственно [46]. Исследование, проведенное в 2010–2011 гг. в 16 европейских странах среди больных, протестированных на ЛУ МБТ до начала лечения, показало высокий уровень резистентности к фторхинолонам (17,6%) и инъекционным препаратам (26,6%). Кроме того, в данном исследовании отмечался высокий уровень устойчивости к пиперазину – 59,7% [195].

Многими авторами отмечается рост штаммов МБТ с МЛУ с одновременной резистентностью к четырем препаратам и более [13,29,47,48,68,76,87,88,103,104].

В последние годы увеличивается количество больных с сочетанной патологией – туберкулез и ВИЧ-инфекция. Данной проблеме посвящено много публикаций, особенно связанных с изучением резистентности МБТ у данной категории больных [18,72,101,117,119,127,140].

Многие исследователи отмечают более высокую частоту лекарственной устойчивости у больных с ко-инфекцией ТБ/ВИЧ по сравнению с больными туберкулезом с ВИЧ-негативным статусом. Полученные в исследованиях данные характерны как для впервые выявленных больных, так и для больных с рецидивами. Наиболее часто в публикациях сравнивались уровни МЛУ МБТ [72,96,117,119,127]. Показано, что уровень первичной МЛУ МБТ и у больных с рецидивом при наличии ВИЧ-инфекции достоверно выше – 30,9% и 53,8% соответственно, против 21,7% и 36,9% у больных туберкулезом без ВИЧ. Также авторы отмечают некоторое увеличение количества ВИЧ-инфицированных лиц с ШЛУ-ТБ и влияние ко-инфекции ТБ/ВИЧ на распространение туберкулеза с ШЛУ [127]. Кроме того, имеются данные, что у впервые выявленных больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией спектр ЛУ МБТ более широкий по сравнению с больными без ВИЧ [140].

В исследовании, проведенном в Саратовской области, показано, что у больных ТБ с ко-инфекцией ВИЧ уровень первичной полирезистентности почти в 2 раза выше, чем у ВИЧ негативных пациентов. В то же время, монорезистентность отмечалась достоверно чаще у больных без ВИЧ [72].

Таким образом, рост лекарственно-устойчивого туберкулеза, особенно распространение туберкулеза с МЛУ и ШЛУ МБТ, создает огромную проблему для здравоохранения и препятствует на пути повсеместной ликвидации туберкулеза, что признают как международные организации, так и отечественная фтизиатрия [51,185].

### **1.2.2. Сопоставление методов тестирования лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза**

Для своевременного выбора режима химиотерапии туберкулеза важнейшее значение имеет быстрое и максимально эффективное определение лекарственной чувствительности возбудителя [128].

В Российской Федерации для тестирования на ЛЧ МБТ используется комплекс методов, которые можно разделить на фенотипические и генотипические или молекулярные [84]. Из фенотипических тестов подавляющее большинство лабораторий противотуберкулезных учреждений в своей практике используют 2 не прямых фенотипических метода – метод абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена и модифицированный метод пропорций в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США) на жидкой питательной среде Миддлбрук 7H9 [124,128].

Молекулярно-генетические методы (МГМ) определения ЛЧ основаны на выявлении точечных мутаций в генах микобактерий туберкулеза, ответственных за формирование устойчивости. Среди МГМ методов в РФ используются методы, основанные на гибридизационных технологиях и технологии с использованием мультиплексной ПЦР. В основе гибридизационных технологий лежит связывание

продуктов амплификации ПЦР с зондами, иммобилизированными на матрице [36,136].

Среди гибридизационных методов, рекомендованных ВОЗ для тестирования ЛУ МБТ, в России применяются тест-системы GenoType MTBDRplus для определения ЛУ к ПТП 1-го ряда и GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience, Германия) для определения ЛУ к этамбутолу, фторхинолонам, циклическим пептидам и аминогликозидам. Также в РФ применяют отечественные тест-системы «ТБ-БИОЧИП» («БИОЧИП-ИМБ», Россия). Гибридизационные методы показывают достаточно высокую специфичность по изониазиду (80% – 100%) и рифампицину (95% – 98%) и более 82% по ПТП 2-го ряда. Чувствительность MTBDRplus (Hain Lifescience, Германия) при сравнении с результатами, полученными культуральным методом с использованием системы BACTEC MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США), для изониазида составляет от 84% до 98%, для рифампицина – от 93% до 100% [51,57,207,220].

Несмотря на высокие показатели чувствительности и специфичности, широкое применение гибридизационных методов в рутинной практике ограничено из-за трудоемкости процесса и высокого риска перекрестной контаминации.

В 2010г. ВОЗ одобрила применение метода ПЦР с использованием картриджной технологии на платформе Gene-Xpert (Cepheid, США). Главное преимущество Xpert MTB/RIF (Cepheid, США), использующегося в большинстве регионов РФ, – получение результата в течение 2-х часов с одновременным определением мутаций в гене *proB*, ассоциированных с резистентностью к рифампицину. Кроме того, данная система не требует создания особых условий организации рабочего места. Но дороговизна метода ограничивает его применение [51,136,51146]. По данным метаанализа, проведенного Li S., Liu B. и др. (2017), диагностическая чувствительность метода для выявления туберкулеза составила 84%–92% и специфичность 99% по сравнению с культуральными методами. Чувствительность теста Xpert MTB/RIF (Cepheid, США) для выявления

устойчивости к рифампицину составляет 91%–96% в зависимости от уровня ЛУ к рифампицину на территории, специфичность теста составила 97%–99% [167].

В Российской Федерации в качестве быстрого и недорогого метода по выявлению пациентов с МЛУ/ШЛУ ТБ хорошо зарекомендовал себя метод ПЦР-РВ с использованием тест систем «Амплитуб-МЛУ-РВ» и «Амплитуб-FQ-РВ» (Синтол, Россия), позволяющий из диагностического материала выявлять мутации в генах *katG*, *inhA*, *rpoB* и *gyrA*, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам [64]. Совпадение результатов ЛУ данного метода с культуральными составляет 94%. Диагностическая чувствительность метода по фторхинолонам составила 97%, специфичность 98% [98,149]. Стоит отметить, что не все штаммы МБТ с выявленными мутациями к фторхинолонам имели фенотипическую устойчивость к офлоксацину и моксифлоксацину, определенную в жидкой среде в системе VASTEC MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США). В зависимости от мутации, выявлено достаточно большое количество (более 50%) штаммов МБТ устойчивых к офлоксацину и чувствительных к моксифлоксацину [19,26,35]. Также выявлена значительная перекрестная устойчивость между левофлоксацином и моксифлоксацином в рекомендованных критических концентрациях [137].

В ряде исследований отмечается расхождение между молекулярно-генетическими и фенотипическими методами определения ЛЧ МБТ к рифампицину в 2,6%–5,3% случаев, к изониазиду – в 3,7% [47,123]. В других исследованиях отмечается более низкая чувствительность метода ПЦР к изониазиду и рифампицину по сравнению с культуральными методами – 90%–95% от фенотипически устойчивых штаммов [141,178].

У ВИЧ-инфицированных больных ТБ процент совпадений результатов тестов на ЛЧ МБТ к рифампицину методами абсолютных концентраций и МГМ составил 88,5% [119]. В исследовании, проведенном в Пермском крае, показано, что как культуральные, так и молекулярно-генетические методы, показывают равную частоту МЛУ форм как у ВИЧ-позитивных, так и у ВИЧ-негативных пациентов [101].

Результаты выявления фенотипической устойчивости МБТ при отсутствии детекции мутаций, вероятно, связаны с ограниченным набором мутаций в тест-системах, а также, возможно и с гетерорезистентностью штаммов МБТ. Случаи сохранения фенотипической чувствительности МБТ к ПТП и выявления мутаций, ассоциированных с резистентностью, возможно, связаны с влиянием некоторых мутаций на ростовые свойства микобактерий [123]. В тоже время, стоит отметить, что расхождения результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов определения ЛЧ МБТ, возможно, связаны с тем, что не все исследования проведены из одного образца диагностического материала.

Имеется ряд исследований по сравнению результатов ТЛЧ МБТ к ПТП методами абсолютных концентраций на ППС Левенштейна-Йенсена, пропорций в ЖС Миддлбрук 7Н9 в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США), а также методом серийных микроразведений с помощью системы Sensititre MycoTB (TREK Diagnostic Systems, Великобритания) [32].

Всеми авторами отмечается высокая сопоставимость результатов ТЛЧ МБТ методами пропорций в ЖС с помощью ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США) и методом абсолютных концентраций. Показана высокая чувствительность и специфичность метода пропорций в ЖС при использовании для определения ЛЧ МБТ – 96%-98% и 100% соответственно [94]. Данные, полученные в Московском научно-практическом центре борьбы с туберкулезом, показали совпадение результатов тестирования ЛЧ МБТ в 98,3% при использовании обоих фенотипических методов [114]. В исследовании, проведенном в Кыргызстане, были получены следующие данные по чувствительности, специфичности и эффективности определения ЛЧ МБТ в системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США) в сравнении с методом абсолютных концентраций: к изониазиду – 97,7%, 91,4% и 96,6% соответственно; к рифампицину – 96,4%, 96,8% и 96,6% соответственно; к этамбутолу – 86%, 91,3% и 89,3% соответственно; к стрептомицину – 98,8%, 103,4% и 100% соответственно [150].

Применение жидких сред с автоматической детекцией роста в системе ВАСТЕС MGIT («Becton Dickinson and Company», США) для определения ЛЧ МБТ в мире считается эталонным, и преимущества его использования доказаны во многих публикациях [39,173,198].

По сравнению с методом абсолютных концентраций ТЛЧ МБТ в системе ВАСТЕС MGIT («Becton Dickinson and Company», США) позволяет получить результат через 5–14 дней, против 21 дня методом абсолютных концентраций. Недостатком метода является дороговизна расходных материалов, а соответственно и себестоимость анализа.

По данным ВОЗ, эффективность лечения МЛУ туберкулеза в мире составляет 56% [27]. Многочисленными исследованиями установлено, что на исход лечения больных ТБ во многом влияет лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза [14]. Кроме того, отмечается, что при позднем определении ЛЧ МБТ может произойти развитие устойчивости и к другим ПТП.

Среди фенотипических методов ускоренным является метод пропорций на ЖС в системе ВАСТЕС MGIT («Becton Dickinson and Company», США). Среди методов, позволяющих в ранние сроки определять ЛУ МБТ, наиболее перспективны молекулярно-генетические [84,135,136,29,62,141].

В Российской Федерации среди МГМ наиболее часто применяются методы ПЦР-РВ, тест-система GeneXpertMTB/RIF (Cepheid, США), и гибридизационные тест-системы «ТБ-БИОЧИП» («БИОЧИП-ИМБ», Россия) и GenoType (Hain Lifescience, Германия). Однако, использование гибридизационных методов из диагностического материала предполагает достаточную бактериальную нагрузку в образце, как правило, это образцы с положительным микроскопическим результатом, поэтому имеют ограничения по применению [57,85].

В исследованиях, изучавших эффективность режимов химиотерапии при применении тест - системы «ТБ-БИОЧИП» («БИОЧИП-ИМБ», Россия) для раннего выявления МЛУ МБТ у впервые выявленных больных туберкулезом, была показана высокая эффективность лечения. Было выявлено, что у 97,7% больных с МЛУ ТБ при своевременно назначенной адекватной терапии

бактериовыделение прекращалось через 6 месяцев. В тоже время, при позднем выявлении МЛУ МБТ сроки прекращения бактериовыделения существенно удлинялись [141]. Результаты исследования, проведенные в Саратовском ОПТД, также показали положительный эффект применения технологии «ТБ-БИОЧИП» («БИОЧИП-ИМБ», Россия) на эффективность лечения. При использовании этой тест-системы прекращение бактериовыделения по микроскопии отмечалось после получения больными с чувствительным ТБ и разным спектром ЛУ МБТ 90 доз химиопрепаратов, применявшихся в соответствии с результатами тестов ЛЧ [42].

Хорошие результаты лечения по прекращению бактериовыделения показало и применение тест-системы GeneXpertMTB/RIF (Cepheid, США) для выявления устойчивости к рифампицину до лечения. Так, по данным ряда публикаций, при использовании GeneXpertMTB/RIF (Cepheid, США) до назначения режима химиотерапии, бактериовыделение по посеву в ЖС в 57%–70% случаев (в зависимости от результатов ЛЧ/ЛУ к рифампицину) прекращалось через 2 месяца и почти в 100% случаев – через 6 месяцев лечения. Также к шестому месяцу лечения по данным исследований прекращалось бактериовыделение по методу микроскопии. В среднем сроки лечения пациентов по данным одних авторов сокращаются на 41 день, по данным других на 2-3 месяца по сравнению с лечением пациентов, проводившемся на основе только фенотипических методов определения ЛЧ МБТ [14,30,93,105,151].

Таким образом, обзор публикаций позволяет выявить достоинства и недостатки используемых в большинстве случаев специализированных методов ТЛЧ МБТ. Хотя молекулярные методы позволяют получить быстрый результат в течение 1–3 дней, но до настоящего времени не для всех ПТП валидированы и зарегистрированы тест системы.

Кроме того, молекулярно-генетические методы, при недостаточном количестве выявленных из диагностического материала ДНК МБТ, не позволяют ставить тесты на ЛУ. В таких случаях МГМ применимы для исследования выделенных культур микобактерий [114].



Культуральные методы, несмотря на длительность получения результатов ЛЧ МБТ, являются «золотым стандартом» как выявления МБТ, так и тестирования ЛЧ МБТ. Поэтому, на современном этапе для большей эффективности необходимо рационально применять имеющиеся методы в комплексе.

### **1.2.3. Распространенность мутаций, связанных с устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis* к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам**

Увеличение распространенности туберкулеза с лекарственной устойчивостью, особенно МЛУ и ШЛУ МБТ является одной из основных проблем для фтизиатров. Выявлено несколько генов, мутации в которых могут приводить к фенотипической устойчивости к изониазиду. Чаще всего резистентность МБТ к изониазиду связана с мутациями в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*. Изониазид, являющийся предшественником действующего вещества, активизируется в клетках организма под действием фермента каталазы-пероксидазы. Данный фермент кодируется геном *katG* [67,74,145]. Гены *inhA* и *ahpC* кодируют ферменты, связанные с синтезом миколовых кислот и регуляцией оксидативного стресса.

Рифампицин является производным рифамицина и оказывает бактерицидное действие на МБТ. Механизм действия рифампицина связан с ингибированием ДНК-зависимой РНК-полимеразы МБТ. В результате возникновения мутаций в гене *rpoB*, кодирующем  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы, возникает устойчивость к рифампицину [67,74,145].

При исследовании мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, различными молекулярными методами из диагностического материала и культур МБТ отмечается, что в Российской Федерации и странах СНГ в 2011-2018 гг. преобладающей является мутация в гене *katG* 315 с заменой Ser-Thr (77% и выше) [5,29,34,75,98,103,109]. Однако, есть регионы РФ, где встречаемость данной мутации была невысокая, например, в Омской области – менее 50% [123]. Наиболее часто в гене *katG* 315 в РФ встречается мутация Ser

315-Thr1 – более 90% [5,74]. В западных странах, США и большинстве стран Азии встречаемость мутации Ser 315-Thr1 была гораздо ниже: в США – 42,2%, в Италии – 64,8%, в Великобритании – 58,4%, Корея – 31,1% в Гонконге – 45,2%, в Китае – 56,6%. Более близкая к Российской частота данных мутаций встречалась в Германии – 84,5% [74]. Стоит отметить, что повсеместно частота мутаций Ser 315-Thr2 низкая ( $\leq 2\%$ ) кроме США (20,4%). Также отмечается большое количество штаммов с устойчивостью к изониазиду с очень редко встречающейся мутацией в промоторной области *ahpC* -46(G->A) в Великобритании (23,8%) [74].

По результатам исследований 2011-2018 гг., проведенных в России, было отмечено, что в большинстве штаммов МБТ, устойчивых к рифампицину, выявлена мутация в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu (в среднем 84,75%) [5,75,98,109]. Аналогичный результат получен в странах СНГ [29]. По информации Международной базы данных TB Drug Resistance Mutation Database в большинстве географических регионов данный вид мутаций среди устойчивых к рифампицину штаммов представлен в 50%–60%. Близкие к этим цифры получены и в некоторых областях РФ, например, в Ярославской, Омской [123]. Стоит отметить, что в Китае замена Ser-Leu в 531 кодоне гена *rpoB* встречалась всего в 35,75% [74].

Отмечается, что достаточно часто в странах Азии встречались мутации в 526 кодоне гена *rpoB* у штаммов МБТ, устойчивых к рифампицину – от 16,5% до 39,7%. В РФ, как и в странах Европейского региона, данная мутация встречалась реже и практически с аналогичной частотой (11%-13%) [5,74].

Стоит отметить, что у ВИЧ инфицированных больных туберкулезом также как и у ВИЧ негативных, отмечается наибольшая частота мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду и рифампицину в гене *katG* с заменой Ser315-Thr1 и в 531кодоне гена *rpoB* с заменой Ser531-Leu соответственно [108].

Для выявления штаммов МБТ с преШЛУ проводится определение мутаций, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, в генах *gyrA* и *gyrB*. Фторхинолоны ингибируют фермент ДНК-гиразу, состоящую из двух субъединиц

– А и В. По данным публикаций, в России среди мутаций, связанных с ЛУ МБТ к фторхинолонам, значительно преобладают мутации в гене *gyrA*. При этом наиболее часто выявляются мутации в 94 кодоне с заменой Asp-Gly (35,6% – 66%). Также достаточно часто встречаются мутации в гене *gyrA90* с заменой Ala-Val (15,3%–20,9%) [5,85,118,175].

При анализе мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к ПТП, отмечается, что соотношение выявляемых мутаций не меняется существенно с течением времени, но, в то же время, сужается их спектр.

#### **1.2.4. Распространенность генотипов микобактерий туберкулеза в мире и Российской Федерации**

В настоящее время имеется 36 генетических семейств, среди которых наиболее изучены и распространены следующие: *M. Beijing* (пекинское семейство), *M. africanum*, *M. bovis*, LAM (латиноамерикано-средиземноморское семейство), Haarlem (европейское семейство), EAI (восточноафрикано-индийское семейство), CAS (центрально-азиатское семейство), T (широко распространенное, но недостаточно изученное семейство) [9,113,169].

По данным литературных источников наибольшее распространение штаммов МБТ линии *Beijing* отмечено в Восточно-Азиатской, Центрально-Европейской, и Южно-Африканской зонах. Наименьшая частота встречаемости штаммов *M. tuberculosis* генотипа *Beijing* регистрируется в странах Южной Америки [113]. Достаточно низкий уровень распространенности данного генотипа отмечается в странах Центральной Америки и некоторых странах Европы (например, Германия, Ирландия) [55]. Историческим центром распространения генотипа *Beijing* признан Китай [112]. Второй большой областью распространения «пекинского штамма» являются страны бывшего СССР, и третьим регионом признана ЮАР [112,113,186].

Среди популяции МБТ в России преобладают штаммы генетического семейства *Beijing* (от 50 % до 80 %) [13,113,139,194]. Доказано, что штаммы МБТ семейства *Beijing* часто являются лекарственно-устойчивыми, в основном с МЛУ,

вызывают более тяжелое течение туберкулеза [9]. В исследованиях показано, что тяжесть течения заболевания обусловлена массивными изменениями в легких и деструктивными изменениями [29,33,58,70,113].

Другой, часто встречаемый как в странах мира, так и на территории России генотип МБТ – LAM [58]. Ряд авторов отмечают, что штаммы данного генотипа часто встречаются у больных с хроническим течением туберкулеза и характеризуются достаточно высоким уровнем ЛУ МБТ [212]. В РФ чаще всего данный генотип встречается в Центральном ФО – от 10% до 45%. Частота выявления LAM в Сибирском ФО составляет от 8 % до 17 %, в Северо-Западном – около 9 % [65,66,184].

Достаточно часто на территории РФ регистрируются штаммы МБТ генотипа Haarlem [113]. Также данный генотип МБТ часто встречается в Центральной Африке, странах Южной Америки, Латинской Америки и США [55,200]. Исследования, проведенные в Уральском регионе, показали, что на данной территории достаточно часто встречались штаммы генетического семейства LAM(AI) и Haarlem – 8,8% и 5,4% изолятов соответственно [21,66,107].

Частота распространенности семейств – LAM и Haarlem являются вторыми по распространенности в Российской Федерации. В Северо-Западных областях России доля данных генетических семейств МБТ составляет 14,5% и 13,3% соответственно [55,155,193].

Еще одним генетическим семейством, распространенным в РФ, является Ural, относящимся к Евро-Американской линии, как и семейство LAM [193]. На территории европейской части РФ частота встречаемости генотипа Ural составляет 4-5 %. Данное генетическое семейство характерно как для Уральского региона, так и для Саратовской, Омской, Мурманской областей, Республики Карелия [28,71,141]. В исследовании, проведенном в Уральском регионе, доля штаммов генотипа Ural составила 11,8%, при этом 28,6% штаммов МБТ были мультирезистентны [55,65,66].

В Приволжском федеральном округе исследования по распространенности генотипов проводились в Самарской и Саратовской областях [40,71,72],

обобщённая распространённость генотипа Beijing составляла 58,5%. Вторыми по распространённости в Саратовской области являются штаммы *M. tuberculosis* семейства Haarlem – 27,5%. В Самарской области доля штаммов группы Евро-Американской линии составила 23,2%. Из них наибольшее количество штаммов относилось к группам LAM (8,9%) и URAL (7,5%) [40,58,72]. Среди прочих генотипов на территории России встречаются штаммы генотипов T (с преобладанием T1), T1\_RUS и MANU2. Так, в Республике Саха (Якутия) семейство T является вторым по распространённости (11,7%) [122].

Генетическое семейство T является наиболее филогенетически древним, широко распространённым, но недостаточно изученным. По данным исследователей, генотипы МБТ семейства T сопряжены с более легкими формами туберкулеза, так как значительно чаще регистрируются у больных с ограниченными формами туберкулеза [9,107].

По данным литературных источников на территории Северо-Запада России распространённость штаммов генетического семейства группы T составляет 11,1%–17,7% [37,113,141].

Представляют интерес исследования, проведенные в Китае и Монголии, имеющие протяженные границы с Россией. Было выявлено, что в Китайской провинции Хэбэй среди изолятов, не относящихся к пекинскому семейству, штаммы МБТ генотипа T составляли 62,9% [160]. Среди штаммов из приграничных районов Монголии на втором месте по распространённости после генотипа Beijing (77,2%), также располагались изоляты генетического семейства: T1 8,8%, далее по 3,5% составляли генотипы, LAM и H [120].

### **1.3. Нетуберкулезные микобактерии**

#### **1.3.1. Эпидемиологические аспекты**

Нетуберкулезные микобактерии повсеместно распространены в окружающей среде, и рассматриваются как условно-патогенные бактерии или сапрофиты. НТМБ – это представители рода *Mycobacterium*, относящиеся к группе грамположительных кислотоустойчивых неспорообразующих бактерий. В

настоящее время в группу НТМБ входят более 200 видов, из которых около 50 вызывают микобактериоз – заболевание, по клинико-рентгенологической симптоматике схожее с туберкулезом [22,38,163,179,181,190,202]. Наиболее характерным отличием группы НТМБ от комплекса возбудителей туберкулеза *M. tuberculosis* является тот факт, что в настоящий момент нет доказательств их передачи от человека к человеку.

Во многих публикациях водный фактор, т. е. образование аэрозолей, расценивается как наиболее важный для инфицирования нетуберкулезными микобактериями. Соответственно, наиболее часто входными воротами является дыхательная система [52,174]. Кроме того, имеются данные по довольно частому выявлению НТМБ в водопроводной системе. В большинстве случаев группа нетуберкулезных микобактерий представлена видами *M. lentiflavum*, *M. tusciae*, *M. gordonae* [2].

Изучив литературу по данному вопросу необходимо отметить, что по данным зарубежных и российских источников наиболее подробно описаны пять комплексов НТМБ: *M. avium complex*, *M. fortuitum complex*, *M. terrae complex*, *M. mageritensis-phocaicum complex*, *M. intracellulare-chimaera complex* [77,78,202].

Несмотря на то, что НТМБ рассматриваются как условно-патогенные бактерии, во всем мире растет заболеваемость микобактериозом, что, возможно, связано с изменением иммунологической реактивности популяции человека, ухудшением экологической и эпидемиологической обстановки [53,90,181,189,190].

Имеются сообщения о возможности циркуляции НТМБ в медицинских организациях [53], однако, этот фактор сложно проверить по причине отсутствия требований обязательной идентификации наличия или отсутствия НТМБ в объектах организации лечебного профиля при проведении микробиологического мониторинга.

Проведенный обзор зарубежной и отечественной литературы выявил, что в распространении НТМБ заметную роль играет снижение общей резистентности и иммунной защиты организма в результате онкологических заболеваний, ВИЧ

инфекции [90,189,190,201]. Также в группу риска по заболеванию микобактериозом входят пациенты с хроническими заболеваниями, а также постоянно применяющие гормональную терапию, иммунодепрессанты и антибиотики [53,77,116,189]. Так, у лиц с хроническими заболеваниями органов дыхания риск развития микобактериоза увеличивается в 16,5 раз [77,116]. Имеются данные о влиянии генетической предрасположенности к развитию данной патологии [52]. В ряде публикаций отмечается, что в группу риска входят и лица, излечившиеся от туберкулеза, а также и больные туберкулезом (микст-инфекция) [77,89,116]. Представляют интерес данные, что заболеваемость микобактериозом в мире растет на фоне снижения заболеваемости туберкулезом [56,159,201,204]. Также в литературе есть данные о более частом развитии микобактериоза у пациентов пожилого возраста и женщин [189].

По данным Т.Ф. Оттен около 70% больных микобактериозом имеют стертую клиническую картину или ее отсутствие и выявляются при профилактических осмотрах [52,90].

На развитие патологии влияет и вирулентность возбудителя. Например, из 4-х описанных подвидов *M. avium* только один (*M. hominissuis*) является патогенным для человека [95,163,177].

Кроме того, в последние годы расширились возможности лабораторной диагностики микобактериоза и видовой идентификации НТМБ [162], в связи с чем появляются новые данные по распространению микобактерий, особенно в РФ [60].

### **1.3.2. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий и распространенность микобактериоза в мире и Российской Федерации**

По данным многочисленных публикаций наиболее частыми возбудителями микобактериоза являются НТМБ комплекса МАС (*M. avium-intracellulare complex*), *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. xenopi* [56,159,170,196,201,216]. В литературных источниках отмечается, что первая причина микобактериоза легких в мире – микобактерии комплекса МАС [56]. Данный комплекс превалирует в

США (62%), Канаде (73%), Австралии (78%), в большинстве стран Европы (Германия, Австрия, Дания, Швеция, Норвегия, Финляндия, Ирландия, Бельгия, Нидерланды, Испания, Италия и др.), при этом в странах Северной Европы МАС отмечались чаще, чем Южной (44% против 31%). Также НТМБ комплекса МАС играют ведущую роль в Китае, Корее, Японии [12,190,201,203,205,216].

Стоит отметить, что в большинстве опубликованных исследований, особенно зарубежных авторов, комплекс МАС как этиологический фактор рассматривается в целом, без деления на виды НТМБ [22,52,201,203,216].

В мире наблюдается видовое разнообразие НТМБ, вызывающее патологический процесс в легких в зависимости от региона, страны выделения. Так, например, в Южной Африке, США, Японии, Швейцарии кроме МАС частыми этиологическими факторами микобактериоза является *M. kansasii*, а в Шотландии, Канаде, Англии *M. xenopi* [16]. Отмечается, что *M. xenopi* наиболее широко распространены в Венгрии, а *M. kansasii* в Польше и Словакии [61,203].

В ряде стран, таких как Греция, Тайвань, Индия, Южная Корея доминирующими НТМБ являются быстрорастущие *M. abscessus*, *M. fortuitum* [12,199,203,216,222].

В Российской Федерации мало данных по выявлению НТМБ и распространенности микобактериоза в различных территориях. Наиболее изученными являются регионы Северо-Западного федерального округа РФ, г.Москва [12,16,52,56,89]. По данным исследований, проведенных в 2012–2018 гг., как и в большинстве европейских стран, в регионах, представляющих Северо-Западный округ, наиболее распространенными являлись НТМБ комплекса МАС. При этом в подавляющем большинстве выделялись *M. avium* – от 31,5% до 61,0% в зависимости от региона [12]. Реже выявлялись другие виды НТМБ, причем их распространенность в регионах округа была различной. Например, в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, а также в Архангельской области на втором месте по распространенности были *M. intracellulare* (11,3% и 11,9% соответственно) [12,24,61], в Калининградской, Псковской областях – *M. fortuitum* (11,0% и 12,0% соответственно), в Республике Карелия – *M. gordonae* (26,0%). В



Новгородской области вторыми по распространенности были виды *M. kansasii* и *M. intracellulare* (по 25,0%), в Вологодской области – *M. fortuitum* и *M. abscessus* (по 20%) [12].

В исследованиях, проведенных в Москве, показано, что наиболее часто от больных микобактериозом выделяли медленно растущие НТМБ: *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. xenopi* и *M. intracellulare* [12]. Среди быстрорастущих микобактерий чаще всего в Московском регионе определялись *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* [16].

Сотрудниками микробиологического отдела ЦНИИТ было проведено исследование культур НТМБ из разных регионов РФ. Было показано, что в европейской части Приволжского и Центральном федеральных округах, в г. Калининграде, в г. Оренбурге среди медленно растущих преобладали НТМБ комплекса МАС, при этом чаще всего выделялись *M. avium*. В то же время было выявлено, что в г. Перми и в г. Ростове-на-Дону частота встречаемости МАС была практически равна частоте встречаемости *M. gordonae* [68].

Стоит отметить, что в настоящее время в РФ отсутствуют нормативные, правовые и методические документы, которые бы регулировали и определяли порядок организационных, профилактических, диагностических и лечебных мероприятий при инфекции, вызываемой НТМБ.

### **1.3.3. Лекарственная устойчивость нетуберкулезных микобактерий**

В связи с возрастающим количеством лиц, заболевших микобактериозом, остро стоит проблема их лечения. Это во многом связано с природной устойчивостью НТМБ к большинству ПТП [48,49,50]. Кроме того, по ряду объективных причин в бактериологических лабораториях фтизиатрических учреждений РФ не проводятся исследования по определению ЛЧ НТМБ. В тоже время, в Российской Федерации нет стандартов определения ЛЧ НТМБ [49]. Единственным документом, регламентирующим постановку и интерпретацию тестов на ЛЧ, являются рекомендации Института по клиническим и лабораторным стандартам США (CLSI), в котором не проработаны пограничные

концентрации препаратов для разных видов НТМБ [161]. Особенно это актуально для МАС, наиболее часто вызывающими микобактериоз [49]. В большей части публикаций изучается лекарственная чувствительность/устойчивость этих видов.

L. Neifets обобщил результаты исследований в отношении ЛЧ *M. avium*. Были представлены следующие данные: к амикацину были чувствительны 3,2% штаммов, 12,8% были устойчивы, остальные штаммы имели пограничную или низкую степень устойчивости. Аналогичные показатели для рифампицина составили 19,4% и 3,2%; для рифабутина – 20,4%, и 4,8%; для стрептомицина – 35,5 % и 0%; для этионамида – 32,2%, и 32,3%; для этамбутола – 67,0%, и 2,9%; для ципрофлоксацина – 28,3%, и 17,4% [180,183]. Авторы исследований не обнаружили чувствительных штаммов к изониазиду, а устойчивых было 29,0% [180,182,183].

По данным Renvoise и соавт. *M. avium* были более устойчивы к кларитромицину, чем *M. intracellulare*, но чувствительность к амикацину была практически сопоставима [211]. Исследования Н. Tomioka и соавт. не выявили отличия обоих видов в чувствительности/устойчивости к изониазиду, однако в отношении рифампицина, рифабутина, стрептомицина, амикацина, этамбутола *M. avium* были более устойчивы, а к ципрофлоксацину более чувствительны, чем *M. intracellulare* [217]. Z. Zhang и соавт. показали, что *M. avium* более устойчивы к моксифлоксацину и линезолиду, а *M. intracellulare* более устойчивы к рифампицину [168].

Для изучения ЛЧ НТМБ чаще всего используется количественный метод серийных разведений в жидкой питательной среде для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибактериальных препаратов [48].

В ряде публикаций приведены результаты сравнительного анализа ЛЧ *M. avium* и *M. intracellulare*. Так, сотрудниками отдела микробиологии ЦНИИТ было выявлено, что 78,8% исследованных штаммов *M. avium* и 66,7% штаммов *M. intracellulare* устойчивы к 8 препаратам панели SLOWMYCO для медленно растущих микобактерий (TREK Diagnostic Systems, Thermo Scientific, США), три штамма *M. avium* из 33 были чувствительны только к кларитромицину

[49]. Результаты исследования, проведенного Московским научно–практическим центром борьбы с туберкулезом, также показали, что *M. avium* более устойчивы к лекарственным препаратам, чем *M. intracellulare* [50].

Отмечено, что практически нет исследований, характеризующих ЛЧ НТМБ с эпидемиологической точки зрения, т.е. включающие данные региона в целом. Например, можно оценивать данные, полученные в МНПЦБТ, так как в лабораторию данного центра поступают культуры со всех районов г.Москвы. Но в публикациях других авторов приводятся данные по ЛЧ НТМБ лиц из отдельных муниципальных образований, городов регионов РФ, обследованных в отдельных лечебных учреждениях городов РФ [48].

Таким образом, необходимо накапливать и обобщать данные с других территорий, как правило, имеющих свои территориальные, коммуникативные, социальные и другие особенности.

#### Резюме.

Анализ литературных источников показал, что проблема своевременного выявления туберкулеза не решена, что связано с недостаточной эффективностью лечебно-диагностических мероприятий в учреждениях ОЛС, особенно в первичном звене.

В единичных публикациях отмечается наиболее оптимальным использование системы GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США) для скрининга кашляющих больных на амбулаторном этапе, но дороговизна исследования является основным сдерживающим фактором [167,206].

Рост лекарственно-устойчивого туберкулеза, особенно с МЛУ и ШЛУ МБТ является большой проблемой для здравоохранения, что во многом связано с биологическими свойствами возбудителя. Обзор литературы показал, что лишь в ряде регионов РФ имеются данные по генотипическому разнообразию микобактерий туберкулеза, спектру мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью.

Анализ литературных источников, связанных с изучением нетуберкулезных микобактерий, показал, что на фоне снижения заболеваемости туберкулезом

растет заболеваемость микобактериозом. При этом в России отмечается территориальная гетерогенность популяции нетуберкулезных микобактерий.

В связи с вышеизложенным, в Республике Марий Эл представляется актуальным изучение биологических свойств микобактерий, циркулирующих в регионе, анализ эффективности использования методов для их обнаружения, особенно в лечебных учреждениях нетуберкулезного профиля, оптимизация алгоритма обследования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### ГЛАВА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ

#### 2.1. Оценка эффективности первичного выявления *M.tuberculosis* различными методами у лиц, обследуемых в учреждениях нетуберкулезного профиля

На начальном этапе была оценена эффективность методов, применяемых при обследовании на туберкулез пациентов в учреждениях нетуберкулезного профиля. Согласно Приказу Минздрава от 29.12.14 № 951, для первичного выявления микобактерий (МБ) используют микроскопические методы на наличие кислотоустойчивых микобактерий – с окраской по Цилю-Нильсену или люминесцентный. При получении отрицательного результата трехкратного микроскопического исследования, должно проводиться молекулярно-генетическое исследование на наличие маркеров ДНК МБТ [84].

В Республике Марий Эл (РМЭ) до 2015 года в учреждениях нетуберкулезного профиля для выявления больных туберкулезом максимально использовались хорошо зарекомендовавшие себя в республике микробиологические методы диагностики – микроскопический и культуральный на ППС. При этом микроскопическое исследование диагностического материала по методу Циля-Нильсена проводилось в клинко-диагностических лабораториях (КДЛ) учреждений ПМСП, а культуральное исследование из тех же образцов выполнялось в бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «РПТД». В отличие от других регионов РФ, в РМЭ особенно широко для учреждений нетуберкулезного профиля применялся метод посева диагностического материала на ППС. По сравнению с микроскопическим, данный метод показал достаточную эффективность. Однако, он трудоемкий и сравнительно дорогой. Поэтому, с внедрением метода ПЦР-РВ в практику работы БЛ РПТД, с 2015 года в качестве скринингового метода для выявления больных туберкулезом в учреждениях ОЛС

стали использовать этот метод вместо культурального.

Эффективность выявления микобактерий вышеперечисленными методами у пациентов, обследованных в учреждениях нетуберкулезного профиля, приведена в таблице 4. Данные по скрининговому культуральному исследованию приведены за 2012–2014 гг., а по микроскопическому и методу ПЦР-РВ за 2015–2018гг.

Проведенное исследование показало, что самым эффективным был метод ПЦР-РВ – 5,12% ( $p < 0,01$ ) по сравнению с культуральным – 2,09% и микроскопическим – 0,47%. При этом, культуральный метод также показал достоверную разницу в эффективности выявления микобактерий по сравнению с микроскопическим (Таблица 4) ( $p < 0,01$ ).

Таблица 4 – Эффективность выявления МБТ из мокроты у пациентов с подозрением на туберкулёз, обследованных в учреждениях нетуберкулезного профиля

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

Далее был проведен анализ эффективности выявления МБТ из мокроты пациентов с различными заболеваниями, направленной из учреждений нетуберкулезного профиля на исследование культуральным методом и методом ПЦР-РВ.

Данное исследование показало большую эффективность метода ПЦР-РВ по сравнению с культуральным. Достоверно чаще выявляли микобактерии туберкулеза методом ПЦР-РВ у лиц с первоначальными диагнозами «пневмония» – 5,19% против 3,41% ( $p < 0,002$ ), «подозрение на туберкулез» – 16,78% и 2,38% соответственно ( $p < 0,001$ ) и прочими неспецифическими заболеваниями органов дыхания - 3,39% и 0,6% соответственно ( $p < 0,001$ ). У лиц с бронхитами несколько преобладала выявляемость МБТ культуральным методом на плотных питательных средах над методом ПЦР-РВ – 1,48% против 1,03%, но это различие

недостаточно (p>0,05) (Таблица 5).

Таблица 5 – Выявляемость МБТ культуральным методом и методом ПЦР-РВ у пациентов с различными предварительными диагнозами из лечебных учреждений нетуберкулезного профиля

Причина обследования	Метод обследования					
	Культуральный на ППС			ПЦР-РВ		
	Обследовано пациентов	МБТ+		Обследовано пациентов	ДНК МБТ+	
		Абс.	%		Абс.	%
Острый и хронический бронхит	13593	201	1,48	1355	14	1,03
Пневмония	7769	265	3,41	1369	71	5,19
Подозрение на туберкулез	1765	42	2,38	572	96	16,78
Прочие заболевания органов дыхания*	1630	10	0,6	709	24	3,39
<b>Всего с заболеваниями органов дыхания</b>	<b>24757</b>	<b>518</b>	<b>2,09</b>	<b>4005</b>	<b>205</b>	<b>5,12</b>

Примечание: \* В графу «Прочие заболевания органов дыхания» входят данные по обследованию кашляющих пациентов, в сопроводительных документах которых указано: обследование по поводу кашля, саркоидоз, онкологические заболевания, плеврит, пневмо- и гидроторакс

Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что наиболее эффективным и информативным микробиологическим методом для скрининговых исследований по выявлению больных туберкулезом в учреждениях нетуберкулезного профиля является метод ПЦР в реальном времени. Применение культурального метода нецелесообразно вследствие длительности получения результатов и трудоемкости.

В то же время микроскопический метод по Цилю-Нильсену продолжает сохранять свою актуальность, так как простота метода и быстрое получение результатов позволяет выявлять наиболее эпидемически значимых больных туберкулезом с массивным бактериовыделением. Кроме того, выявление КУМ при отрицательном результате ДНК МБТ может указывать на наличие у пациента нетуберкулезных микобактерий.

## 2.2. Эффективность выявления микобактерий туберкулеза по данным специализированной бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «Республиканский противотуберкулезный диспансер»

Дообследование пациентов с обязательным исследованием двух образцов диагностического материала методами люминесцентной микроскопии и молекулярно-генетическим, а также культуральные исследования на ЖС и ППС проводили на базе бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «РПТД».

Для оценки эффективности перечисленных выше методов выявления МБ был проведен анализ параллельных результатов исследований, выполненных из 8575 образцов различных видов диагностического материала (Таблица 6). При этом для исследования мочи из культуральных применяли только метод посева на ППС.

Таблица 6 – Выявляемость МБТ из различных видов диагностического материала при исследовании одного образца разными методами в 2015–2018 гг.

Виды диагностического материала	Формат показателя	Методы			Коэффициент достоверности (p)		
		ПЦР-РВ (1)	Культуральные (2)	Микроскопия (3)			
		Число образцов с положительным результатом			P (1-2)	P (1-3)	P (2-3)
Мокрота (N=6816)	Абс.	1437	1203	737	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	%	21,08	17,65	10,81			
Моча (N=895)	Абс.	25	7	1	p=0,003	p<0,001	p>0,05
	%	2,79	0,78	0,11			
Плевральный экссудат (N=442)	Абс.	66	35	11	p=0,002	p<0,001	p<0,001
	%	14,93	7,92	2,49			
Операционный материал (N=260)	Абс.	238	69	212	p<0,001	p=0,002	p<0,001
	%	91,54	26,54	81,54			
Промывные воды бронхов (N=162)	Абс.	25	9	6	p=0,007	p<0,001	p>0,05
	%	15,43	5,56	3,70			
Всего (N=8575)	Абс.	1791	1323	967	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	%	20,89	15,43	11,28			



Исследование показало, что достоверно выше была эффективность выявления МБТ методом ПЦР-РВ для всех видов диагностического материала (Таблица 6). Стоит отметить ценность метода ПЦР-РВ для олигобациллярных диагностических материалов. Так, выявляемость ДНК МБТ из промывных вод бронхов составила 15,43% (25/162), из плеврального экссудата – 14,93% (66/442), из мочи – 2,79% (25/895).

При сравнении эффективности культуральных и микроскопического методов в отношении промывных вод бронхов и мочи не было выявлено достоверных различий ( $p>0,05$ ). При исследовании операционного материала различия между всеми методами были достоверны ( $p<0,05$ ). При этом методы ПЦР-РВ и люминесцентная микроскопия показали наибольшую эффективность выявления – 91,54% (238/260) и 81,54% (212/260) соответственно, а эффективность культурального метода была сравнительно низкой – 26,54% (69/260).

При сравнении эффективности выявления бактериовыделителей вышеуказанными методами среди впервые диагностированных больных ТБЛ, отмечается несколько иная ситуация (Таблица 7).

Таблица 7 – Выявляемость бактериовыделителей различными методами исследования среди впервые выявленных больных ТБЛ с наиболее часто встречающимися формами туберкулёзного процесса в 2015–2018 гг.

Формы туберкулёзного процесса	Число обследованных больных	Методы исследования					
		Культуральные		Микроскопические		ПЦР-РВ	
		Число положительных результатов					
		МБТ+	%	КУМ+	%	ДНК МБТ+	%
Диссеминированный	185	180	97,30	150	81,08	179	96,76
Инфильтративный	508	438	86,22	293	57,68	424	83,46
Очаговый	231	98	42,42	33	14,29	91	39,39
Туберкулома	94	38	40,43	15	15,96	35	37,23
Казеозная пневмония	25	25	100,0	25	100,0	25	100,0
<b>Итого</b>	<b>1043</b>	<b>779</b>	<b>74,69</b>	<b>516</b>	<b>49,47</b>	<b>754</b>	<b>72,29</b>

В исследовании сравнивались результаты обследования 1043 лиц с разными формами туберкулезного процесса, взятых на учет в 2015–2018 годах. Среди обследованных лиц 48,71% (508 человек) имели инфильтративный туберкулез, 22,15% (231 человек) – очаговый, 17,74% (185 человек) – диссеминированный, 9,01% (94 человек) – туберкулому и у 2,40% (25 человек) была казеозная пневмония.

Проведенное исследование не выявило зависимости и достоверных различий в выявляемости микобактерий методом ПЦР-РВ и культуральными от формы туберкулезного процесса у впервые выявленных больных ТБЛ для всех форм туберкулезного процесса ( $p > 0,05$ ). В то же время бактериовыделение микроскопическим методом достоверно ниже для всех форм ТБЛ, кроме казеозной пневмонии ( $p < 0,001$ ) (Таблица 7).

При дальнейшем анализе результатов, было выявлено, что у 31 (3,0%) больных МБТ обнаружены только методом ПЦР-РВ, у 60 (5,75%) больных – только культуральным методом, у 7 (0,67%) больных МБТ обнаружены только микроскопическим методом. Кроме того, у 8 (0,77%) больных МБТ выявлены методами ПЦР-РВ и микроскопии при отрицательном результате посева, у 5 (0,48%) больных положительные результаты получены культуральным и микроскопическим методом при отрицательной ПЦР-РВ. Полученные результаты можно объяснить различной кратностью применения методов у одного больного.

Далее было проведено два сравнительных исследования результатов выявления МБТ на ППС и ЖС. В одном из них сравнивалась выявляемость МБТ у лиц, обследованных с целью диагностики, во втором – результаты выявления МБТ у впервые выявленных больных ТБЛ.

С диагностической целью было исследовано 5218 образцов мокроты. В соответствии с протоколом исследования на ЖС, одновременно производился посев диагностического материала на ППС – Левенштейна-Йенсена и Финна-П.

Достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) наблюдалась высеваемость МБТ на плотных питательных средах – 15,56% (864/5218), чем в жидкой – 18,32% (956/5218). В 151 (2,89%) образце положительный результат получен только в ЖС, в 50 (0,96%)

образцах – только на ППС. В 298 образцах мокроты, что составляет 5,71%, отмечена контаминация в ЖС, при этом 9 из них дали рост на ППС (Рисунок 1).

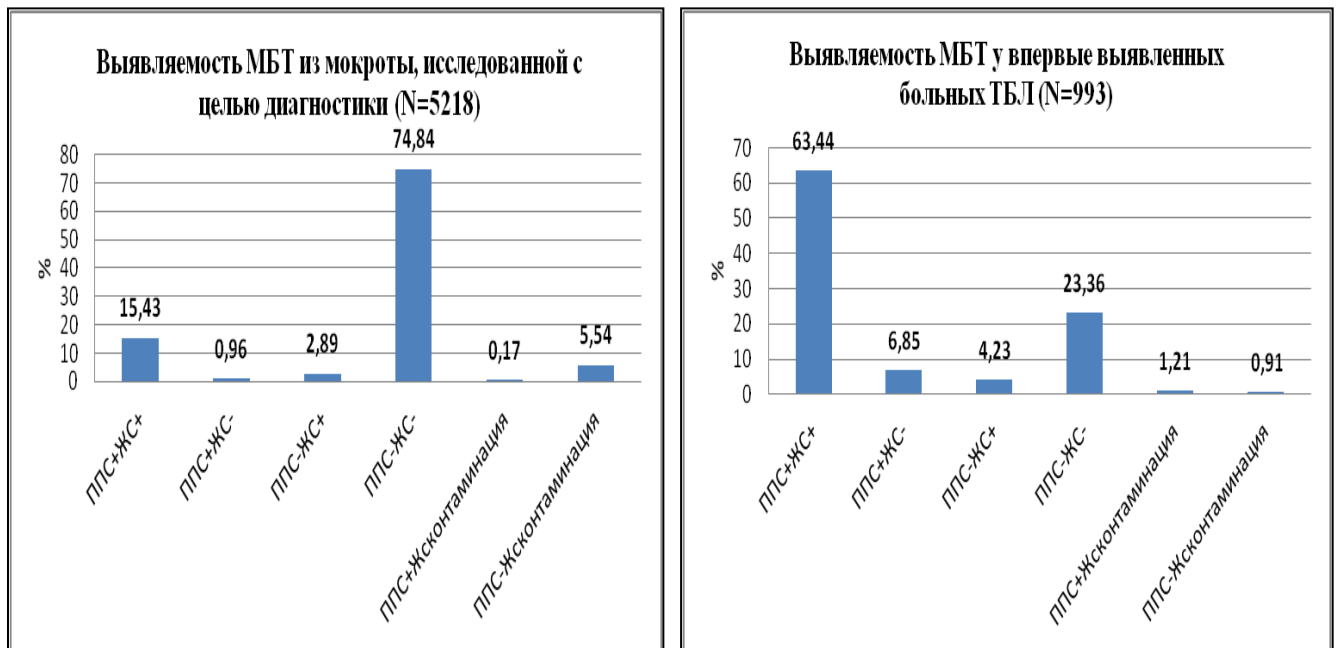


Рисунок 1 – Сравнение выводимости МБТ из мокроты, исследованной с целью диагностики, и у впервые выявленных больных ТБЛ на плотных и в жидкой питательных средах в 2015–2018гг.

Во втором исследовании при анализе результатов выявления МБТ в ЖС и на ППС у 993 впервые выявленных больных ТБЛ, не выявлено достоверных различий ( $p > 0,05$ ). Положительный результат в ЖС был получен у 673 (67,78%) человек, на ППС – у 711 (71,60%) (Рисунок 1). При этом на ППС при отрицательных результатах в ЖС МБТ были выявлены у 6,85% (68/993) больных, а у 4,23% (42/993) больных МБТ выявлены в жидкой питательной среде при отрицательном результате на плотных. У 12 (1,21%) больных положительный результат получен на ППС, в то время как в ЖС отмечалась контаминация.

Таким образом, отмечается разница в полученных результатах в первом и втором исследованиях. 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.

Преимущество выявляемости МБТ у впервые выявленных больных на ППС над быстрыми методами можно объяснить разной кратностью обследования. Кратность первичного обследования у данной категории лиц в РМЭ в 2015–2018 гг. на ППС составила 2,69, в ЖС – 1,09 и методом ПЦР-РВ – 1,91. Из 68 больных ТБЛ с позитивным результатом на плотных средах у 52 (76,48%) диагностический материал в жидкой среде не исследовался.

Таким образом, в результате проведенных исследований для выявления возбудителя у впервые выявленных больных туберкулёзом лёгких установлена высокая эффективность культуральных методов и метода ПЦР-РВ.

В то же время, полученные данные не показали полного совпадения результатов. Поэтому для максимально эффективного выявления возбудителя ТБ в диагностическом материале необходимо использовать комплекс микробиологических методов.

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

В лабораториях практического здравоохранения, выполняющих диагностические исследования по выявлению микобактерий туберкулеза методом ПЦР-РВ, нередко положительные результаты на маркеры ДНК МБТ фиксируются на поздних циклах амплификации – на уровне 35 цикла и выше. Вопрос интерпретации результатов исследования, особенно при нечетких клинических и рентгенологических признаках заболевания и олигобациллярности диагностического материала имеет большое значение для клиницистов при диагностике туберкулеза. Поэтому, целью данного исследования было всестороннее изучение результатов исследований на ДНК МБТ образцов диагностического материала от пациентов, ранее не леченных от туберкулеза, методом ПЦР-РВ, полученных на поздних циклах амплификации.

ДНК МБТ, определенные на поздних циклах амплификации, могут свидетельствовать как об имеющемся у пациента заболевании, так и о

контаминации образца диагностического материала на преаналитическом и аналитическом этапах диагностики ТБ методом ПЦР-РВ.

В исследовании учтены результаты анализов ПЦР-РВ, удовлетворяющие параметрам выборки и не имеющие признаков контаминации образцов диагностического материала на лабораторном этапе. Основанием для подозрения на контаминацию, помимо получения результатов теста ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации, являлась также сомнительная в отношении ТБ клинико-рентгенологическая картина в легких.

В случае поступления образца диагностического материала в БЛ РПТД из ОЛС для исследования на обнаружение ДНК МБТ только методом ПЦР-РВ, образец делили на две аликвоты, с последующей обработкой одной из них инактивирующим реагентом, с последующим выделением и определением ДНК. При получении результата амплификации, подозрительного в отношении контаминации, исследование повторяли со второй аликвотой образца. При, как правило, совпадающих результатах, данные ПЦР анализов пациента включали в исследование.

В случае поступления образца диагностического материала из учреждений ПТС, то помимо теста ПЦР-РВ, параллельно исследовали образец методами посевов в ЖС и на ППС и методом люминесцентной микроскопии с использованием реагентов для пробоподготовки в соответствии с протоколом исследований. При параллельном использовании нескольких методов микробиологической диагностики МБ, вероятность контаминации диагностического материала на стадии пробоподготовки повышается. Подозрение на контаминацию на стадии пробоподготовки возникало при отсутствии контаминации ОКО-В (отрицательные контрольные образцы выделения – 1 на 5 диагностических образцов) и ОКО (отрицательный контроль определения ДНК МБТ), а также при получении положительных результатов у близкорасположенных к анализируемому образцов диагностического материала. Результаты исследования второй аликвоты образца, как правило, были аналогичны. Поэтому при использовании комплекса методов для

микробиологической диагностики ТБ запрашивали повторную порцию диагностического материала. При получении положительных результатов ДНК МБТ из повторной порции материала, пациента включали в настоящее исследование.

Кроме того, с целью внутреннего контроля качества диагностических генотипических исследований, в зонах пробоподготовки, помещениях ПЦР-зоны регулярно проводили смывы на ДНК МБТ.

Таким образом, при выполнении лабораторией всех необходимых мер по предупреждению контаминации, достоверность выдаваемых в клинику положительных результатов ПЦР-РВ достаточно высокая. Поэтому, результаты ПЦР-анализа на поздних циклах амплификации, скорее всего, были получены вследствие олигобациллярности диагностического материала, и количество ДНК МБТ в образце находилось на пределе чувствительности метода (при условии отсутствия ингибиции реакции).

В 2013–2018гг. 1168 лиц, обследованных с диагностической целью, имели положительный результат исследования мокроты методом ПЦР-РВ, из них в 332 (28,42%) случаях позитивный результат тестов был получен на поздних циклах амплификации. При тестировании на ДНК МБТ учитывали результаты обнаружения мультিকопийной вставки *IS6110* и однокопийного гена *regX*. За наименьший пороговый цикл *Ct* в исследовании был принят 35-й, так как с этого цикла отмечали положительный результат теста на *IS6110* и отрицательный на *regX*. Наибольший цикл амплификации, при котором учитывали положительные результаты –40.

Диагностический материал для исследования от 332 лиц с положительными результатами ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации поступал как из медицинских учреждений ОЛС, так и из учреждений ПТУ.

От 35 человек (10,54%) из 332 изучаемых пациентов материал на исследование поступил из учреждений ОЛС, в дальнейшем 34-м пациентам было проведено дообследование в ГБУ РМЭ «РПТД», в том числе культуральными методами на ППС и в ЖС. Диагноз ТБ подтвердился у 45,71% пациентов (16/35),

у 51,43% (18/35) туберкулез не установлен (Рисунок 2).

Большинство изучаемых пациентов – 297 из 332 (89,46%) были обследованы в учреждениях ПТУ. При получении у данной группы положительного результата ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации, в дальнейшем также было проведено дообследование другими методами. В итоге 84,18% пациентов (250/297) поставлен диагноз ТБ и не поставлен 13,80% пациентов (41/297), ещё 6 пациентов в дальнейшем не обследовались (Рисунок 2).

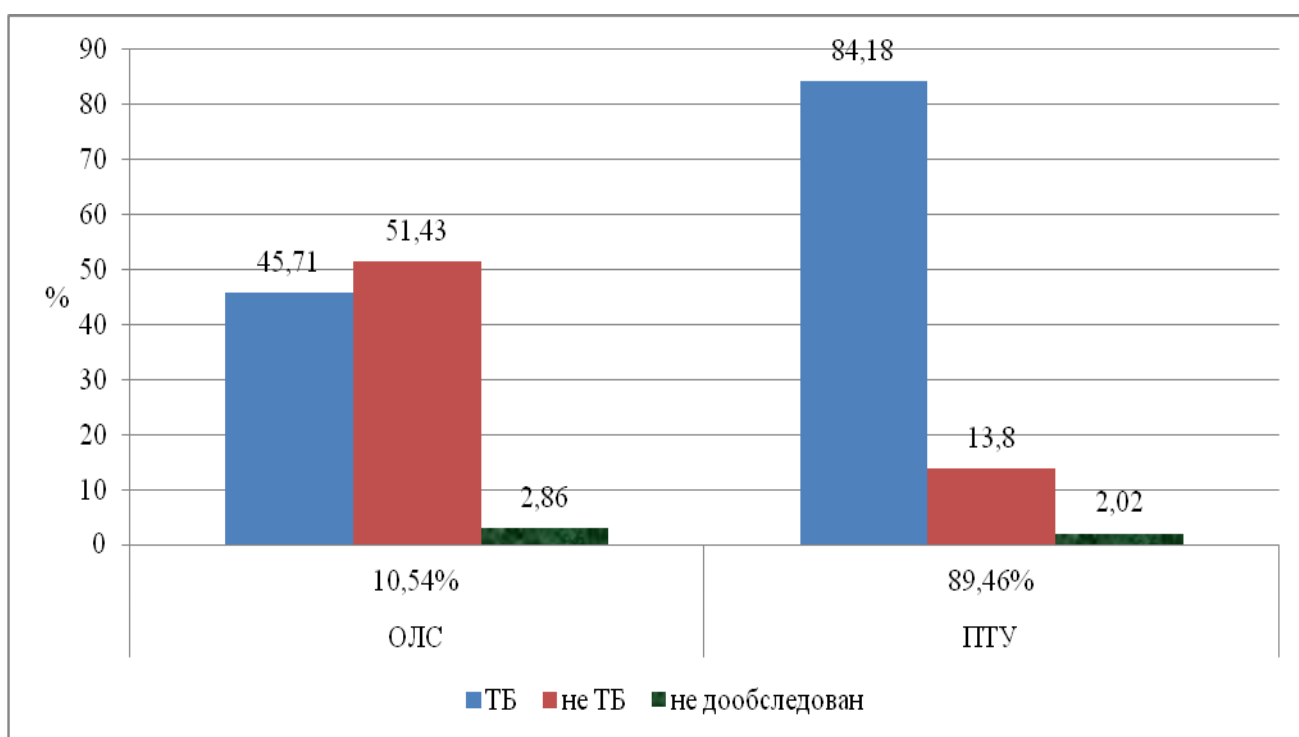


Рисунок 2 – Подтверждение диагноза туберкулез у лиц, обследованных в учреждениях разного профиля, с первоначально положительным результатом теста ПЦР-РВ, полученным на поздних циклах амплификации из образцов мокроты

Таким образом, общее число лиц с положительным результатом теста ПЦР-РВ, полученным на поздних циклах амплификации, у которых диагноз ТБ не подтвердился, составило 59 из 332 (17,8%). Среди данной группы лиц у 15 в дальнейшем диагностировали ХОБЛ, у 11 – пневмонию, у 1 – онкологическое заболевание, 5 лицам обследование проведено по поводу контакта с больными ТБ, по 27 – нет данных. При детальном изучении документации 27 лиц с неустановленным диагнозом было обнаружено, что 26 человек переболели

туберкулезом, самое позднее время взятия их на учет датируется 2007 годом. На момент настоящего обследования все 26 человек были сняты с диспансерного учета по ТБ. Несомненно, что данный факт требует дальнейшего изучения.

Далее был проведен анализ патологических процессов у изучаемых пациентов, по поводу которых они были обследованы методом ПЦР-РВ. Результаты исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Подтверждение диагноза туберкулез при дообследовании лиц с разными 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

Большинство пациентов с результатами ДНК МБТ, выявленными на поздних циклах амплификации, было обследовано по подозрению на ТБ – 62,35% (207/332), из них у 195 из 207 (94,20%) диагноз был установлен; по поводу длительного кашля было обследовано 18,98% (63/332) пациентов, из них ТБ установлен у 42 из 63 (66,67%) лиц; по поводу пневмонии обследовано 10,54% (35/332) пациентов, из них диагностирован ТБ у 23 из 35 (65,71%) лиц (Таблица 8).

Было установлено, что у 232 пациентов из 332 обследованных лиц с результатами ПЦР исследования на поздних циклах амплификации, ДНК МБТ определяли однократно, у 100 – два и более раз.

Наиболее часто ДНК МБТ определяли в диапазоне пороговых циклов Ct 38-36: 38 цикл – 25,90% пациентов (86 из 332), 37 цикл – 24,40% пациентов (81 из



332), 36 цикл – 21,69% пациентов (72 из 332) (Таблица 9).

У 266 человек с анализируемыми пороговыми циклами амплификации диагноз ТБ был подтвержден, что составило  $80,12\% \pm 9,3$  (ДИ 95%; 70,78%; 89,42%). Ниже данного интервала оказался показатель для 40 цикла – (70,0%), несколько выше границ ДИ оказались показатели для 35 цикла (89,80%) и 36 цикла – (90,28%) (Таблица 9).

Таблица 9 – Верификация туберкулеза у лиц с положительным результатом ПЦР-РВ, полученным на различных пороговых циклах амплификации

Цикл амплификации	Число лиц						
	С положительным результатом ПЦР-РВ	С диагнозом ТБ		С другим диагнозом		Не обследованы в дальнейшем	
		Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
35	49	44	89,80	5	10,20	–	–
36	72	65	90,28	7	9,72	–	–
37	81	58	71,61	22	27,16	1	1,23
38	86	66	76,74	16	18,60	4	4,65
39	34	26	76,47	6	17,65	2	5,88
40	10	7	70,00	3	30,00	–	–
Всего	332	266	80,12	59	17,77	7	2,11

У 193 из 266 человек с верифицированным туберкулезом, что составляет  $72,56\% \pm 5,55$  (ДИ 95%; 67,01%; 78,11%), результат анализа ПЦР-РВ был подтвержден культуральными методами, причем у 125 (64,77%) человек из того же образца мокроты. Показатели подтверждения диагноза ТБ для 35 и 36 циклов амплификации оказались выше верхней границы ДИ – 81,40% (35 из 43 человек) и 82,54% (52 из 63 человек) соответственно, показатели подтверждения ТБ ниже ДИ были отмечены для 39 и 40 циклов – 50% (14 из 28 человек) и 33,33% (2 из 6 человек) соответственно. В пределах ДИ подтвердились результаты ПЦР-РВ при 37 и 38 циклах амплификации – 75,44% (43 из 57) и 68,12% (47 из 69) соответственно.

По характеру диагностического материала 332 обследованных пациента распределились следующим образом: слизистый характер мокроты отмечался у

108 (32,53%) лиц, слизисто-гнойный – у 205 (61,75%), гнойный – у 19 (5,72%). Установлено, что у всех лиц при дообследовании диагноз «туберкулез» определялся достоверно чаще, независимо от характера материала (Таблица 10). Таким образом, при изучении влияния характера мокроты на подтверждение диагноза туберкулеза достоверных различий не выявлено ( $>0,05$ ) (Таблица 10). Следовательно, характер мокроты не влияет на диагностику ТБЛ при выявлении ДНК МБТ на поздних циклах амплификации.

Таблица 10 – Верификация ТБ у лиц с положительным результатом ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации в зависимости от характера исследуемой мокроты

Характер мокроты	Обследовано лиц	из них ТБ (I)		из них не ТБ (II)		P (I-II)
		абс	%	абс	%	
слизистая	108	92	85,19	16	14,81	p<0,001
слизисто-гнойная	205	160	78,05	45	21,95	p<0,001
гнойная	19	14	73,68	5	26,32	p=0,01
Всего	332	266	80,12	66	19,88	p<0,001

Достаточно часто диагноз ТБ подтверждался при получении результатов ДНК МБТ на поздних пороговых циклах амплификации при исследовании промывных вод бронхов, плеврального экссудата и ликвора.

Из 47 пациентов с положительным результатом ПЦР-РВ, полученным из промывных вод бронхов, у 24 человек (51,06%) ДНК МБТ обнаружены на поздних пороговых циклах. У 18 человек из 24 (75,0%) в дальнейшем диагностирован ТБ.

У 22 из 84 (26,19%) пациентов с выделенными ДНК МБТ из плеврального экссудата, положительный результат получен на поздних пороговых циклах. Диагноз ТБ установлен у 19 из 22 пациентов, что составляет 86,36%.

18 пациентов имели положительный результат ПЦР-РВ при исследовании ликвора, из них ДНК МБТ на поздних пороговых циклах определили у 5 пациентов (27,78%). В дальнейшем у всех 5 человек (100%) диагностирован туберкулез.

Суммируя результаты проведенных исследований, можно сделать вывод о

том, что при получении положительного результата ПЦР-РВ 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).

Также следует отметить, что из 266 лиц с верифицированным диагнозом ТБ у 193 лиц (72,6%) положительный результат анализа ПЦР-РВ, полученный на поздних циклах амплификации, подтвердился культуральными методами, что указывает на достоверность полученных методом ПЦР-РВ результатов.

Таким образом, 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.

### **ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ И СПЕКТРА ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ МАРИЙ ЭЛ**

Одной из наиболее значимых причин распространения туберкулёза в РФ является рост уровня лекарственно-устойчивого туберкулёза, в том числе ТБ с МЛУ/ШЛУ [88]. Поэтому, необходимо проводить регулярный мониторинг лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза к противотуберкулезным препаратам для оценки проблемы лекарственно-устойчивого туберкулёза.

Надзор за уровнем и распространённостью лекарственной устойчивости МБТ к ПТП выполняется, как правило, с целью определения формирующихся тенденций, оценки схем и результатов лечения, получения данных для совершенствования имеющихся руководств по лечению, а, кроме того, для укрепления лабораторной сети и улучшения работы лабораторной службы, включая совершенствование методов тестирования ЛУ МБТ к препаратам 2-го ряда, повышение надежности получаемых результатов, внедрение методов ускоренного, в том числе – молекулярно-генетического тестирования [3,27,88].

Таким образом, для анализа эпидемиологической ситуации в РМЭ и прогнозирования тенденций её дальнейшего развития необходимо проводить мониторинг показателей ЛУ МБТ и отслеживать изменения профилей резистентности штаммов МБТ, циркулирующих на территории РМЭ.

В Республике Марий Эл всем больным туберкулезом с бактериовыделением определяется ЛЧ МБТ до начала химиотерапии. Самый низкий процент охвата тестированием МБТ на ЛЧ у впервые выявленных больных ТБЛ отмечался в 1997г. (98,41% - 248 из 252) и в 2008г. (98,91% - 272 из 275), в остальные годы, в период с 1998 по 2019 годы процент охвата составлял 99% – 100% бактериовыделителей. В дальнейшем, в процессе химиотерапии, кратность обследования определялась нормативными документами, существовавшими в соответствующие периоды, а также запросами фтизиатров [84,133,134,135,136].

До 2012 года лекарственную чувствительность определяли только методом абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена,

к изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу, канамицину, этионамиду, с 2003 года к ПАСКу, в 2007 году добавили определение ЛУ МБТ к капреомицину и офлоксацину. В 2012 году внедрили тестирование ЛУ МБТ к изониазиду и рифампицину методом ПЦР-РВ, в 2015 году – в жидких средах с помощью ВАСТЕС MIGT 960 к препаратам 1-го ряда, включая пиразинамид (Pza) и с 2018 г. к амикацину (Am), моксифлоксацину (Mox) и левофлоксацину (Lfx) в критических концентрациях [136].

### **3.1. Ретроспективный анализ динамики уровня распространенности и структуры лекарственной устойчивости *M.tuberculosis*, выделенных в Республике Марий Эл на протяжении 20 лет исследования у различных групп больных туберкулезом**

Было проанализировано изменение распространенности и структуры ЛУ МБТ с 1998 по 2019 год. В 1998–2002 годах ЛЧ МБТ определяли к ПТП 1-го ряда: изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу и ПТП 2-го ряда: этионамиду и канамицину в критических концентрациях. ЛЧ МБТ к капреомицину и офлоксацину начали определять с 2006 года.

За более чем 20 летний период мониторинга уровня ЛУ МБТ отмечается рост показателя среди всех контингентов больных ТБЛ (Таблица 11, Рисунок 3 А). Так, уровень ЛУ МБТ хотя бы к одному ПТП в 2019 году по сравнению с 1998 годом среди впервые выявленных больных ТБ достоверно вырос ( $p < 0,001$ ) в 2,1 раза (с 17,72% до 37,90%), среди больных с рецидивами ТБ в 1,7 раз (с 38,60% до 66,67%), при этом рост показателя ниже уровня достоверности ( $p > 0,05$ ).

Следует отметить, что данный показатель у рецидивов резко вырос за период с 1998г. по 2002г. в 1,6 раз (с 38,60% до 63,33%) и держится на высоких цифрах. Среди прочего контингента больных ТБЛ уровень ЛУ МБТ хотя бы к одному препарату в 2019 г. вырос в 1,2 раза по сравнению с 1998г. (с 66,14% до 80,0%) ( $p < 0,05$ ).

Уровень ЛУ МБТ вырос среди всех контингентов больных туберкулезом в основном за счет увеличения уровня МЛУ МБТ (Таблица 11, Рисунок 3 Г).

Таблица 11 – Динамика уровня ЛУ МБТ у различных контингентов больных ТБЛ в период с 1998г. по 2019г.

Контингент	Год	1998		2002		2007		2012		2019	
Впервые выявленные	обследовано лиц	(N=237)		(N=283)		(N=356)		(N=304)		(N=177)	
	спектр устойчивости	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
	любая устойчивость	42	17,72	74	26,15	94	26,40	109	35,86	67	37,90
	монорезистентность	9	3,80	26	9,19	24	6,74	26	8,56	8	4,52
	полирезистентность	28	11,81	20	6,71	30	8,43	28	9,21	24	13,56
	всего МЛУ	5	2,11	28	9,89	40	11,24	56	18,42	35	19,77
Рецидивы	обследовано лиц	(N=57)		(N=60)		(N=55)		(N=46)		(N=15)	
	спектр устойчивости	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
	любая устойчивость	22	38,60	38	63,33	36	65,45	32	69,57	10	66,67
	монорезистентность	5	8,78	4	6,67	2	3,64	6	13,04	-	-
	полирезистентность	8	14,04	10	16,67	9	16,36	4	8,70	2	13,33
	всего МЛУ	9	15,79	24	40,00	26	47,27	22	47,83	8	53,33
прочий контингент	обследовано лиц	(N=251)		(N=341)		(N=296)		(N=245)		(N=85)	
	спектр устойчивости	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
	любая устойчивость	166	66,14	232	68,04	197	66,55	177	72,24	68	80,0
	монорезистентность	35	13,94	26	7,62	7	2,36	10	4,08	2	2,35
	полирезистентность	64	25,50	39	11,44	21	7,09	22	8,98	7	8,24
	всего МЛУ	67	26,69	167	48,97	169	57,09	145	59,18	59	69,41

Так, уровень МЛУ МБТ в 2019г. по сравнению с 1998г. среди впервые выявленных больных достоверно ( $p<0,001$ ) вырос в 9,4 раза (с 2,11% до 19,77%), среди рецидивов в 3,4 раза (с 15,79% до 53,33%) ( $p<0,05$ ), среди прочего контингента в 2,6 раз (с 26,69% до 69,41%) ( $p<0,001$ ). При этом у рецидивов наиболее резкий рост показателя произошел в период с 1998г. по 2002г. – в 2,5 раз (с 15,79% до 40,0%) (Таблица 11, Рисунок 3 Г).

Уровень полирезистентности МБТ в 2019г. по сравнению с 1998г. у впервые выявленных больных вырос – на 14,8% (с 11,81% до 13,56%). Но, отмечается резкое снижение данного показателя в 2002 г. в 1,8 раз по сравнению с 1998г. и в дальнейшем регистрируется его постепенный рост (Таблица 11, Рисунок 3 В).

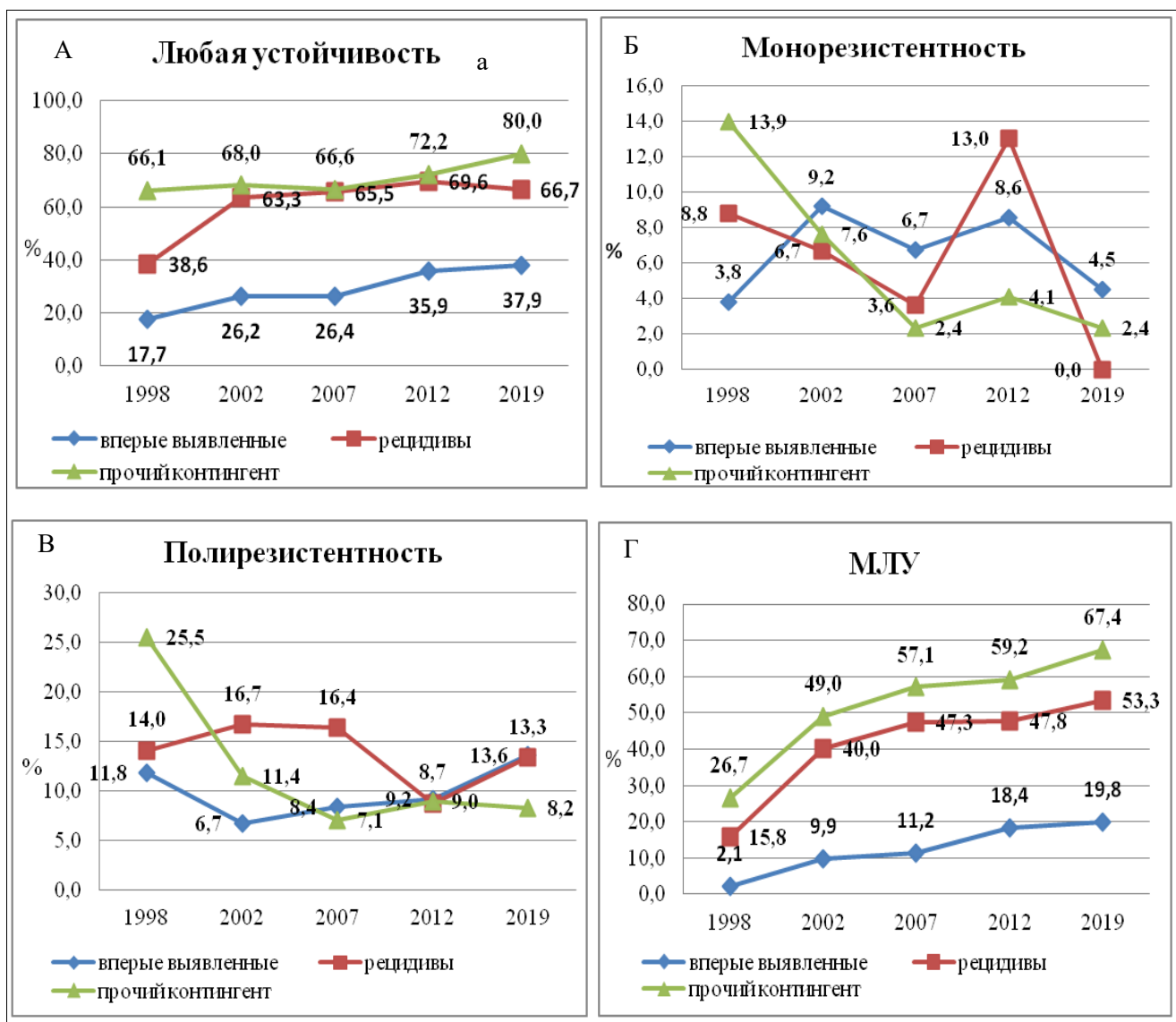


Рисунок 3 – Динамика уровней ЛУ МБТ для различных профилей резистентности у разных контингентов больных ТБЛ (%)

Уровень полирезистентности МБТ среди рецидивов в 2019г. несколько снизился с 1998г. (с 14,04% до 13,33%) (Таблица 11, Рисунок 3 В). При этом, значительное увеличение показателя отмечается в период с 2012 по 2018гг. – в 2,9 раз (с 8,70% до 25,00%). В целом изменение уровня полирезистентности у данных категорий пациентов недостоверно ( $p > 0,05$ ).

Как следует из таблицы 11 и рисунка 3 Б, уровень монорезистентности МБТ у впервые выявленных больных в 2019г. по сравнению с 1998г. увеличился незначительно (с 3,80% до 4,52%). Однако, резкий рост показателя зафиксирован в период с 1998г. по 2002г. (с 3,80% до 9,19%), затем уровень монорезистентности

менялся незначительно и в 2019г. резко снизился по сравнению с 2012г. в 1,9 раза (с 8,56% до 4,52%). Среди рецидивов в 2019г., как и в 2018г., больных с монорезистентностью не было, в 1998г. показатель составлял 8,78%.

Среди прочего контингента, в отличие от впервые выявленных больных ТБЛ и больных с рецидивами, уровни полирезистентности и монорезистентности достоверно снизились в 2019г. по сравнению с 1998г. ( $p < 0,001$  и  $p < 0,05$  соответственно) – полирезистентности в 3,1 раз (с 25,50% до 8,24%), монорезистентности в 5,9 раз (с 13,94% до 2,35%) (Таблица 11, Рисунки 3 Б, В).

В результате проведенного мониторинга ЛУ МБТ за 22-летний период времени установлено, что имеет место значительное распространение лекарственно-устойчивых штаммов среди всех контингентов больных ТБЛ, уровень ЛУ МБТ в целом в РМЭ высокий и имеет тенденцию к росту. Также отмечено, что уровень монорезистентности среди всех контингентов больных ТБЛ имеет тенденцию к снижению. В то же время зарегистрирован высокий уровень с тенденцией к росту штаммов МБТ с МЛУ среди всех контингентов больных туберкулезом легких.

Полученные в исследовании данные также указывают на наличие в регионе бациллярного ядра хронических форм туберкулеза с широким спектром резистентности, что создаёт предпосылки для роста первичной ЛУ. В перспективе это может негативно отразиться на эпидемиологической ситуации по туберкулезу в РМЭ.

### **3.2. Тестирование развернутого спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза, циркулирующих на территории Республики Марий Эл, фенотипическими методами**

В ходе данного исследования был проведен анализ результатов ЛУ МБТ за 2010 и 2019 годы. За данный период времени в РМЭ значительно снизилось количество бактериовыделителей среди впервые выявленных больных ТБЛ (329 человек в 2010г. и 178 в 2019г.), больных с рецидивами ТБЛ (59 человек в 2010г. и 15 в 2019г.) и прочего контингента (218 человек в 2010г. и 85 в 2019г.).



В 2010 и 2019гг. в РМЭ на ЛЧ МБТ было обследовано 326 и 177 впервые выявленных больных туберкулёзом лёгких соответственно, 58 и 15 рецидивов, 218 и 85 лиц прочего контингента соответственно.

В 2010г. ЛЧ МБТ определяли к ПТП 1-го ряда: изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу и ПТП 2-го ряда: офлоксацину, этионамиду, канамицину, капреомицину, циклосерину, ПАСКу методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. В 2019г., в дополнение к вышеуказанным ПТП, определяли ЛЧ МБТ к пиразинамиду, амикацину, левофлоксацину и моксифлоксацину в жидкой среде Middlebrook 7H9. Исследования проводились с помощью анализатора ВАСТЕС MIGT 960 («Becton Dickinson and Company», США).

За 10-летний период наблюдения, несмотря на значительное уменьшение абсолютного количества бактериовыделителей, уровень ЛУ МБТ существенно не изменился у всех контингентов больных ТБЛ (Таблица 12). При этом отмечается некоторое недостоверное ( $p>0,05$ ) снижение уровня монорезистентности у впервые выявленных больных – с 6,44% до 4,52%, у рецидивов снижение показателя произошло с 10,34% в 2010г. до 0% в 2019г.

Также, несмотря на некоторый рост, за указанный период не отмечено достоверных изменений уровня полирезистентности среди всех контингентов больных ТБЛ ( $p>0,05$ ) (Таблица 12).

Отмечено, что уровень устойчивости МБТ к HR у впервые выявленных больных, рецидивов и у прочего контингента больных ТБ держался на высоком уровне, и с 2010г. по 2019г. значительных изменений не происходило ( $p>0,05$ ) (Таблица 12).

Достоверные изменения выявлены у прочего контингента больных – уровень ШЛУ вырос с 19,27% до 38,82% ( $p<0,001$ ); уровень преШЛУ снизился с 33,49% до 21,18% ( $p=0,05$ ).

Как в 2010г., так и в 2019г. среди всех контингентов больных с ЛУ наибольший удельный вес составляли лица с устойчивостью к HR (Таблица 12).

Таблица 12 – Спектр ЛУ МБТ у разных контингентов больных ТБЛ

Показатели	Впервые выявленные					Рецидивы					Прочий контингент				
	2010		2019		коэф. р	2010		2019		коэф. р	2010		2019		коэф. р
	Абс.	%	Абс.	%		Абс.	%	Абс.	%		Абс.	%	Абс.	%	
Обследовано на ЛЧ	326	100	177	100	-	58	100	15	100	-	218	100	85	100	-
Любая устойчивость к ПТП	127	38,96	67	37,85	p>0,05	39	67,24	10	66,67	p>0,05	163	74,77	68	80,00	p>0,05
Монорезистентность	21	6,44	8	4,52	p>0,05	6	10,34	-	-	-	6	2,75	2	2,35	p>0,05
Полирезистентность	40	12,27	24	13,56	p>0,05	5	8,62	2	13,33	p>0,05	13	5,96	7	8,24	p>0,05
из них Н <sup>+</sup> другой препарат, кроме R	36	11,04	20	11,30	p>0,05	5	8,62	2	13,33	p>0,05	11	5,05	7	8,24	p>0,05
из них R <sup>+</sup> др. препарат, кроме H	-	-	1	0,57	p>0,05	-	-	-	-	-	1	0,46	-	-	p>0,05
из них другая полирезистентность	4	1,23	3	1,70	p>0,05	-	-	-	-	-	1	0,46	-	-	p>0,05
Всего H+R + др. препарат	66	20,25	35	19,77	p>0,05	28	48,28	8	53,33	p>0,05	144	66,06	59	69,41	p>0,05
из них МЛУ	35	10,74	11	6,21	p>0,05	13	22,41	2	13,33	p>0,05	29	13,30	8	9,41	p>0,05
из них преШЛУ	25	7,67	21	11,86	p>0,05	9	15,52	2	13,33	p>0,05	73	33,49	18	21,18	<b>p=0,05</b>
из них ШЛУ	6	1,84	3	1,70	p>0,05	6	10,34	4	26,67	p>0,05	42	19,27	33	38,82	<b>p&lt;0,001</b>

При этом у рецидивов и прочего контингента среди лиц с ЛУ к HR значительно преобладали штаммы МБТ с одновременной устойчивостью к препаратам основного и резервного ряда – 78,57% (22 человека) в 2010г. и 87,50% (7 человек) в 2019г. у рецидивов; 86,81% (125 человек) в 2010г. и 89,83% (53 человек) в 2019г. среди прочего контингента больных туберкулезом легких. При этом не отмечается достоверных изменений показателя в указанный период времени ( $p>0,05$ ).

Несколько иная ситуация отмечается у впервые выявленных больных туберкулезом легких. Если в 2010г. среди лиц с устойчивостью к HR было 57,58% (38 из 66 человек) больных со штаммами МБТ с одновременной устойчивостью к ПТП основного и резервного рядов, то в 2019г. удельный вес таких больных увеличился на 34% и составил 77,14% (27 из 35 человек) ( $p=0,05$ ). Таким образом, отмечается расширение спектра ПТП, к которым отмечалась ЛУ МБТ.

У впервые выявленных больных в 2010г. среди 66 штаммов с ЛУ к HR наиболее часто встречались штаммы, устойчивые к HRS и HRSE – по 19,70% (по 13 штаммов) и к HRSEKm – 9,09% (6). В 2019г. также наиболее часто встречались штаммы со спектром устойчивости HRS – 11,43% (4) среди 35 лиц с ЛУ к HR. Но по сравнению с 2010г. удельный вес лиц со штаммами МБТ, устойчивыми к HRSE в 2019г. снизился в 2 раза и составил 5,71% (2 из 35). По 3 штамма (по 8,57%) имели спектр устойчивости HRSEKm и HRSEKmCmAmEtio.

Среди рецидивов с ЛУ к HR в 2010г. преобладали штаммы с устойчивостью к HRSE – 14,29% (4 из 28). В 2019г. не отмечено преобладания штаммов с каким-либо спектром устойчивости.

Среди прочего контингента в 2010 г. среди 144 лиц с ЛУ к HR преобладали штаммы МБТ, устойчивые к HRSE – 9,72% (14); к HRSEKm, HRSEKmCmOflEtio и HRSEKmCmOflEtioPas – по 9,03% (по 13); к HRSEOflEtio и HRSEEtio – по 5,56% (8 и 8); HRSEKmEtio – 4,86% (7). В 2019г. среди 59 лиц с ЛУ к HR у данного контингента наиболее часто имели место следующие профили резистентности: HRSEKmCmOfl – 8,47% (5); по 6,78% (по 4 штамма) HRS, HRSEKmCmEtio, HRSEKmOflEtio, HRSEKmCmOflEtio; по 5,08% (по 3 штамма)

имели спектры ЛУ – HRSKm, HRSEKm, HRSEOfIetio, HRSEKmOfI, HRSEKmCmOfIetioPas, HRSEKmCmOfIetioPasCs, HREKmOfIetio.

В целом, среди всех контингентов больных ТБЛ в 2019г. по сравнению с 2010г. частота встречаемости ЛУ к ПТП основного ряда практически не изменилась ( $p>0,05$ ) (Таблица 13).

Среди впервые выявленных больных и рецидивов не выявлено достоверных различий в уровне резистентности к ПТП резервного ряда за указанный период времени ( $p>0,05$ ).

В то же время, среди впервые выявленных больных в 2019г. можно отметить достаточно высокую частоту встречаемости ЛУ МБТ к пиразинамиду – 8,47% (15 из 177). Также следует отметить достоверную разницу ( $p<0,05$ ) в уровне резистентности среди фторхинолонов – частота встречаемости ЛУ МБТ к офлоксацину значительно выше, чем к моксифлоксацину и левофлоксацину (Таблица 13).

Среди прочего контингента больных туберкулезом легких отмечается достоверное снижение частоты встречаемости ЛУ МБТ к ПАСКу – с 19,27% в 2010г. до 8,24% в 2019 г. ( $p<0,05$ ) и достоверный рост частоты встречаемости ЛУ МБТ к офлоксацину – с 33,95% в 2010 г. до 48,24% в 2019 г. ( $p<0,05$ ) (Таблица 13).

Несмотря на то, что доля ВИЧ-инфицированных среди впервые выявленных больных ТБЛ, а также и доля ВИЧ-инфицированных бактериовыделителей в 2019г. по сравнению с 2010г. достоверно выросла ( $p<0,05$ ), абсолютное количество лиц данной категории небольшое. Так, в 2010 г. выявлено 11 человек среди 485 впервые взятых на учет (2,27%), в 2019г. выявлено 17 из 252 (6,75%). Аналогичная ситуация складывается и в отношении бактериовыделителей МБТ среди данной категории больных – в 2010 г. выявлено 7 человек с ВИЧ инфекцией среди 329 лиц с бактериовыделением МБТ (2,13%), в 2019г. 12 человек из 178 (6,74%) соответственно.

Таблица 13 – ЛУ МБТ к отдельным противотуберкулезным препаратам у разных контингентов больных ТБЛ

ПТП	Впервые выявленные				p	Рецидивы				p	Прочий контингент				p
	2010(N=326)		2019(N=177)			2010(N=58)		2019(N=15)			2010(N=218)		2019(N=85)		
	Абс.	%	Абс.	%		Абс.	%	Абс.	%		Абс.	%	Абс.	%	
H	109	33,44	58	32,77	>0,05	33	56,90	10	66,67	>0,05	157	72,02	68	80,00	>0,05
R	67	20,55	36	20,34	>0,05	28	48,28	8	53,33	>0,05	146	66,97	59	69,41	>0,05
E	46	14,11	23	12,99	>0,05	20	34,48	6	40,00	>0,05	134	61,47	51	60,00	>0,05
S	110	33,74	58	32,77	>0,05	35	60,34	9	60,00	>0,05	156	71,56	60	70,59	>0,05
Pza	-	-	15	8,47	-	-	-	2	13,33	-	-	-	1	1,18	-
Km	28	8,59	17	9,60	>0,05	13	22,41	4	26,67	>0,05	92	42,20	46	54,12	>0,05
Cm	16	4,91	7	3,95	>0,05	9	15,52	2	13,33	>0,05	62	28,44	28	32,94	>0,05
Am	-	-	6	3,39	-	-	-	1	6,67	-	-	-	2	2,35	-
OfI	15	4,60	11	6,21	>0,05	9	15,52	6	40,00	>0,05	74	33,95	41	48,24	<b>&lt;0,05</b>
Mox	-	-	3	1,70	-	-	-	2	13,33	-	-	-	1	1,18	-
Lfx	-	-	1	0,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etio	21	6,44	22	12,43	>0,05	19	32,76	5	33,33	>0,05	89	40,83	33	38,82	>0,05
Pas	13	3,99	5	2,82	>0,05	7	12,07	3	20,00	>0,05	42	19,27	7	8,24	<b>&lt;0,05</b>
Cs	1	0,31	4	2,26	>0,05	-	-	-	-	-	7	3,21	7	8,24	>0,05

Таким образом, ЛУ МБТ у ВИЧ инфицированных больных ТБЛ не оказывает значительного влияния на уровень ЛУ МБТ в целом, в связи с чем, данный показатель ЛЧ анализировали за весь период с 2010 по 2019 годы суммарно. За 10 летний период протестировано на ЛЧ МБТ 98 впервые выявленных бактериовыделителей ТБЛ+ВИЧ. Из них ЛУ МБТ выявлена у 57 человек (58,16%). При этом 5 штаммов МБТ были монорезистентны (5,10%), 18 штаммов полирезистентны (18,37%), у 34 человек выявлены штаммы МБТ с устойчивостью к HR (34,70%). Большинство штаммов МБТ с ЛУ к HR – 47,06% (16 из 34) – имели преШЛУ ( $p=0,009$ ). Уровень ШЛУ МБТ составлял 5,10%, что выше, чем данный показатель среди впервые выявленных больных за последнее десятилетие.

Таким образом, в РМЭ среди больных ТБЛ сформировалось достаточно значимое ядро лиц с устойчивостью к HR. При этом за десятилетний период отмечается снижение на 36,8% удельного веса больных с преШЛУ МБТ с одновременным ростом на 101,5% удельного веса больных с ШЛУ МБТ среди прочего контингента лиц с ТБЛ, что, скорее всего, оказывает влияние на высокий процент штаммов МБТ, устойчивых к HR, и особенно, на высокий уровень преШЛУ МБТ у впервые выявленных больных. Рост уровня ШЛУ МБТ среди прочего контингента коррелируется с достоверным ростом уровня устойчивости к офлоксацину.

### **3.3. Определение спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам у штаммов *M.tuberculosis*, выделенных в Республике Марий Эл**

Среди 2007 образцов ДНК МБТ, выделенных от лиц с ТБЛ в 2013-2019гг. и протестированных на устойчивость к изониазиду (H) и рифампицину (R), мутации, связанные с устойчивостью МБТ к данным препаратам были выявлены у 794 лиц. Из них у 583 человек выявлены мутации, ассоциированные с ЛУ к H и R, у 206 человек только к H и у 5 только к R.

Среди лиц с МЛУ МБТ (583) связанные с устойчивостью мутации и кодоны в генах *rpoB*, *katG315* и *inhA* были изучены у 310 образцов ДНК МБТ от впервые выявленных больных, 64 от рецидивов, 170 от прочего контингента больных ТБЛ и 39 от ВИЧ инфицированных больных. 58 образцов и культур ДНК МБТ с МЛУ были исследованы на наличие мутаций, ассоциированных с ЛУ к фторхинолонам в гене *gyrA*. Достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) в РМЭ у всех контингентов больных ТБЛ с МЛУ образцы ДНК МБТ имели мутации в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu и в *katG315* с заменой Ser-Thr1 – 63,64% (371/583) (Таблица 14).

При этом данное сочетание мутаций у впервые выявленных больных встречалось в 64,19% (199/310), среди рецидивов в 68,75% (44/64) и среди прочего контингента в 63,53% (108/170), среди больных ТБ/ВИЧ в 51,28% (20/39) случаев. Различия удельного веса данного сочетания мутаций между контингентами больных не выявлено ( $p > 0,05$ ). Также можно отметить, что среди всех контингентов больных, кроме ТБ/ВИЧ, довольно часто встречалось сочетание мутаций в гене *rpoB531* с заменой Ser-Leu с одновременными мутациями в генах в *katG315* (Ser-Thr1) и *inhA C(-15)T*. Так, у впервые выявленных больных данное сочетание отмечено в 45 (14,52%) случаев, у рецидивов – в 8 (12,50%), среди прочего контингента больных – в 29 (17,06%) случаев (Таблица 14).

По частоте встречаемости мутаций, ассоциированных с ЛУ к рифампицину, подавляющее большинство штаммов среди всех контингентов больных ТБЛ с МЛУ имели мутацию в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu – 84,52% (262/310) среди впервые выявленных, 85,94% (55/64) среди рецидивов, 84,12% (143/170) среди прочего контингента, 71,79% (28/39) среди лиц с ко-инфекцией ВИЧ.

Анализируя частоту встречаемости редких в РМЭ мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, у больных ТБЛ с МЛУ можно отметить следующее:

Таблица 14 – Спектр мутаций, ассоциированных с резистентностью к рифампицину и изониазиду, у больных туберкулёзом легких с МЛУ в Республике Марий Эл (2013– 2019гг.)

Контингент больных ТБЛ с МЛУ		Лица с ВИЧ негативным статусом						ТБ/ВИЧ		Всего	
		Впервые выявленные		Рецидивы		Прочий контингент					
Гены и кодоны	Мутации	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
<i>rpoB531; katG 315</i>	Ser-Leu; Ser-Thr1	199	64,19	44	68,75	108	63,53	20	51,28	371	63,64
<i>rpoB531; katG 315</i>	Ser-Leu; Ser-Thr2	7	2,26	2	3,13	-	-	3	7,69	12	2,06
<i>rpoB531; katG 315</i>	Ser-Trp; Ser-Thr1	2	0,65	-	-	1	0,59	-	-	3	0,51
<i>rpoB531; inhA</i>	Ser-Leu; C(-15)T	3	0,97	-	-	2	1,18	-	-	5	0,86
<i>rpoB531; inhA</i>	Ser-Leu; C(-15)T;T(-8)A/C	-	-	-	-	1	0,59	-	-	1	0,17
<i>rpoB531; katG 315+inhA</i>	Ser-Leu; Ser-Thr1,C(-15)T	45	14,52	8	12,50	29	17,06	2	5,13	84	14,41
<i>rpoB531; katG 315+inhA</i>	Ser-Trp; Ser-Thr1,C(-15)T	1	0,32	1	1,56	-	0,00	-	-	2	0,34
<i>rpoB531; katG 315+inhA</i>	Ser-Leu; Ser-Thr1;T(-8)A/C	8	2,58	1	1,56	3	1,76	1	2,56	13	2,23
<i>rpoB531; katG 315+inhA</i>	Ser-Leu; Ser-Thr2;T(-8)A/C	-	-	-	-	-	-	1	2,56	1	0,17
<i>rpoB 526; katG 315</i>	His-Tyr; Ser-Thr1	8	2,58	-	-	-	-	1	2,56	9	1,54
<i>rpoB 526; katG 315</i>	His-Arg; Ser-Thr1	-	-	1	1,56	-	-	-	-	1	0,17
<i>rpoB 526; katG 315</i>	His-Arg; Ser-Thr2	1	0,32	-	-	1	0,59	2	5,13	4	0,69
<i>rpoB 526; katG 315</i>	His-Leu; Ser-Thr1	3	0,97	-	-	-	-	-	-	3	0,51
<i>rpoB 526; katG 315</i>	His-Pro; Ser-Thr1	1	0,32	-	-	-	-	-	-	1	0,17
<i>rpoB526; katG 315+inhA</i>	His-Tyr; Ser-Thr1;C(-15)T	-	-	-	-	2	1,18	-	-	2	0,34
<i>rpoB 526; katG 315 +inhA</i>	His-Arg; Ser-Thr1;C(-15)T	2	0,65	-	-	-	-	-	-	2	0,34
<i>rpoB 526; katG 315 +inhA</i>	His-Arg; Ser-Thr1;T(-8)A/C	2	0,65	-	-	-	-	-	-	2	0,34
<i>rpoB 526; katG 315 +inhA</i>	His-Leu; Ser-Thr1;C(-15)T	-	-	-	-	1	0,59	1	2,56	2	0,34



Продолжение таблицы 14

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
<i>rpoB</i> 516; <i>katG</i> 315	Asp-Val; Ser-Thr1	4	1,29	1	1,56	3	1,76	1	2,56	9	1,54
<i>rpoB</i> 516; <i>katG</i> 315	Asp-Tyr; Ser-Thr1	1	0,32	-	-	-	-	-	-	1	0,17
<i>rpoB</i> 516; <i>inhA</i>	Asp-Val; C(-15)T	-	-	-	-	1	0,59	-	-	1	0,17
<i>rpoB</i> 516; <i>inhA</i>	Asp-Val; C(-15)T;T(-8)A/C	-	-	-	-	1	0,59	-	-	1	0,17
<i>rpoB</i> 516; <i>katG</i> 315 + <i>inhA</i>	Asp-Val; Ser-Thr1;C(-15)T	4	1,29	4	6,25	2	1,18	2	5,13	12	2,06
<i>rpoB</i> 516; <i>katG</i> 315 + <i>inhA</i>	Asp-Val; Ser-Thr1;T(-8)A/C	2	0,65	1	1,56	2	1,18	-	-	5	0,86
<i>rpoB</i> 516; <i>katG</i> 315 + <i>inhA</i>	Asp-Tyr; Ser-Thr1;T(-8)A/C	6	1,94	-	-	2	1,18	-	-	8	1,37
<i>rpoB</i> 533; <i>katG</i> 315	Leu-Pro; Ser-Thr1	3	0,97	-	-	4	2,35	2	5,13	9	1,54
<i>rpoB</i> 533; <i>inhA</i>	Leu-Pro; T(-8)A/C	1	0,32	-	-	-	-	-	-	1	0,17
<i>rpoB</i> 533; <i>katG</i> 315 + <i>inhA</i>	Leu-Pro; Ser-Thr1;C(-15)T	7	2,26	1	1,56	5	2,94	2	5,13	15	2,57
<i>rpoB</i> 533; <i>katG</i> 315 + <i>inhA</i>	Leu-Pro; Ser-Thr1;T(-8)A/C	-	-	-	-	1	0,59	-	-	1	0,17
<i>rpoB</i> 531+ <i>rpoB</i> 516; <i>katG</i> 315	Ser-Leu, Asp-Val; Ser-Thr1	-	-	-	-	-	-	1	2,56	1	0,17
<i>rpoB</i> 516+ <i>rpoB</i> 526; <i>katG</i> 315 + <i>inhA</i>	Asp-Val,His-Leu; Ser-Thr1;C(15)T	-	-	-	-	1	0,59	-	-	1	0,17
<b>Всего лиц с мутациями</b>		<b>310</b>	<b>100,0</b>	<b>64</b>	<b>100,0</b>	<b>170</b>	<b>100,0</b>	<b>39</b>	<b>100,0</b>	<b>583</b>	<b>100,0</b>
Всего мутаций к изониазиду		387	-	80	-	220	-	49	-	736	-
Всего мутаций к рифампицину		310	-	64	-	171	-	40	-	585	-

- у впервые выявленных больных в 3,55% случаев (11/310) встречалась мутация в 533 кодоне гена *rpoB* (Leu-Pro), в 3,23% (10/310) в *rpoB* 516 (Asp-Val), в 2,58% (8/310) в *rpoB* 526 (His-Tyr), в 2,26% (7/310) в *rpoB* 516 (Asp-Tyr);
- у рецидивов второй по частоте встречаемости являлась мутация *rpoB* 516 (Asp-Val) – 9,38% (6/64);
- среди прочего контингента по 5,88% (по 10/170) штаммов имели мутации в *rpoB* 516 (Asp-Val) и в *rpoB*533 (Leu-Pro) соответственно;
- среди ВИЧ инфицированных лиц также чаще всего встречались мутации в генах *rpoB* 516 (Asp-Val) и в *rpoB* 533 (Leu-Pro) – по 10,26% (по 4/39).

Рассматривая генные мутации, ассоциированные с устойчивостью к Н у больных ТБЛ с МЛУ МБТ, установлено, что среди всех контингентов преобладала мутация в 315 кодоне гена *katG* с заменой Ser-Thr1 – 96,13% (298/310) у впервые выявленных, 96,88% (62/64) у рецидивов, 96,47% (164/170) у прочего контингента, 84,62% (33/39) у ВИЧ инфицированных.

Второй по частоте встречаемости являлась мутация в гене *inhA* C(-15)T – 20,00% (62/310) у впервые выявленных, 21,88% (14/64) у рецидивов, 26,47% (45/170) у прочего контингента, 17,95% (7/39) у ВИЧ- инфицированных.

Следует отметить, что у 6 ВИЧ-инфицированных (15,38%) имелась мутация в гене *katG*315 с заменой Ser-Thr2.

Среди всех контингентов лиц с полирезистентностью, включая лиц с ко-инфекцией ТБЛ/ВИЧ наиболее часто ( $p < 0,05$ ) встречались мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к Н, – в 97,63% (206/211) (Таблица 15). Из них мономутации отмечались у 90,29% лиц (186/206), при этом наиболее часто в гене в *katG*315 с заменой Ser-Thr1 – 83,98% (173/206). Стоит отметить, что среди впервые выявленных лиц с полирезистентностью, второй по встречаемости была ассоциация мутаций в генах *katG* 315 (Ser-Thr1) и *inhA* (T(-8)A/C) – 6,20% (8/129).

Мономутации, ассоциированные с ЛУ к R, отмечены только у 5 человек (2,37%) среди всех контингентов больных ТБЛ с полирезистентностью (211), при этом не выявлено преобладания какой-либо из них.

Таблица 15 – Спектр мутаций, ассоциированных с резистентностью к рифампицину и изониазиду, у больных туберкулёзом легких с полирезистентностью в 2013–2019 гг.

Контингент лиц		Лица с ВИЧ негативным статусом						ТБ/ВИЧ		всего	
		Впервые выявленные		Рецидивы		Прочий контингент					
Гены и кодоны	Мутации	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
<i>katG</i> 315	Ser-Thr1	105	81,40	14	82,35	44	91,67	10	83,33	173	83,98
<i>katG</i> 315	Ser-Thr2	3	2,33	-	-	-	-	-	-	3	1,46
<i>inhA</i>	C(-15)T	4	3,10	2	11,76	2	4,17	1	8,33	9	4,37
<i>inhA</i>	T(-8)A/C	1	0,78	-	-	-	-	-	-	1	0,49
<i>katG</i> 315+ <i>inhA</i>	Ser-Thr1, C(-15)T	4	3,10	-	-	1	2,08	-	-	5	2,43
<i>katG</i> 315+ <i>inhA</i>	Ser-Thr2, C(-15)T	2	1,55	-	-	-	-	-	-	2	0,97
<i>katG</i> 315+ <i>inhA</i>	Ser-Thr1, T(-8)A/C	8	6,20	1	5,88	1	2,08	1	8,33	11	5,34
<i>katG</i> 315+ <i>inhA</i>	Ser-Thr2, T(-8)A/C	1	0,78	-	-	-	-	-	-	1	0,49
<i>katG</i> 315+ <i>inhA</i>	Ser-Asn, T(-8)A/C	1	0,78	-	-	-	-	-	-	1	0,49
<b>Всего лиц с мутациями к H</b>		<b>129</b>	<b>100,0</b>	<b>17</b>	<b>100,0</b>	<b>48</b>	<b>100,0</b>	<b>12</b>	<b>100,0</b>	<b>206</b>	<b>100,0</b>
<i>rpoB</i> 526	His-Leu	1	50	-	-	-	-	-	-	1	20,00
<i>rpoB</i> 516	Asp-Val	-	-	-	-	2	66,67	-	-	2	40,00
<i>rpoB</i> 531	Ser-Leu	1	50	-	-	1	33,33	-	-	2	40,00
<b>Всего лиц с мутациями к R</b>		<b>2</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>100</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>5</b>	<b>100,0</b>
<b>Всего лиц с мутациями к H или R</b>		<b>131</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>51</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>211</b>	<b>-</b>

Таким образом, среди мутаций к рифампицину наиболее часто среди всех контингентов больных встречались мутации в кодоне 531 гена *rpoB* с заменой Ser-Leu, среди мутаций к изониазиду у всех больных с ЛУ МБТ, как с МЛУ, так и с полирезистентностью, наиболее часто отмечались мутации в 315 кодоне гена *katG* с заменой Ser-Thr1. (Таблицы 14,15).

Среди образцов ДНК МБТ с МЛУ при наличии устойчивости к фторхинолонам как у впервые выявленных пациентов, так и среди ранее леченных, наиболее часто встречались мутации в 94 кодоне гена *gyrA* – 68,97% (40 из 58) (Таблица 16). При этом наиболее часто отмечалась замена Asp-Gly в данном кодоне гена *gyrA*. Второй по частоте встречаемости среди всех исследуемых штаммов являлась мутация в гене *gyrA* 90 с заменой Ala-Val (20,69%). И наиболее редко, особенно среди ранее леченных больных, отмечалась мутация в гене *gyrA* 91 с заменой Ser-Pro. Чаще всего мутации к фторхинолонам у штаммов с МЛУ встречались в сочетании с мутациями *katG* 315 (Ser-Thr1) и *rpoB*531 (Ser-Leu) – 72,41% (42/58).

Таблица 16 – Спектр мутаций, ассоциированных с резистентностью к фторхинолонам, у больных туберкулёзом легких с МЛУ в Республике Марий Эл (2013–2019гг.)

Ген	Мутации	В/выявленные		Ранее леченные		Всего	
		абс	%	абс	%	абс	%
<i>gyrA</i> 90	Ala-Val	6	20,69	6	20,69	12	20,69
<i>gyrA</i> 91	Ser-Pro	5	17,24	1	3,45	6	10,34
<i>gyrA</i> 94	Asp-Gly	11	37,93	11	37,93	22	37,93
	Asp-Tyr	-	-	3	10,34	3	5,17
	Asp-Asn	5	17,24	4	13,79	9	15,52
	Asp-Ala	2	6,9	4	13,79	6	10,34
Всего		29	100	29	100	58	100

Таким образом, установлено, что у всех категорий изучаемых больных ТБЛ, среди мутаций, ассоциированных с устойчивостью к R, H и Fq, доминировали штаммы с мутациями *rpoB* 531 с заменой Ser-Leu, *katG* 315 с заменой Ser-Thr1 и *gyrA* 94 с заменой Asp-Gly соответственно. Согласно имеющимся сведениям, указанные мутации приводят к высокому уровню

резистентности, но не оказывают значимого влияния на жизнеспособность и трансмиссивность МБТ [67,118,175].

### **3.4. Изучение принадлежности к генетическому кластеру штаммов микобактерий туберкулеза, выделенных от различных групп больных туберкулезом**

Для определения генетических кластеров МБТ, циркулирующих на территории Марий Эл, было изучено 233 образца ДНК МБТ, полученных из диагностического материала и культур МБТ в 2017–2018гг., из них 43 получены от больных с ТБ/ВИЧ. Принадлежность к генотипу Beijing определялась методом ПЦР-РВ набором «Амплитуб - Beijing» (ООО «Синтол», Россия) на базе бактериологической лаборатории РПТД, принадлежность МБТ к другим линиям в микробиологическом отделе ЦНИИТ методом сполиготипирования набором реагентов «СПОЛИГО-БИОЧИП» (Биочип-ИМБ, Россия). Идентификацию сполигопрофилей проводили согласно международной базе данных SITVITWEB [212].

Полученные данные представлены в таблице 17. Как и в большинстве регионов Российской Федерации, наиболее часто встречались штаммы МБТ генетического семейства Beijing – 77,68% (181 из 233) (Таблица 17, Рисунок 4). При этом, такое распределение характерно как для лиц с ТБ/ВИЧ, так и без ВИЧ – 72,09% (31 из 43) среди лиц ТБ/ВИЧ и 78,95% (150 из 190) среди лиц без ВИЧ. Стоит отметить, что у ВИЧ-положительных лиц штаммы семейства Beijing преобладали независимо от чувствительности/устойчивости, в то время как у лиц без ВИЧ-инфекции среди штаммов МБТ с сохраненной чувствительностью штаммы семейства Beijing не являлись преобладающими – 38,46% (10 из 26) (Таблица 17).

Дальнейшее изучение штаммов МБТ, не принадлежащих к семейству Beijing, выявило, что распространенность различных генотипов МБТ, циркулирующих в РМЭ, отличается от других регионов Приволжского Федерального округа.

Таблица 17 – Распределение штаммов МБТ в РМЭ по генетическим линиям

Генотипы	SIT	ТБ/ВИЧ			Всего ТБ/ВИЧ	ТБ без ВИЧ			Всего ТБ без ВИЧ	Всего штам- мов
		МЛУ	ПР	чув		МЛУ	ПР	чув		
		Абс.	Абс.	Абс.		Абс.	Абс.	Абс.		
Beijing	*	14	6	11	31	93	47	10	150	181
LAM9	42	-	2	1	3	3	-	-	3	6
	252	-	-	-	-	2	-	-	2	2
H3-LAM9	335	-	-	-	-	1	-	-	1	1
Ural	56	-	-	-	-	1	-	-	1	1
	172	-	-	-	-	-	-	1	1	1
	199	-	-	-	-	-	1	-	1	1
	825	-	-	1	1	-	-	-	-	1
	1239	-	-	-	-	-	-	1	1	1
T1	53	-	-	2	2	3	2	3	8	10
	65	-	-	1	1	-	-	-	-	1
	122	1	-	-	1	1	1	-	2	3
	264	-	1	-	1	-	1	-	1	2
	506	1	-	-	1	-	-	-	-	1
	774	-	-	-	-	-	1	-	1	1
T2	52	-	-	-	-	-	1	-	1	1
	233	-	-	-	-	2	1	-	3	3
	848	-	-	-	-	-	1	-	1	1
Haarlem 4	35	-	-	1	1	-	-	2	2	3
	777	-	-	-	-	-	-	1	1	1
	1117	-	-	-	-	-	-	1	1	1
	1447	-	-	-	-	-	-	1	1	1
X1	1564	-	1	-	1	-	-	1	1	2
T5_RUS1	254	-	-	-	-	1	-	3	4	4
MANU2	54	-	-	-	-	-	1	-	1	1
Bovis /BCG	482	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Microti	539	-	-	-	-	-	-	1	1	1
Всего		16	10	17	43	107	57	26	190	233

Сполиготипирование 52 штаммов nonBeijing *M. tuberculosis* выявило 26 сполитипов 11 генетических семейств (Таблица 17). Среди 52 образцов МБТ, отличных от Beijing, подавляющее большинство составляли штаммы группы Т – 44,23% (23 штамма), при этом генотип Т1 определялся в 34,62% (18 штаммов) случаях. В группе Т преобладали штаммы сполитипа SIT53 – 43,48% (10 штаммов из 23), из них 5 были лекарственно чувствительные. Третьими по

распространенности были штаммы МБТ семейства LAM 9 – 15,38% (8/52). Далее по убыванию встречаемости, генотипы МБТ распределились следующим образом: H4 – 11,54% (6 штаммов), U и T2 по 9,62% (по 5 штаммов), T5\_RUS1 – 7,69% (4 штамма), X1 – 3,85% (2 штамма). Остальные обнаруженные генотипы были представлены единичными изолятами МБТ (Таблица 17, Рисунок 4).

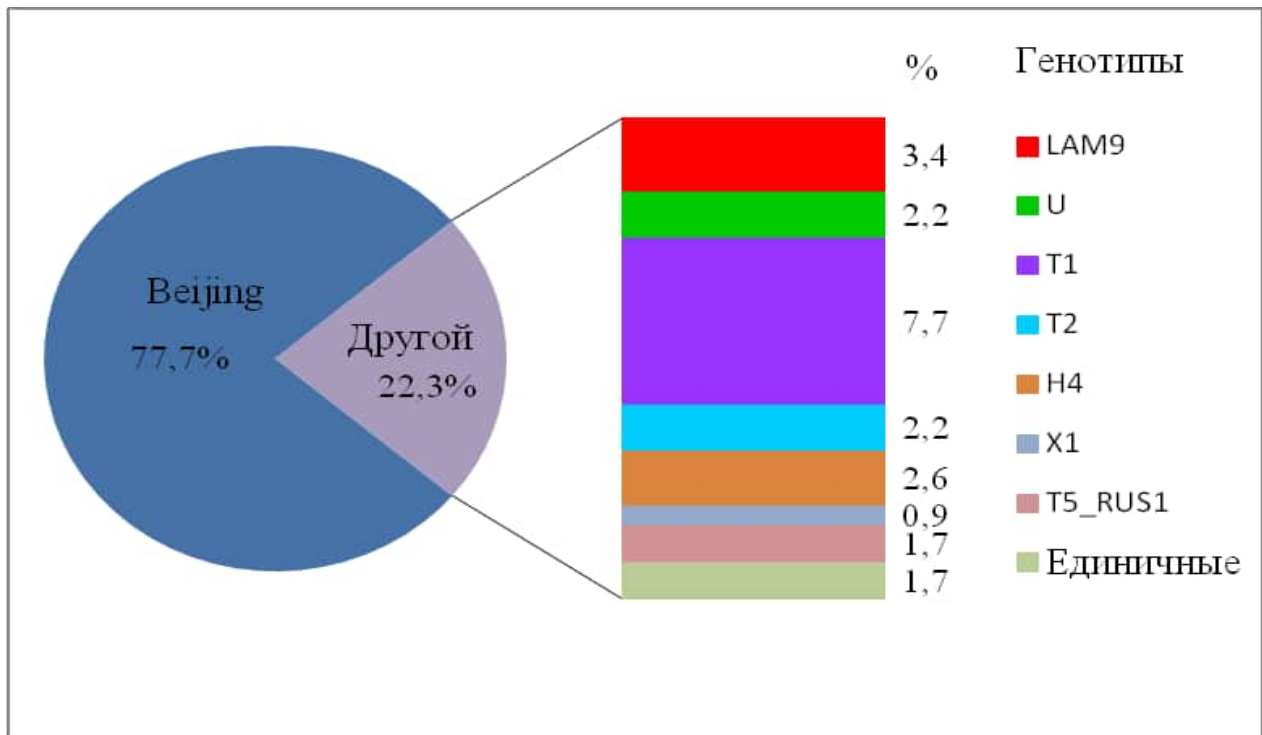


Рисунок 4 – Генотипы МБТ, циркулирующие на территории РМЭ (%)

Была изучена частота встречаемости генетических кластеров МБТ, циркулирующих в РМЭ, в зависимости от наличия или отсутствия устойчивости МБТ к ПТП. При сравнении распространенности генотипа Beijing среди штаммов с МЛУ и полирезистентных (ПР) штаммов не выявлено достоверных различий во встречаемости ( $\chi^2 = 1,48$ ;  $p > 0,05$ ) – 86,99% (107 из 123) среди штаммов с МЛУ и 79,1% (53 из 67) среди штаммов с полирезистентностью (Рисунок 5). Однако, достоверно реже штаммы кластера Beijing встречались среди чувствительных МБТ – 48,84% (21 из 43) ( $\chi^2 = 24,16$ ,  $p < 0,001$  между уровнем МЛУ МБТ и чувствительными штаммами;  $\chi^2 = 9,57$ ,  $p = 0,002$  между штаммами с полирезистентностью и чувствительными) (Рисунок 5).

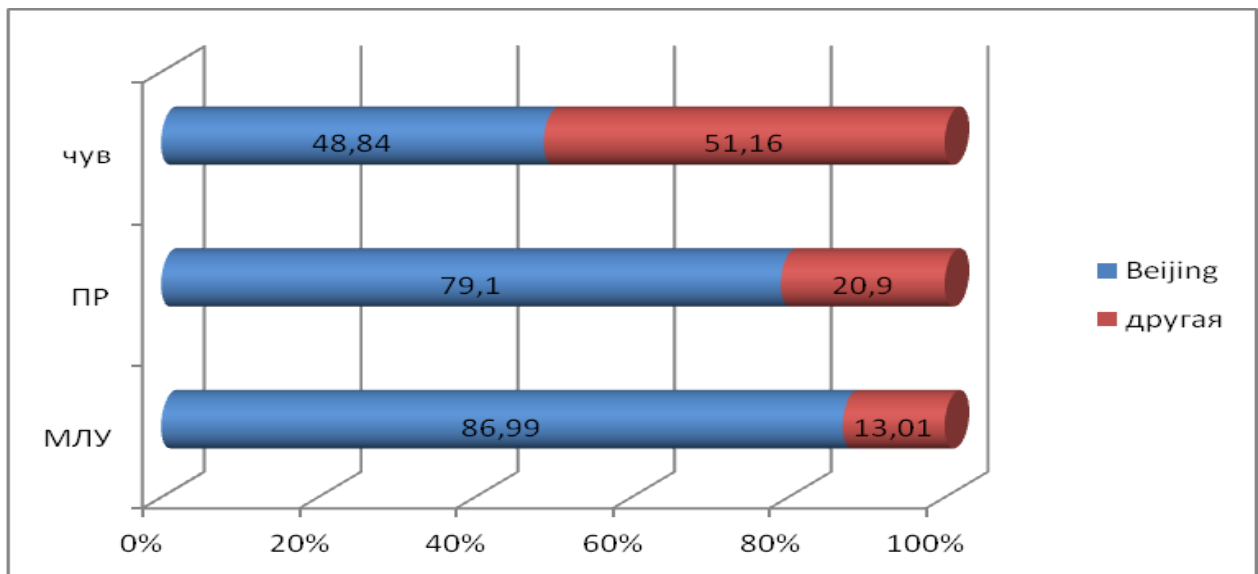


Рисунок 5 – Доля штаммов Beijing и других линий в зависимости от ЛЧ МБТ

Таким образом, в РМЭ, как и в других регионах России, где проводились исследования по изучению генотипов *M. Tuberculosis*, наиболее распространены штаммы МБТ кластера Beijing. На втором и третьем местах по встречаемости из штаммов МБТ nonBeijing также как в Калининградской области [155], в приграничных районах Монголии и китайской провинции Хэбэй [160] наиболее часто выделялись штаммы группы T и LAM.

### 3.5. Сопоставление результатов тестирования лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* генотипическим и фенотипическими методами и анализ целесообразности включения их в региональный диагностический алгоритм

В данном исследовании проведено сравнение результатов ТЛЧ МБТ, полученных из одного образца диагностического материала генотипическим методом ПЦР-РВ и фенотипическими методами – абсолютных концентраций на плотной питательной среде и пропорций в жидкой питательной среде.

В РМЭ до настоящего времени тестирование к противотуберкулезным препаратам первого ряда (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и этамбутолу) проводилось параллельно на ППС и ЖС.

Первоначально, для проведения сравнительного анализа были сопоставлены результаты параллельного тестирования ЛЧ МБТ к ПТП первого ряда вышеуказанными фенотипическими методами 706 культур, выделенных



от больных ТБЛ из образцов диагностического материала, взятого до начала лечения в 2015 – 2017 гг. При этом 598 ТЛЧ МБТ были поставлены из культур, выделенных в ЖС, и 108 тестов из культур, выделенных на ППС Левенштейна-Йенсена и Финна-П. Результаты представлены в таблице 18. Выявлено, что совпадение результатов ЛЧ МБТ к препаратам первого ряда находится в пределах 95 % доверительного интервала. Особенно высокий процент совпадения результатов отмечается для рифампицина – 99,43% (702 из 706) (Таблица 18).

Таблица 18 – Сопоставление результатов тестирования ЛЧ МБТ методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена и методом пропорций в среде Middlebrook 7Н9 в 2015 – 2017 годах

ПТП	Всего культур	Совпадение (абс.)	%	Расхождение (абс.)	%
Н	706	698	98,87	8	1,13
Р	706	702	99,43	4	0,57
С	706	696	98,58	10	1,42
Е	706	675	95,61	31	4,39

При расчете чувствительности и специфичности за референсный метод в лаборатории принимался метод абсолютных концентраций, как метод, показывающий на протяжении многих лет отличные показатели внешнего контроля качества ФСВОК.

Чувствительность и специфичность к изониазиду в жидкой среде в системе ВАСТЕС MIGT 960 составили 100% и 98,7% соответственно, к рифампицину – 97,8% и 100%, к стрептомицину – 100% и 97,8%, к этамбутолу – 100% и 95,0%.

В РМЭ все впервые выявленные бактериовыделители в 100% случаев обследуются на выявление мутаций, связанных с устойчивостью к изониазиду и рифампицину. При этом, если ТЛЧ МБТ не было проведено из диагностического материала, то в дальнейшем оно проводится при получении культуры. Было проанализировано 930 тестов определения ЛЧ МБТ к изониазиду и рифампицину

методом абсолютных концентраций и методом ПЦР-РВ, выполненных для одного и того же образца диагностического материала в 2015 – 2018 гг. При этом 641 образец был протестирован на выявление мутаций при получении ДНК МБТ из диагностического материала, 289 образцов ДНК МБТ были получены из культуры. Были получены следующие результаты, представленные в таблицах 19 и 20.

Таблица 19 – Результаты тестирования ЛЧ МБТ к изониазиду методами ПЦР-РВ и абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена в 2015–2019гг.

Материал для получения ДНК МБТ	Количество образцов	ЛУ/ЛЧ МБТ к изониазиду				Чувствительность %	Специфичность %
		ПЦР-РВ		Абс. конц.			
		Чув.	Уст.	Чув.	Уст.		
ДНК из диагностических образцов	641	417	224	404	237	94,8	97,0
ДНК из культуры МБТ	289	177	112	170	119	94,4	96,0
Всего	930	594	336	574	356	94,7	96,6

Таблица 20 – Результаты тестирования ЛЧ МБТ к рифампицину методами ПЦР-РВ и абсолютных концентраций на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена в 2015–2019гг.

Материал для получения ДНК МБТ	Количество образцов	ЛУ/ЛЧ МБТ к рифампицину				Чувствительность %	Специфичность %
		ПЦР-РВ		Абс. конц.			
		Чув.	Уст.	Чув.	Уст.		
ДНК из диагностических образцов	641	505	136	492	149	92,0	97,4
ДНК из культуры МБТ	289	207	82	205	84	97,7	99,0
Всего	930	712	218	697	233	94,0	98,0

Чувствительность и специфичность метода ПЦР-РВ в отношении изониазида показали практически одинаковые результаты как для ДНК МБТ, выделенных из диагностического материала, так и из культуры. В целом,

чувствительность и специфичность метода ПЦР-РВ при определении ЛУ к изониазиду составили 94,7% и 96,6% соответственно, при определении ЛУ к рифампицину – 94,0% и 98,0% соответственно. Стоит отметить, что чувствительность метода ПЦР-РВ несколько ниже ( $p > 0,05$ ) при определении ЛУ к рифампицину из образцов диагностического материала (Таблицы 19,20).

Таким образом, отмечается высокое совпадение результатов ТЛЧ МБТ фенотипическим и генотипическим методами – к изониазиду 97,85% (20/930), к рифампицину 98,39% (15/930). При этом характер расхождения ЛУ МБТ генотипическими и фенотипическими методами показал, что в большинстве случаев отмечается отсутствие мутаций к изониазиду и рифампицину при наличии фенотипической устойчивости. Скорее всего, этот факт объясняется наличием достаточно редко встречающихся мутаций у данных штаммов МБТ, выявление которых не предусмотрено использовавшимися тест-системами.

Кроме того, были проанализированы 19 образцов диагностического материала, в ДНК МБТ которых выявлены мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, и при получении культуры проведены фенотипические тесты на чувствительность к офлоксацину, моксифлоксацину и левофлоксацину. Тестирование ЛЧ МБТ к офлоксацину проводилось на плотной среде, к моксифлоксацину (1,5 мкг/мл) и левофлоксацину (1,0 мкг/мл) – в жидкой. У 18 (94,74%) штаммов МБТ выявлено совпадение генотипической и фенотипической устойчивости к офлоксацину, только один штамм был фенотипически чувствительный при наличии мутации, связанной с устойчивостью к фторхинолонам. При этом, у чувствительного штамма мутация была выявлена в 94 кодоне гена *gyrA* (замена Asp-Asn). Обратная ситуация отмечена в отношении моксифлоксацина – только 1 штамм имел фенотипическую устойчивость при наличии мутации в *gyrA91* (замена Ser-Pro), а 18 штаммов МБТ были фенотипически чувствительны. Все 19 штаммов были фенотипически чувствительны к левофлоксацину.

Таким образом, проведенное исследование показало высокий процент совпадений результатов тестирования ЛЧ МБТ к препаратам первого ряда

различными фенотипическими методами, а также результатов ТЛЧ методами ПЦР-РВ и абсолютных концентраций.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что генотипический метод определения мутаций, ассоциированных с ЛУ МБТ, необходим для быстрого получения результатов устойчивости МБТ к ключевым ПТП, что позволяет врачу в самом начале лечения назначить больному адекватную схему химиотерапии. Однако в дальнейшем, при получении культуры МБТ, генотипический метод должен быть обязательно продублирован одним из фенотипических методов ТЛЧ, по результатам которого, при необходимости, корректируется схема лечения.

## ГЛАВА 4. ВЫЯВЛЕНИЕ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ И ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИХ ПОПУЛЯЦИИ, ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ

### 4.1. Выделение нетуберкулезных микобактерий и анализ результатов их идентификации

Количество культур нетуберкулезных микобактерий НТМБ среди всех выделяемых фенотипическими методами микобактерий в Республике Марий Эл растет. Так, в 2019г. из 1128 культур микобактерий 79 были НТМБ (7,0%), а в 2015 г. – штаммы НТМБ составляли 2,9% (40 из 1385). За период 2015 – 2019гг. нетуберкулезные микобактерии выделяли 185 человек, проживающие в РМЭ. Было идентифицировано 395 культур (включая выделенные до 2015 года) от этих пациентов, из них 177 человек выделяли НТМБ из мокроты. Идентификацию НТМБ проводили с помощью ДНК-стриповой технологии с применением наборов GenoTypeCM/AS (Hain Lifescience, Германия).

При сравнении бактериовыделения по полу среди впервые выявленных больных ТБЛ и бактериовыделителей НТМБ, было выявлено, что в обеих группах преобладали мужчины ( $p < 0,001$ ). В тоже время, отмечено, что женщины, выделяющие НТМБ, встречались достоверно чаще (42,94%), по сравнению с женщинами среди впервые выявленных бактериовыделителей МБТ (22,31%), а количество мужчин соответственно было меньше (57,06% против 77,69%) ( $p < 0,001$ ) (Таблица 21).

Таблица 21 – Распределение пациентов – выделителей НТМБ из мокроты и впервые выявленных бактериовыделителей МБТ по полу в 2015–2019гг.

Пол	Бактериовыделители			
	НТМБ		МБТ	
	Абс.	%	Абс.	%
Мужчины	101	57,06	829	77,69
Женщины	76	42,94	238	22,31
Всего	177	100	1067	100

При сравнении бактериовыделителей по возрасту, было установлено, что лица, выделявшие НТМБ, были значительно старше впервые выявленных

бактериовыделителей МБТ (Рисунок 6). Их максимальный возрастной диапазон составлял от 55 и старше – 58,19% (103/177), а максимальный возрастной диапазон бактериовыделителей МБТ составлял от 25 до 54 лет – 70,85% (756/1067).

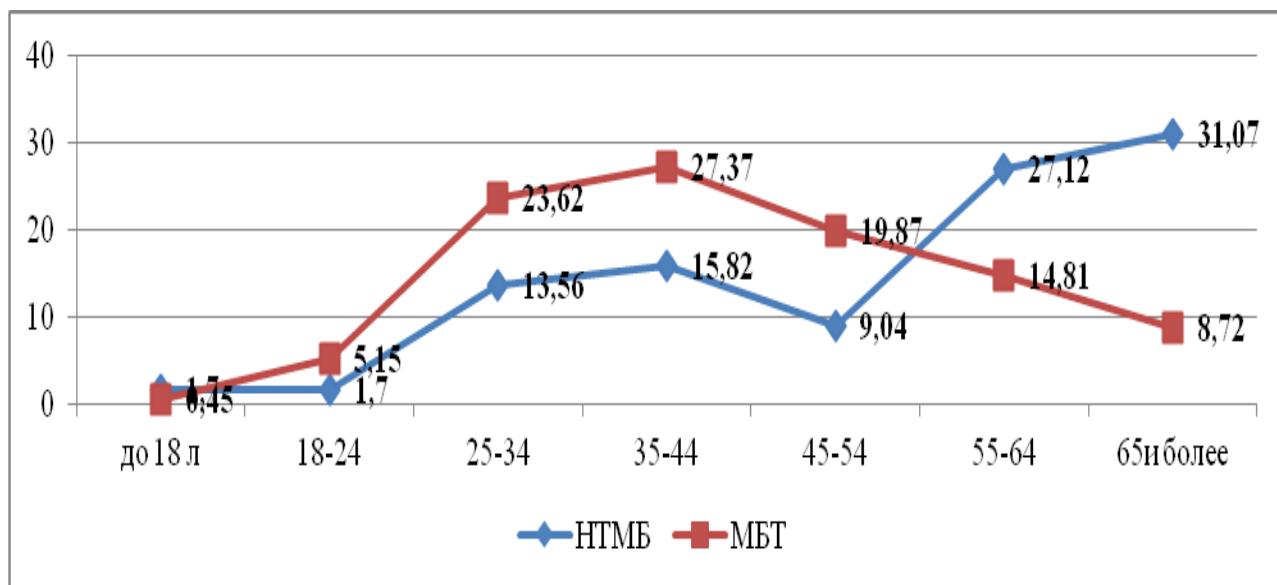


Рисунок 6 – Характеристика выделителей НТМБ и впервые выявленных бактериовыделителей МБТ в 2015–2019 гг. по возрасту

Среди выделенных НТМБ намного чаще высевались медленно растущие микобактерии ( $p < 0,001$ ) (Таблица 22). У 2 человек были идентифицированы микобактерии со средней скоростью роста *M.intermedium*, у 9 человек вид НТМБ определить не удалось. Четыре пациента последовательно выделили 2 вида НТМБ – один пациент *M.avium* → *M.kansasii*, второй – *M.simiae* → *M.intracellulare*, третий – *M.fortuitum* → *M.gordoniae*, и четвертый – *M.shimoidei* → *M.gordoniae*. Отмечено, что у лиц, выделявших как медленно растущие, так и быстрорастущие НТМБ, бактериовыделение значительно чаще происходило однократно ( $p < 0,001$ ) – 70,9% (134/189), против 29,1% (55/189) человек, у которых НТМБ определялись неоднократно. У 27 человек НТМБ выделялись из 3 и более образцов. Самым частым видом среди всех выделенных НТМБ являлись *M.intracellulare* (Таблица 22). При этом отмечено, что достоверно чаще встречались пациенты, выделявшие данный вид НТМБ неоднократно ( $p = 0,042$ ) – 29 из 48 (60,42%) против 19 из 48 (39,58%) пациентов, выделивших *M.intracellulare* однократно.

Таблица 22 – Частота выделения различных видов НТМБ у пациентов

Вид НТМБ	неоднократно		однократно		всего	
	абс.	%	абс	%	абс	%
<b>Быстрорастущие</b>	<b>8</b>	<b>14,55</b>	<b>30</b>	<b>22,39</b>	<b>38</b>	<b>20,11</b>
<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
<b>Медленнорастущие</b>	<b>46</b>	<b>83,64</b>	<b>94</b>	<b>70,15</b>	<b>140</b>	<b>74,07</b>
<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
<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
<b>Средняя скорость роста</b>	–	–	<b>2</b>	<b>1,49</b>	<b>2</b>	<b>1,06</b>
<i>M.intermedium</i>	–	–	2	1,49	2	1,06
вид не определен	1	1,82	8	5,97	9	4,76
<b>Итого</b>	<b>55</b>	<b>100</b>	<b>134</b>	<b>100</b>	<b>189</b>	<b>100</b>

Примечание: 4 человека выделили по 2 вида НТМБ

Среди лиц, выделявших быстрорастущие НТМБ, наиболее частым видом (независимо от кратности выделения) был вид *M.fortuitum* – 16 из 38 (42,11%). У лиц с медленнорастущими НТМБ наиболее часто (при любой кратности) выделялись НТМБ комплекса МАС – 56,43% (79/140). При этом преобладающим видом были микобактерии *M.intracellulare* – 60,76% (48/79). Кроме того, стоит отметить, что при однократном бактериовыделении часто отмечался вид *M.gordonae* – 41,49% (39 из 94).

Среди лиц, выделявших НТМБ в 2015 – 2019 гг., 6 человек были ВИЧ инфицированы. Из них 4 человека неоднократно выделяли *M.avium*, и 2 человека однократно выделили *M.gordonae* и *M.intermedium*.

Таким образом, было отмечено, что у пациентов, выделявших нетуберкулезные микобактерии, в подавляющем большинстве – 74,07% случаев – идентифицировали медленно растущие виды (13 видов), в 20,11% случаев определялись быстрорастущие НТМБ (6 видов). Два пациента (1,06%) выделили нетуберкулезные микобактерии со средней скоростью роста.

У пациентов с неоднократным выделением НТМБ наиболее часто получали культуры вида *M.intracellulare*. У пациентов, выделивших нетуберкулезные микобактерии однократно, преобладающим видом были *M.gordonae*, что, как правило, расценивалось как носительство или контаминация.

В 2015-2019 годах в ГБУ РМЭ «РПТД» целенаправленные исследования диагностического материала на нетуберкулезные микобактерии не проводили. НТМБ идентифицировали в процессе обследования пациентов на микобактерии туберкулеза. У большинства пациентов НТМБ выделяли из мокроты – 177 человек. Из материала, отличного от мокроты, НТМБ были выделены у 8 человек. Из них у 3-х человек нетуберкулезные микобактерии идентифицированы при исследовании менструальной крови (*M.intracellulare*), отделяемого молочной железы (*M.phlei*), трупного материала (*M.avium*). У 5 лиц НТМБ выделили из мочи (2 человека – *M.fortuitum*, 2 человека – *M.gordonae*, 1 – *M.avium*). Анализ причин обследования показал, что НТМБ в моче обнаружены у 2-х пациентов с первоначально диагностированным пиелонефритом, у 2-х – с хроническим циститом и у одного (выделившего *M.avium*) с подозрением на туберкулез почек.

У лиц, выделявших НТМБ из мокроты, материал на исследование поступал как из учреждений ОЛС, так и из учреждений противотуберкулезной службы (ПТС). Из учреждений ОЛС материал исследовался от 24 человек из 177 (13,56%), из учреждений ПТС – от 157 человек из 177 (88,70%). При этом 4 человека первоначально обследовались и лечились в учреждениях ОЛС, и диагностический



материал был собран и отправлен в бактериологическую лабораторию РПТД сотрудниками этих учреждений. Затем, после получения результата микробиологического анализа, данные пациенты дообследовались в учреждениях ПТС (поэтому всего в данных учреждениях обследован 181 человек). В целом, чаще всего НТМБ выделялись у лиц с неспецифическими заболеваниями респираторной системы – 50,83% (92/181), несколько реже НТМБ выделялись у лиц с подозрением на туберкулез легких – 29,28 % (53/181) и у лиц с верифицированным диагнозом и пролеченных от туберкулеза ранее – 19,89% (36/181) (Таблица 23).

У 22,93% (36/157) лиц, обследованных учреждениями ПТС, был установлен диагноз ТБ (Таблица 23). Из них у 30,56% (11/36) пациентов НТМБ выявили в интенсивную фазу лечения одновременно с МБТ. По 27,78% лиц (10/36 и 10/36) выделяли НТМБ после прекращения выделения МБТ в фазу продолжения лечения и после клинического излечения туберкулеза соответственно. У 13,89% (5/36) лиц НТМБ идентифицировали из мокроты после перенесенной операции по поводу туберкулеза легких.

Таблица 23– Причина исследования мокроты на микобактерии у пациентов из учреждений ОЛС и ПТС

Причина обследования на микобактерии	Вид учреждений				Всего	
	ПТС		ОЛС			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Обследование по подозрению на ТБ	49	31,21	4	16,67	53	29,28
По поводу ТБ	36	22,93	–	–	36	19,89
Пневмония	3	1,91	4	16,67	7	3,87
ХОБЛ	9	5,73	9	37,5	18	9,94
Обследование по поводу клиничко - Rg изменений	60	38,22	7	29,17	67	37,02
Итого	157	100	24	100	181	100

При сравнении выделенных НТМБ по скорости роста у пациентов с разными направительными причинами обследования на микобактерии, было установлено, что у всех категорий пациентов, кроме лиц, обследованных по поводу ХОБЛ, достоверно чаще выделялись медленно растущие НТМБ ( $p < 0,05$ ) (Таблица 24).

Таблица 24 – Частота выделения НТМБ по скорости роста из мокроты у разных категорий обследованных лиц

Причина обследования на микобактерии	Распределение НТМБ по скорости роста								всего	
	Быстро-растущие		Медленно-растущие		Средняя скорость роста		Вид не определен			
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Обследование по подозрению на ТБ	7	13,21	45	84,91	-	-	1	1,89	53	100
По поводу ТБ	11	30,56	22	61,11	1	2,78	2	5,56	36	100
Пневмония	-	-	6	85,71	-	-	1	14,29	7	100
ХОБЛ	8	44,44	10	55,56	-	-	-	-	18	100
Обследование по поводу клиничко - Rg изменений	9	13,43	52	77,61	1	1,49	5	7,46	67	100
Итого	35	19,34	135	74,59	2	1,11	9	4,97	181	100

У лиц с ХОБЛ разница между выделением медленно-растущих и быстро-растущих НТМБ недостоверна ( $\chi^2=0,739$ ,  $p>0,05$ ).

При анализе лиц, выделявших НТМБ из мокроты, было выявлено, что у 47 из 177 (26,56%) человек были обнаружены КУМ микроскопическим методом, в то же время результаты ПЦР-РВ по обнаружению ДНК МБТ были отрицательные. При этом в 78,72% (37 из 47) случаев КУМ обнаружили у лиц, выделявших медленно-растущие НТМБ. Наиболее частыми видами НТМБ у лиц с положительным микроскопическим результатом были *M.intracellulare* – 34,04% (16 из 47) и *M.avium* – 21,28% (10 из 47), далее по убывающей: по 5 (по 10,64%) человек выделяли *M.gordoniae* и *M.fortuitum*, 3 человека (6,38%) – *M.abscessus*, по 2 (по 4,26%) – *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.simiae*, по 1 человеку (по 2,13%) *M.peregrinum* и *M.chelonae*.

У 7 из 47 человек (14,89%) КУМ обнаружили в КДЛ учреждений ОЛС. 24 человека из 47 (51,06%) были обследованы по поводу неспецифических заболеваний и клиничко-рентгенологических изменений в легких.

Суммируя результаты проведенных исследований, можно отметить, что в период с 2015 по 2019 гг. в БЛ РПТД РМЭ было выделено 395 культур НТМБ от 177 пациентов. У 13,56% лиц, выделявших НТМБ из мокроты, диагностический материал был направлен из учреждений ОЛС, в 88,70% случаев мокрота

отправлена на исследование из учреждений противотуберкулезной службы. У 29,28% бактериовыделителей НТМБ обследование проводилось по поводу подозрения на туберкулез, в 37,02% случаев по поводу клиничко – рентгенологических изменений в легких, в 13,81% – по поводу пневмонии и ХОБЛ и в 19,89% – по поводу ТБЛ. Следует отметить, что среди выделителей НТМБ у более четверти лиц были обнаружены КУМ микроскопическим методом.

Таким образом, в алгоритме обследования на туберкулез необходимо учитывать все возрастающую вероятность выделения НТМБ среди культур микобактерий.

#### **4.2. Определение спектра лекарственной устойчивости нетуберкулезных микобактерий**

Было установлено, что преобладающими видами НТМБ в Республике Марий Эл, выделенными от пациентов неоднократно, а следовательно и наиболее частыми потенциальными возбудителями микобактериоза являлись *M.intracellulare* и *M.avium*. Поэтому представлялось актуальным проведение исследований по тестированию на ЛЧ штаммов видов *M.intracellulare* и *M.avium* на основании результатов определения МИК.

На лекарственную чувствительность было протестировано 35 штаммов комплекса МАС, выделенных из мокроты пациентов на базе бактериологической лаборатории РПТД в 2014–2017 годах. Из 35 культур 23 были *M.intracellulare* и 12 *M.avium*. Для определения лекарственной чувствительности/устойчивости использовали тест-систему Sensititre SLOMYCO (TREK Diagnostic Systems Ltd., Великобритания). Для оценки результатов определения ЛЧ использовали критерии МИК, рекомендованные Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI) США [161].

В результате проведенного исследования не было выявлено существенных различий МИК для штаммов обоих видов в отношении следующих препаратов: амикацина, доксициклина, линезолида, рифабутина, стрептомицина, ципрофлоксацина (Таблица 25).

Таблица 25 - Минимальные ингибирующие концентрации препаратов для штаммов комплекса МАС

Препараты	МИК	Значения МИК мкг/мл, число штаммов (абс., %)							
		<i>M.intracellulare</i> (n=23)				<i>M.avium</i> (n=12)			
Амикацин	МИК	4,0	8,0	16,0	-	8,0	16,0	≥64,0	-
	абс.	1	11	11	-	6	5	1	-
	%	4,3	47,8	47,8	-	50,0	41,7	8,3	-
Доксициклин	МИК	≥16	-	-	-	≥16	-	-	-
	абс.	23	-	-	-	12	-	-	-
	%	100,0	-	-	-	100,0	-	-	-
Изониазид	МИК	1,0	2,0	4,0	≥8,0	1,0	2,0	4,0	≥8,0
	абс.	1	10	7	5	1	2	1	8
	%	4,3	43,5	30,4	21,7	8,3	16,7	8,3	66,7
Кларитромицин	МИК	2,0	4,0	8,0	-	4,0	8,0	16,0	-
	абс.	2	13	8	-	2	8	2	-
	%	8,7	56,5	34,8	-	16,7	66,7	16,7	-
Линезолид	МИК	16,0	32,0	≥64	-	16,0	32,0	≥64	-
	абс.	1	16	6	-	2	9	1	-
	%	4,3	69,6	26,1	-	16,7	75,0	8,3	-
Моксифлоксацин	МИК	1,0	2,0	4,0	≥8,0	1,0	2,0	4,0	≥8,0
	абс.	2	17	3	1	3	4	4	1
	%	8,7	73,9	13,0	4,3	25,0	33,3	33,3	8,3
Рифабутин	МИК	0,25	0,5	1,0	2,0	0,25	0,5	1,0	2,0
	абс.	1	8	11	3	2	3	5	2
	%	4,3	34,8	47,8	13,0	16,7	25,0	41,7	16,7
Рифампицин	МИК	1,0	2,0	4,0	≥8,0	2,0	4,0	≥8,0	-
	абс.	5	7	9	2	2	3	7	-
	%	21,7	30,4	39,1	8,7	16,7	25,0	58,3	-
Стрептомицин	МИК	8,0	16,0	32,0	-	8,0	16	32,0	-
	абс.	5	13	5	-	2	9	1	-
	%	21,7	56,5	21,7	-	16,7	75,0	8,3	-
Триметоприм/ сульфаметоксазол	МИК	1,0/ 19,0	2,0/ 38,0	4,0/ 76,0	≥8,0/ 152,0	0,5/ 9,5	1,0/ 19,0	4,0/ 76,0	≥8,0/ 152,0
	абс.	2	7	9	5	1	2	5	4
	%	8,7	30,4	39,1	21,7	8,3	16,7	41,7	33,3
Ципрофлоксацин	МИК	2,0	4,0	8,0	-	4,0	8,0	≥16,0	-
	абс.	1	4	18	-	2	8	2	-
	%	4,3	17,4	78,3	-	16,7	66,7	16,7	-
Этамбутол	МИК	2,0	4,0	8,0	≥16,0	4,0	8,0	-	-
	абс.	6	13	1	3	5	7	-	-
	%	26,1	56,5	4,3	13,0	41,7	58,3	-	-
Этионамид	МИК	5,0	10,0	≥20,0	-	2,5	5	10,0	≥20,0
	абс.	8	7	8	-	3	4	3	2
	%	34,8	30,4	34,8	-	25,0	33,3	25,0	16,7

Так, МИК амикацина в диапазоне 8,0–16,0 мкг/мл ингибировали 95,7% (22/23) штаммов *M.intracellulare* и 91,7% (11/12) штаммов *M.avium*; МИК доксициклина для 100% штаммов обоих видов составила  $\geq 16$  мкг/мл; для 69,6% культур *M.intracellulare* и 75,0% *M.avium* МИК линезолида составила 32,0 мкг/мл. МИК рифабутина в диапазоне 0,5–1,0 мкг/мл ингибировали 82,6% (19/23) штаммов *M.intracellulare* и 66,7% (8/12) штаммов *M.avium*. Стрептомицин в концентрации 16,0 мкг/мл и ципрофлоксацин в концентрации 8,0 мкг/мл ингибировали 56,5% (16/23) и 78,3% (18/23) штаммов *M.intracellulare* и 75,0% (9/12) и 66,7% (8/12) штаммов *M.avium* соответственно.

Были выявлены различия в МИК изониазида, кларитромицина, моксифлоксацина, рифампицина, триметоприм/сульфаметоксазола, этамбутола и этионамида, ингибирующих рост культур изучаемых видов (Таблица 25).

Так, если МИК изониазида для 73,9% (17/23) штаммов *M.intracellulare* составила 2,0–4,0 мкг/мл, то для штаммов *M.avium* преобладающей МИК была концентрация  $\geq 8,0$  мкг/мл – 66,7% (8/12). 73,9% штаммов *M.intracellulare* моксифлоксацин ингибировал в концентрации 2,0 мкг/мл, в то время как диапазон МИК для 91,7% (11/12) штаммов *M.avium* составил 1,0–4,0 мкг/мл без четкого преобладания концентрации препарата ( $p > 0,05$ ). Диапазон МИК рифампицина для 91,3% (21/23) штаммов *M.intracellulare* составил 1,0–4,0 мкг/мл без достоверного различия значений ( $p > 0,05$ ), 58,3% (7/13) штаммов *M.avium* были ингибированы при концентрации  $\geq 8,0$  мкг/мл. МИК триметоприм/сульфаметоксазола для 91,3% (21/23) культур *M.intracellulare* находились в диапазоне 2,0/38,0 –  $\geq 8,0/152,0$  мкг/мл без достоверного ( $p > 0,05$ ) преобладания какой-либо концентрации, для 75,0% *M.avium* – в диапазоне 4,0/76,0 –  $\geq 8,0/152,0$  мкг/мл. Для 82,6% (19/23) штаммов *M.intracellulare* ингибирующими концентрациями этамбутола были 2,0 – 4,0 мкг/мл, для 100% (12/12) штаммов *M.avium* – 4,0 – 8,0 мкг/мл. В отношении МИК этионамида не было выявлено достоверной преобладающей концентрации ( $p > 0,05$ ), для обоих видов, но 3 штамма *M.avium* были ингибированы при концентрации 2,5 мкг/мл.

Для оценки полученных результатов МИК были проведены сравнения с МИК, предложенными CLSI [161], для определения лекарственной чувствительности/устойчивости медленно растущих НТМБ (Таблица 26).

Таблица 26 – Частота лекарственной чувствительности/устойчивости среди исследованных штаммов *M.intracellulare* и *M.avium*

Препараты	Характеристика штаммов	Значения МИК (мкг/мл)				
		по CLSI	<i>M.intracellulare</i> (n=23)		<i>M.avium</i> (n=12)	
			абс.	%	абс.	%
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Амикацин	чувствительные	≤16,0	23	100,0	11	91,7
	промежуточные	32,0	-	-	-	-
	устойчивые	≥64,0	-	-	1	8,3
Доксициклин	чувствительные	≤1,0	-	-	-	-
	промежуточные	2,0-4,0	-	-	-	-
	устойчивые	≥8,0	23	100,0	12	100,0
Изониазид	чувствительные	≤0,5	-	-	-	-
	промежуточные	-	-	-	-	-
	устойчивые	≥1,0	23	100,0	12	100,0
Кларитромицин	чувствительные	≤8,0	23	100,0	10	83,3
	промежуточные	16,0	-	-	2	16,7
	устойчивые	≥32	-	-	-	-
Линезолид	чувствительные	≤8,0	-	-	-	-
	промежуточные	16,0	1	4,3	2	16,7
	устойчивые	≥32,0	22	95,6	10	83,3
Моксифлоксацин	чувствительные	≤1,0	2	8,7	3	25,0
	промежуточные	2,0	17	73,9	4	33,3
	устойчивые	≥4,0	4	17,4	5	41,7
Рифабутин	чувствительные	≤2,0	23	100,0	12	100,0
	промежуточные	-	-	-	-	-
	устойчивые	≥4,0	-	-	-	-
Рифампицин	чувствительные	≤1,0	5	21,7	-	-
	промежуточные	-	-	-	-	-
	устойчивые	≥2,0	18	78,3	12	100,0
Стрептомицин	чувствительные	≤2,5	-	-	-	-
	промежуточные	-	-	-	-	-
	устойчивые	≥5,0	23	100,0	12	100,0
Триметоприм/ сульфаметоксазол	чувствительные	≤2,0/38,0	9	39,1	3	25,0
	промежуточные	-	-	-	-	-
	устойчивые	≥4,0/76,0	14	60,9	9	75,0
Ципрофлоксацин	чувствительные	≤1,0	-	-	-	-
	промежуточные	2,0	1	4,3	-	-
	устойчивые	≥4,0	22	95,7	12	100,0

Продолжение таблицы 26

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Этамбутол	чувствительные	≤2,0	6	26,1	-	-
	промежуточные	4,0	13	56,5	5	41,7
	устойчивые	≥8,0	4	17,4	7	58,3
Этионамид	чувствительные	≤2,5	-	-	3	25,0
	промежуточные	-	-	-	-	-
	устойчивые	≥5,0	23	100,0	9	75,0

При анализе полученных данных выявлена 100% чувствительность штаммов *M.intracellulare* к амикацину, кларитромицину, рифабутину и 91,7%, 83,3% и 100,0% чувствительность штаммов *M.avium* соответственно. Также, среди исследованных культур *M.intracellulare* выявлено 5 (21,7%) штаммов, чувствительных к рифампицину и 6 (26,1%) штаммов, чувствительных к этамбутолу; среди *M.avium* чувствительных штаммов к этим препаратам не выявлено. Не выявлено чувствительных штаммов обоих видов к доксициклину, линезолиду, стрептомицину, ципрофлоксацину.

Кроме того, среди штаммов *M.intracellulare* отмечено значительное число культур с промежуточной чувствительностью/устойчивостью к моксифлоксацину – 73,9% (17/23) и этамбутолу – 56,5% (13/23).

Среди штаммов обоих видов отмечается высокий уровень устойчивости к 8-ми препаратам, из них к доксициклину, изониазиду, стрептомицину – 100%. Также 100% устойчивость штаммов *M.avium* выявлена к рифампицину и ципрофлоксацину; штаммов *M.intracellulare* к этионамиду.

Обращает на себя внимание факт, что среди штаммов *M.intracellulare*, устойчивых к ципрофлоксацину, большинство ингибируется концентрациями препарата ≥8,0 мкг/мл, находящимися за пределами МИК, обозначенными CLSI [161] – 81,8% (18 из 22).

Таким образом, в целом получены схожие данные по чувствительности *M.intracellulare* и *M.avium*. Очень высокий процент чувствительных штаммов отмечен в отношении амикацина, кларитромицина, рифабутин – от 83,3% до 100,0%. Также среди *M.intracellulare* отмечались штаммы, чувствительные к рифампицину и этамбутолу, при отсутствии чувствительности штаммов *M.avium*.

В тоже время, среди штаммов *M.intracellulare* выявлено преобладание устойчивости к 9-ти препаратам, а среди *M.avium* – к 10-ти.

Возможно, при накоплении материала, результаты изменятся, но в настоящее время полученные данные несколько отличаются от опубликованных другими лабораториями.



## **ГЛАВА 5. ОПТИМИЗАЦИЯ РЕГИОНАЛЬНОГО АЛГОРИТМА ВЫЯВЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ**

В экспертном заключении членов основной группы Европейской лабораторной инициативы (ЕЛИ), подготовленном для Европейского региона ВОЗ, приводятся рекомендации по обследованию пациентов с симптоматикой, подозрительной на туберкулез. Согласно этим рекомендациям, предпочтительными должны быть молекулярные тесты и культуральные в жидких питательных средах [3]. Однако в этом же документе указывается на неоднородность стран европейского региона, и соответственно региональных возможностей по использованию тех или иных методов.

В России разработаны свои нормативные документы, в которых рекомендованы алгоритмы диагностики туберкулеза микробиологическими методами [82,84,136]. В регионах РФ возможна оптимизация алгоритма выявления микобактерий исходя из набора применяемых диагностических методов, эффективности их применения, организации лабораторной службы, наличия специалистов.

Следующей задачей настоящего исследования являлась оптимизация регионального алгоритма выявления МБ для диагностики туберкулёза и микобактериоза в РМЭ (Рисунок 7) с включением в него молекулярно-генетических методов, позволяющих в кратчайшие сроки назначать больным адекватное лечение, что обеспечит повышение его эффективности и снижение трансмиссии туберкулёза.

Данные, полученные в результате проведения исследований по оценке эффективности используемого в РМЭ на разных этапах диагностики комплекса различных методов, позволяют обоснованно выбрать самые оптимальные из них для выявления МБ и ТЛЧ и разработать рациональный региональный алгоритм исследований для выявления и диагностики МБТ и НТМБ, включающий наиболее подходящие и эффективные для РМЭ микробиологические и молекулярно-генетические тесты.

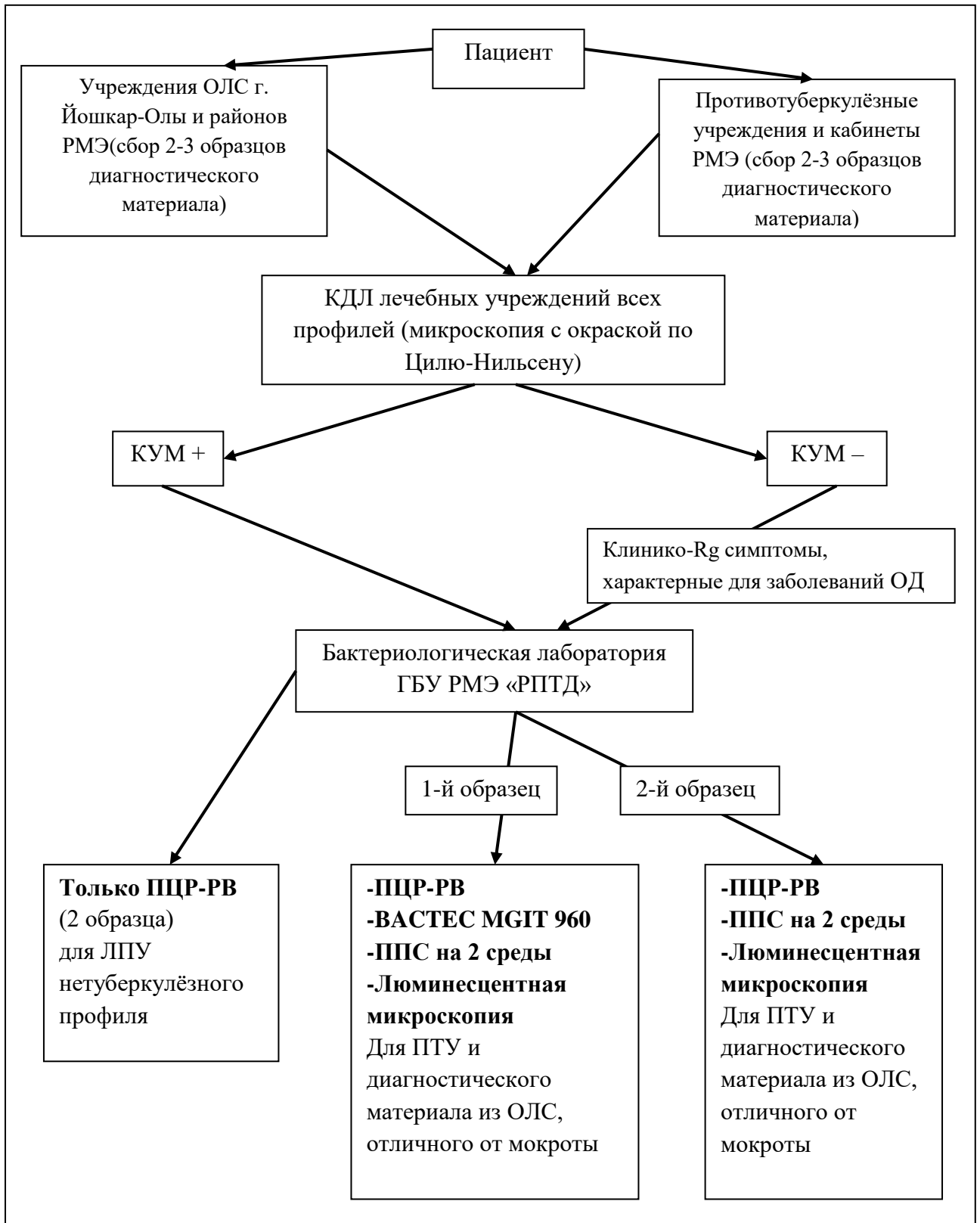


Рисунок 7 – Оптимизированный алгоритм обследования на наличие микобактерий, выполняемый с целью диагностики туберкулёза и микобактериоза в Республике Марий Эл

Примечание: Rg симптомы – рентгенологические симптомы; ОД – органы дыхания

Ранее особенностью диагностического алгоритма в РМЭ являлись массовые культуральные исследования на ППС, проводимые в БЛ РПТД из диагностического материала, направляемого из лечебных учреждений нетуберкулёзного профиля и в отдельных случаях заменяющие собой флюорографические обследования.

Несмотря на положительные результаты применения культурального метода выявления МБ у пациентов из учреждений нетуберкулёзного профиля, с 2015 г. этот метод перестали использовать вследствие его относительной дороговизны, трудоёмкости и недостаточно высокой эффективности. Это позволило более рационально распределить имеющиеся ресурсы, заменив культуральный метод на метод ПЦР-РВ для первичного выявления МБ у пациентов с подозрением на туберкулёз, обследуемых по месту жительства в учреждениях нетуберкулёзного профиля. Вместе с тем, при проведении полноценного обследования с целью диагностики туберкулёза и микобактериоза для пациентов РПТД, продолжили применять культуральный метод на ППС в сочетании с другими методами исследования.

В результате проведенных исследований по сравнению эффективности выявления МБ различными методами было установлено, что в условиях централизованной специализированной БЛ необходимо комплексное применение микроскопических, культуральных методов на ППС и ЖС, а также ПЦР-РВ для полноценного результата при диагностике ТБ и микобактериоза. Все перечисленные методы являются взаимодополняющими. Метод ПЦР-РВ, применяемый для пациентов ПТС, должен быть продублирован классическими микробиологическими методами диагностики.

В итоге был усовершенствован алгоритм выявления МБ для РМЭ (Рисунок 7), который учитывает региональные особенности. Одной из особенностей выявления МБ является централизация культуральных, молекулярно-генетических, а также микроскопических исследований с окраской флюорохромами на базе бактериологической лаборатории РПТД.

Согласно этому алгоритму, в лечебных учреждениях нетуберкулёзного профиля основным методом, по-прежнему, остается метод микроскопии по Цилю-Нильсену, которым исследуются 2-3 порции диагностического материала. При отсутствии КУМ, но наличии у пациента изменений на рентгенограмме и длительного кашля неуточненной этиологии, клинической 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.

Данный вид исследования проводится также и при обнаружении КУМ микроскопическим методом, так как в РМЭ отмечается рост выявления НТМБ.

Таким образом, в учреждениях ОЛС метод ПЦР-РВ используется в качестве скринингового для выявления туберкулёза у длительно кашляющих больных. Исследование диагностического материала от вышеперечисленного контингента пациентов из учреждений нетуберкулёзного профиля РМЭ, направляемого в БЛ РПТД РМЭ для проведения анализа методом ПЦР-РВ на наличие маркеров ДНК МБТ независимо от наличия или отсутствия КУМ, является особенностью оптимизированного алгоритма выявления МБ в РМЭ.

При получении положительного результата ПЦР, также как и при получении позитивного результата микроскопического исследования, пациента консультирует фтизиатр и в дальнейшем проводится дообследование культуральными методами и методом люминесцентной микроскопии на базе БЛ РПТД.

При проведении на базе БЛ РПТД дообследования, а также при обследовании пациентов из противотуберкулёзных кабинетов и отделений, ранее не обследованных в учреждениях нетуберкулёзного профиля, исследуется 2 образца диагностического материала. Оба образца исследуются методом ПЦР-РВ (если данный вид исследования не проводился ранее), методом люминесцентной микроскопии, а также одновременно производится посев двух образцов

диагностического материала на две разные ППС – Левенштейна-Йенсена и Финн-П – и одного из этих двух образцов в ЖС с последующим культивированием в системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США). Несмотря на то, что Приказ МЗ РФ от 29.12.14г. № 951, утверждающий Рекомендации РОФ «Совершенствование диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания», рекомендует исследование обеих порций диагностического материала в ЖС, в РМЭ данным методом исследуется только одна проба.

При получении положительного результата культуральной диагностики в ЖС или на ППС проводится идентификация выросших МБ и ТЛЧ МБТ к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда.

При выявлении НТМБ проводится их видовая идентификация гибридным методом с помощью ДНК-стриповой технологии.

Кратность, объем, полноту обследования контролирует обученный лаборант, используя данные лабораторной информационной системы, в которой содержатся сведения по пациентам РМЭ, обследовавшимся на микобактерии с 90-х годов 20 века.

Таким образом, в результате проведенных исследований оптимизирован алгоритм выявления МБ в РМЭ с учётом свойств популяции микобактерий, циркулирующих на территории республики, требований нормативных документов, региональных особенностей и результатов оценки эффективности применяемых в РМЭ методов микробиологической диагностики туберкулёза и микобактериоза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В Российской Федерации, несмотря на снижение показателей заболеваемости, смертности, сохраняется напряженная эпидемиологическая ситуация по туберкулёзу, обусловленная как ростом лекарственно-устойчивого ТБ, особенно туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, утяжелением клинических форм инфекции, так и достаточно высоким числом больных с сочетанной инфекцией ВИЧ-туберкулез [10]. В Республике Марий Эл также отмечается снижение показателя заболеваемости туберкулёзом. В 2017г. заболеваемость постоянных жителей республики составила 50,5 на 100 тыс. населения, в 2019г. – 39,5 на 100 тыс. населения, в 2021г. – 25,0 на 100 тыс. населения, что на 7,1 % ниже показателя в 2021г. по России, (26,9 на 100 тыс.) [10]. В то же время в РМЭ отмечается высокий уровень больных ТБ с МЛУ. В 2019г. показатель выявления туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью среди бактериовыделителей составил 19,8%, в 2021г. – 21,6% (темп прироста показателя в 2021г. по сравнению с 2019г. составил 9%) [83]. Стоит отметить, что в Марий Эл количество ежегодно выявляемых больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией невысокое и поэтому не оказывает существенного влияния на статистические показатели. Так, в 2017г. доля больных с ВИЧ-инфекцией среди впервые выявленных больных туберкулезом составляла 6,0%, в 2019 г. – 7,0%, в 2021 г. – 6,5% [83].

Обзор научной литературы по вопросам выявления туберкулеза в учреждениях нетуберкулезного профиля показал, что до настоящего времени проблема со своевременной диагностикой в большинстве регионов не решена. Зачастую окончательный диагноз устанавливается пациентам, уже госпитализированным в противотуберкулезные учреждения. ТБ несвоевременно диагностируется у 60% – 80% больных [26,63,99,100,115]. Одним из факторов, способствующих сокращению сроков диагностики, является более широкое использование современных микробиологических методов, позволяющих диагностировать наиболее эпидемиологически опасных больных ТБЛ [165].

В РМЭ, в отличие от других регионов РФ, до 2015г. для учреждений

нетуберкулезного профиля для выявления туберкулеза широко применялся метод посева диагностического материала на плотные питательные среды, как более эффективный по сравнению с микроскопическим. Однако, он трудоемкий и сравнительно дорогой. Поэтому, с 2015г. с внедрением метода ПЦР-РВ в практику работы бактериологической лаборатории противотуберкулезного диспансера, в качестве скринингового для диагностики туберкулеза в учреждениях ОЛС вместо культурального начал применяться этот метод.

Проведенное исследование по сравнению эффективности выявления микобактерий у пациентов, обследованных в учреждениях нетуберкулезного профиля, показало, что самым эффективным ( $p < 0,01$ ) был метод ПЦР-РВ – 5,12% по сравнению с культуральным – 2,09% и микроскопическим – 0,47%.

Обзор литературы показал, что метод ПЦР-РВ во всех исследованиях показал большую чувствительность по сравнению с другими методами, применяемыми в практической фтизиатрии [94,208].

Проведенный на базе бактериологической лаборатории ГБУ РМЭ «РПТД» анализ результатов выявляемости микобактерий туберкулеза из одного образца диагностического материала методами люминесцентной микроскопии, культуральным на ППС и ПЦР-РВ показал наибольшую достоверную эффективность метода ПЦР-РВ ( $p < 0,01$ ) по сравнению с культуральным на плотных средах и микроскопическим для всех видов диагностических материалов. В ходе исследования была выявлена сравнительно низкая эффективность культуральных методов в отношении операционного материала – 26,54% против 91,54% и 81,54% для методов ПЦР-РВ и микроскопического соответственно.

Кроме того, в результате проведенного анализа, не выявлено различий в эффективности сравниваемых методов обнаружения МБТ у больных с различными формами туберкулезного процесса.

При обзоре литературных источников не обнаружено публикаций, посвященных исследованиям по выявлению этиологического фактора туберкулеза различными микробиологическими методами, кроме исследований

микроскопическими методами по Цилю-Нильсену, у лиц с различными диагнозами из учреждений ОЛС. В исследовании, проведенном в г.Омск, анализируются результаты диагностики ТБ при всестороннем обследовании лиц с неспецифическими заболеваниями в пульмонологическом отделении ОЛС. При этом, кроме клинико-рентгенологической картины анализировались результаты иммунологических тестов (пробы Манту и Диаскинтеста), метод ПЦР-РВ применялся только для исследования промывных вод бронхов [17].

Обоснованность возможности широкого применения метода ПЦР-РВ с диагностической целью показана при сравнении эффективности выявления МБТ данным методом и культуральным на плотных питательных средах у лиц с различными предварительными диагнозами из ОЛС. Так, у лиц с первоначальным диагнозом «пневмония» выявляемость МБТ методом ПЦР-РВ составила 5,19%, культуральным на ППС – 3,41% ( $p < 0,002$ ), у лиц с прочими неспецифическими заболеваниями органов дыхания – 3,39% и 0,6% соответственно ( $p < 0,001$ ), «подозрение на туберкулез» – 16,78% и 2,38% соответственно ( $p < 0,001$ ). У лиц с бронхитами метод ПЦР-РВ также был более эффективен, однако разница недостоверна ( $p > 0,05$ ).

Нередко при применении метода ПЦР-РВ, особенно для пациентов, обследованных в ОЛС, актуальна интерпретация положительных результатов исследований на наличие ДНК МБТ, полученных на поздних циклах амплификации ( $\geq 35$  цикл, чаще всего 35-38). Такой результат может указывать как на истинное выделение ДНК МБТ, особенно у олигобациллярных пациентов, так и на контаминацию образца диагностического материала в процессе проведения исследования. Поэтому перед лабораторией стоит задача контроля и предотвращения контаминации на преаналитическом этапе, а также выполнения действий, дающих возможность повтора исследования.

В случае, если исследование проводили из образца диагностического материала, поступившего в БЛ РПТД из ОЛС, только методом ПЦР-РВ, то при подозрении на контаминацию исследовали вторую аликвоту того же образца. При обнаружении ДНК МБТ из второй аликвоты, что происходило в подавляющем



большинстве случаев, результат считали положительным.

При получении образца диагностического материала из учреждений ПТС, параллельно выполняются культуральные исследования. В данном случае возможна контаминация на стадии предпосевной обработки материала. При отсутствии признаков контаминации на стадиях выделения и обнаружения ДНК МБТ (отрицательные ОКО-В и ОКО, отсутствие рядом расположенных положительных образцов) исследование второй аликвоты образца не исключает контаминацию на стадии пробоподготовки. Как правило, результаты исследований совпадали. В данном случае запрашивали повторный образец диагностического материала для исследования методом ПЦР-РВ. При получении положительного результата из дополнительной порции материала, предыдущий результат считали достоверным.

В исследование по оценке достоверности результатов диагностики туберкулеза, полученных методом ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации, были включены только результаты с максимальным исключением вероятности контаминации. В 2013–2018 гг. результат ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации был получен у 332 (28,42%) человек из 1168. Из 332 пациентов 297 (89,46%) были направлены на обследование на МБТ из учреждений ПТС.

Среди лиц с подтвержденным диагнозом ТБ наиболее часто ДНК МБТ определялись на поздних циклах при следующих причинах обследования на МБТ: подозрение на туберкулез – в 94,20% (195 из 207), обследование по поводу длительного кашля – 66,67% (42 из 63), пневмония – 65,71% (23 из 35) ( $p < 0,001$ ).

Число лиц с неподтвержденным туберкулезом составило 17,8% (59). В дальнейшем у 15 из 59 (25,4%) человек установили ХОБЛ, у 11 (18,64%) – пневмонию, у 1 (1,69%) – онкологию, 5 (8,47%) лиц были контактными по ТБ, 26 (44,07%) – ранее переболели туберкулезом и по 1 (1,69%) человеку нет данных.

Из 266 человек с верифицированным туберкулезом у 193 человек (72,56%) результат анализа ПЦР-РВ подтвердился культуральными методами. Также в ходе исследования было показано, что характер мокроты не влияет на диагностику ТБЛ. Кроме того, достаточно часто результаты ПЦР-РВ на поздних

циклах амплификации получали при исследовании таких диагностических материалов как промывные воды бронхов, плевральный экссудат и ликвор. При этом диагноз ТБ достоверно чаще подтверждался.

Таким образом, в результате проведенного исследования показана высокая вероятность подтверждения ТБ при получении положительного результата ПЦР-РВ на поздних циклах амплификации – в 20 раз выше, чем отсутствие ТБ (ОШ=20,326; ДИ 95% 13,640-30,289). В обзоре литературы не обнаружено источников по данной проблеме.

В рамках поставленных задач был проведен сравнительный анализ высеваемости МБТ из 5218 образцов мокроты на плотных средах Левенштейна-Йенсена и Финна II и в жидкой среде Middlebrook 7H9 в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США). Достоверно выше ( $p < 0,05$ ) высеваемость МБТ отмечалась в ЖС – 18,32% против 15,56% на ППС. При этом в 2,89% случаев МБТ выявлены только в ЖС, в 0,96% случаев рост МБТ получен только на ППС. Полученные результаты согласуются с данными большинства литературных источников [92,94,187,172,188,197].

Во втором исследовании по выявлению МБТ на ППС и в ЖС сравнивались результаты получения роста МБТ у 993 впервые выявленных в 2015–2018 гг. больных ТБЛ. Достоверных различий выявлено не было ( $p > 0,05$ ). При этом у 4,23% лиц МБТ выявлены в жидкой питательной среде при отрицательном результате на плотных и у 6,85% больных на ППС при отрицательном результате в ЖС. Подобные результаты выявления МБТ только на ППС были получены в исследовании, проведенном в Чувашской Республике [59].

Разницу в получении результатов в двух разных исследованиях можно объяснить следующим образом: в первом исследовании анализировались результаты высеваемости МБТ из одного образца диагностического материала, а во втором случае анализировалось выявление *бактериовыделителей* МБТ с использованием разных культуральных методов, при этом положительные результаты в ЖС и на ППС могли быть получены из разных образцов диагностического материала. Некоторое преимущество выявляемости МБТ у

впервые выявленных больных на плотных питательных средах над быстрыми методами можно объяснить кратностью обследования. Кратность первичного обследования у данной категории лиц в РМЭ в исследуемый период на плотных питательных средах составила 2,69, в жидкой – 1,09. Из 68 больных ТБЛ с позитивным результатом на плотных средах у 52 (76,48%) диагностический материал в жидкой среде не исследовался.

В ходе решения второй задачи был проведен мониторинг уровня лекарственной устойчивости среди впервые выявленных, рецидивов и прочего контингента больных ТБЛ в Республике Марий Эл за период с 1998 по 2019 годы.

По оценке ВОЗ Российская Федерация вошла в список из 30 стран с высоким уровнем МЛУ-ТБ, при этом более половины случаев туберкулеза с МЛУ-ТБ регистрируется в Индии, Китае и РФ [27,125,176].

В Российской Федерации отмечается как рост суммарной ЛУ МБТ, так и утяжеление ее структуры, причем при всех формах туберкулезного процесса [13]. Так, уровень первичной ШЛУ МБТ в РФ вырос с 2,3% в 2016г. до 4,1% в 2018г. и 3,7% в 2019 г. Уровень изначальной ШЛУ МБТ у больных с рецидивами вырос с 6,8% в 2016 г. до 10,1% в 2019 г.

При анализе динамики показателей ЛУ МБТ в РМЭ было показано, что уровень ЛУ МБТ хотя бы к одному ПТП за более чем 20-ти летний период вырос среди всех контингентов больных. Так среди впервые выявленных больных в 2019 г. по сравнению с 1998 г. данный показатель увеличился в 2,1 раза (с 17,72% до 37,90%), среди больных с рецидивами ТБ в 1,7 раз (с 38,60% до 66,67%), среди прочего контингента больных ТБЛ в 1,2 раза (с 66,14% до 80,0%).

По мнению экспертов ВОЗ, показатель уровня первичной МЛУ выше 10% оказывает отрицательное влияние на показатели эффективности лечения и смертности [125].

Проведенное в РМЭ исследование показало, что рост уровня МЛУ МБТ является наиболее значительным среди всех контингентов больных ТБЛ. Так, среди впервые выявленных больных данный показатель за 22 года достоверно увеличился с 2,11% до 19,77% ( $p < 0,001$ ), среди рецидивов с 15,79% до 53,33%

( $p < 0,05$ ), среди прочего контингента – с 26,69% до 69,41% ( $p < 0,001$ ).

Уровень полирезистентности МБТ в 2019г. по сравнению с 1998г. изменился незначительно у впервые выявленных больных и больных с рецидивами ( $p > 0,05$ ). Среди впервые выявленных больных данный показатель в 1998г. и 2019г. составлял 11,81% и 13,56%, среди рецидивов – 14,04% и 13,33% соответственно. Уровень монорезистентности МБТ у впервые выявленных больных в 2019г. по сравнению с 1998г. увеличился также незначительно – с 3,80% до 4,52%. Среди больных с рецидивами в 2019г. лиц с монорезистентностью не было, а в 1998 г. данный показатель составлял 8,78%.

Отмечено достоверное снижение уровней полирезистентности ( $p < 0,001$ ) и монорезистентности ( $p < 0,05$ ) за указанный период среди прочего контингента больных ТБЛ – полирезистентности с 25,50% до 8,24%, монорезистентности с 13,94% до 2,35%.

Мониторинг ЛУ МБТ за 22-летний период времени показал, что в РМЭ имеет место значительное распространение лекарственно-устойчивых штаммов среди всех контингентов больных ТБЛ, особенно штаммов с МЛУ.

С целью анализа динамики развернутого спектра ЛУ для популяции штаммов МБТ, циркулирующих на территории РМЭ, выполненного с помощью фенотипических методов были выбраны 2010г. и 2019г. Проведенный анализ показал, что за 10-летний период наблюдения значительно уменьшилось абсолютное количество бактериовыделителей, в то же время уровень ЛУ МБТ существенно не изменился у всех контингентов больных ТБЛ. Также не выявлено существенных изменений уровня монорезистентности, полирезистентности и устойчивости к HR среди всех контингентов больных ТБЛ. Как в 2010г., так и в 2019г. среди рецидивов и прочего контингента лиц с устойчивостью к HR преобладали штаммы МБТ с одновременной устойчивостью к препаратам основного и резервного ряда без значимых изменений. В то же время, у впервые выявленных больных отмечается расширение спектра ПТП, к которым отмечалась ЛУ МБТ. Если в 2010 г. среди лиц с устойчивостью к HR было 57,58% больных со штаммами МБТ с одновременной устойчивостью к препаратам

основного и резервного рядов, то в 2019г. удельный вес таких больных увеличился на 34% и составил 77,14% ( $p=0,05$ ). У впервые выявленных больных ТБ в 2010 г. среди штаммов МБТ с ЛУ к HR наиболее часто встречались штаммы с резистентностью к HRS и HRSE – по 19,70%. В 2019г. также наиболее часто встречались штаммы со спектром устойчивости HRS – 11,43%, а удельный вес лиц со штаммами МБТ, устойчивыми к HRSE за последнее десятилетие снизился в 2 раза.

За период с 2010г. по 2019г. отмечается достоверный рост удельного веса больных с ШЛУ на 101,5 % ( $p<0,001$ ) и одновременное достоверное ( $p=0,05$ ) снижение данного показателя на 36,8% у больных с преШЛУ МБТ среди прочего контингента лиц с ТБЛ.

Полученные результаты соответствуют литературным данным по исследованию ЛУ МБТ. Многими авторами отмечается рост штаммов МБТ с МЛУ с одновременной резистентностью к четырем препаратам и более [13,29,47,48,68,76,87,88,103,104].

В целом, среди всех контингентов больных ТБЛ в РМЭ в 2019г. по сравнению с 2010г. частота встречаемости ЛУ к отдельным ПТП основного ряда практически не изменилась ( $p>0,05$ ). Среди впервые выявленных больных и рецидивов не выявлено достоверных различий в уровне резистентности к ПТП резервного ряда за указанный период времени ( $p>0,05$ ).

В то же время, среди впервые выявленных больных в 2019г. следует отметить достоверную разницу ( $p<0,05$ ) в уровне резистентности к фторхинолонам – частота встречаемости ЛУ МБТ к офлоксацину значительно выше (6,21%), чем к моксифлоксацину (1,70%) и левофлоксацину (0,57%).

Среди прочего контингента больных ТБЛ отмечается достоверное снижение частоты встречаемости ЛУ МБТ к ПАСКу – с 19,27% в 2010 г. до 8,24% в 2019 г. ( $p<0,05$ ) и достоверный рост частоты встречаемости ЛУ МБТ к офлоксацину – с 33,95% в 2010 г. до 48,24% в 2019 г. ( $p<0,05$ ).

В РМЭ ежегодно выявляется сравнительно небольшое количество больных-бактериовыделителей с ТБ/ВИЧ, хотя стоит отметить их достоверный рост

( $p < 0,05$ ) за указанный период. В 2010г. такие больные составляли 2,13% среди впервые выявленных бактериовыделителей, а в 2019г. – 6,74%. Поэтому ЛУ МБТ у ВИЧ инфицированных больных ТБЛ не оказывает значительного влияния на уровень ЛУ МБТ в целом, и проанализирована за весь период с 2010 по 2019 годы суммарно. Проведенный анализ показал высокий уровень ЛУ МБТ у данной категории лиц – 58,16% (57/98). Также, как среди впервые выявленных лиц без ВИЧ-инфекции, преобладали штаммы с устойчивостью к HR 34,70% (34/98). Отмечен высокий уровень преШЛУ МБТ( $p=0,009$ ). Так, среди штаммов с ЛУ к HR 47,06% имели преШЛУ. Уровень ШЛУ МБТ составлял 5,10%, что выше, чем данный показатель среди впервые выявленных больных за последнее десятилетие.

Одним из факторов роста показателя ЛУ МБТ, и в частности ШЛУ, является недостаточное использование молекулярно-генетических методов для раннего выявления лекарственной устойчивости МБТ [88].

В рамках поставленных задач, был проведен анализ спектра мутаций, ассоциированных с ЛУ к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам у штаммов МБТ, выделенных в РМЭ.

Было установлено, что 583 штамма МБТ из 794 с выявленными мутациями, ассоциированными с устойчивостью в 2013–2019гг., имели мутации, связанные с ЛУ к изониазиду (H) и рифампицину (R), 206 – только к H и 5 – только к R.

Достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) в РМЭ у всех контингентов больных ТБЛ с МЛУ образцы ДНК МБТ имели мутации в 531 кодоне гена *rpoB* с заменой Ser-Leu и в *katG315* с заменой Ser-Thr1 63,64% (371/583). При этом данное сочетание мутаций у впервые выявленных больных встречалось в 64,19%, среди рецидивов в 68,75%, среди прочего контингента в 63,53% и среди больных ТБ/ВИЧ в 51,28% случаев.

Также можно отметить, что среди всех контингентов больных с МЛУ, кроме ТБ/ВИЧ, довольно часто 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 – 15,07% (82/544).

По частоте встречаемости мутаций, ассоциированных с ЛУ к рифампицину, как и в большинстве регионов РФ, подавляющее большинство штаммов МБТ

среди всех контингентов больных ТБЛ с МЛУ, включая ТБ/ВИЧ, имели мутацию в 531 кодоне гена *proB* с заменой Ser-Leu – 83,7% (488/583).

Рассматривая генные мутации, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду у всех категорий больных ТБЛ с МЛУ и полирезистентностью, выявлено значительное преобладание мутации в 315 кодоне гена *katG* с заменой Ser-Thr1 – 94,55% (746/789), замена Ser-Thr2 встречалась редко – 2,9% (23/789). Второй по частоте встречаемости являлась мутация в гене *inhA* C(-15)T – 18,12% (143/789). Следует отметить, что у 11,76% больных с ВИЧ - инфекцией имелась мутация в гене *katG*315 с заменой Ser-Thr2.

Среди образцов ДНК МБТ с МЛУ при наличии устойчивости к фторхинолонам среди всех контингентов лиц, как и в целом в РФ, наиболее часто встречались мутации в 94 кодоне гена *gyrA* – 68,97% (40 из 58). При этом наиболее часто отмечалась замена Asp-Gly в данном кодоне гена *gyrA* – 55,0% (22/40). Второй по частоте встречаемости среди всех исследуемых штаммов являлась мутация в гене *gyrA*90 с заменой Ala-Val – 20,69%.

Полученные результаты исследований по анализу мутаций, ассоциированных с ЛУ МБТ в Марий Эл, сопоставимы с данными по РФ и стран СНГ.

По результатам исследований, проведенных в России и странах СНГ, было отмечено, что в большинстве штаммов МБТ, устойчивых к рифампицину, выявлена мутация в 531 кодоне гена *proB* с заменой Ser-Leu (в среднем 84,75%) [5,29,75,98,109]; при устойчивости МБТ к изониазиду преобладающей являлась мутация в гене *katG* 315 с заменой Ser-Thr (77% и выше) [5,29,34,75,98,103,109].

По данным публикаций, в России среди мутаций, связанных с ЛУ МБТ к фторхинолонам, наиболее часто выявляются мутации в 94 кодоне с заменой Asp-Gly (35,6% – 66%). Также достаточно часто встречаются мутации в гене *gyrA*90 с заменой Ala-Val (15,3%–20,9%) [5,85,118,175].

Одной из задач диссертационного исследования являлось определение генетических кластеров МБТ, циркулирующих на территории Марий Эл. С этой целью было проведено исследование 233 образцов ДНК МБТ, полученных из

диагностического материала и культур МБТ в 2017–2018 гг., при этом 43 получены от больных с ТБ/ВИЧ. Как и в большинстве регионов Российской Федерации, преобладающим семейством в РМЭ как среди ВИЧ-положительных (72,09%), так и ВИЧ-отрицательных (78,95%) лиц является Beijing – всего 77,68% штаммов. При этом достоверного различия показателя среди обеих групп нет ( $p > 0,05$ ). Однако, если рассматривать генетическое разнообразие штаммов МБТ в зависимости от ЛЧ, то стоит отметить, что у ВИЧ-положительных лиц штаммы семейства Beijing преобладали независимо от чувствительности/устойчивости. В то же время у ВИЧ-отрицательных лиц с сохраненной чувствительностью МБТ доминировали штаммы микобактерий, не относящиеся к семейству Beijing, – 61,54% (16 из 26). При изучении штаммов МБТ, относящиеся к группе nonBeijing, выявлено, что характер распространенности тех или иных генотипов МБТ, циркулирующих в РМЭ отличается от других регионов Приволжского Федерального округа [40,71]. Так, вторыми по распространенности в РМЭ являлись штаммы группы T – 9,87%. При этом в группе T преобладали штаммы сполиготипа SIT53 генотипа T1 – 43,48% (10/23), из них 5 были лекарственно чувствительные. Третьими по распространенности были штаммы МБТ семейства LAM 9 – 3,43%.

Циркулирующая в РМЭ популяция МБТ по встречаемости генотипических кластеров имеет сходство со штаммами МБТ, распространенными на территории Калининградской области, в приграничных районах Монголии и китайской провинции Хэбэй [155,160]. В этих регионах, также как в РМЭ, на втором и третьем местах по встречаемости из штаммов МБТ nonBeijing, наиболее часто выделялись штаммы группы T и LAM.

В рамках диссертационного исследования было проведено сравнение результатов тестирования ЛУ МБТ генотипическим и фенотипическими методами.

В ряде исследований отмечается расхождение между молекулярно-генетическими и фенотипическими методами определения ЛЧ МБТ к рифампицину в 2,6%–5,3% случаев, к изониазиду – в 3,7% [47,123]. В других



исследованиях отмечается более низкая чувствительность метода ПЦР к изониазиду и рифампицину по сравнению с культуральными методами – 90%–95% от фенотипически устойчивых штаммов [141,178].

Первоначально, для проведения сравнительного анализа были сопоставлены результаты параллельного тестирования ЛЧ МБТ, полученные для 706 культур, выделенных от больных ТБЛ из образцов диагностического материала, взятого до начала лечения в 2015–2017 гг., к препаратам первого ряда фенотипическими методами абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена и пропорций в жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 ТЛЧ с помощью анализатора ВАСТЕС MIGT 960 («Becton Dickinson and Company», США).

При расчете чувствительности и специфичности за референсный метод в лаборатории принимался метод абсолютных концентраций, как метод, показывающий на протяжении многих лет отличные показатели внешнего контроля качества ФСВОК.

В результате, чувствительность и специфичность к изониазиду в жидкой среде в системе ВАСТЕС MIGT 960 составили 100% и 98,7% соответственно, к рифампицину – 97,8% и 100%, к стрептомицину – 100% и 97,8%, к этамбутолу – 100% и 95,0%. Полученные результаты сопоставимы с данными литературных источников [94].

Далее проводилось сравнение результатов ЛЧ 930 тестов к изониазиду и рифампицину методами ПЦР-РВ («Амплитуб-МЛУ-РВ», Синтол) и абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена. При этом, 641 образец ДНК МБТ был получен из диагностического материала, 289 – из культуры. В исследовании практически не было выявлено различий чувствительности и специфичности метода ПЦР-РВ в отношении изониазида в зависимости от способа получения ДНК МБТ. В целом, чувствительность и специфичность метода ПЦР-РВ при определении ЛУ к изониазиду составили 94,7% и 96,6% соответственно. Чувствительность и специфичность метода ПЦР-РВ при определении ЛУ к рифампицину составили 94,0% и 98,0% соответственно. Стоит

отметить, что чувствительность метода ПЦР-РВ несколько ниже ( $p > 0,05$ ) при определении ЛУ к рифампицину из образцов диагностического материала.

При этом характер расхождения результатов ЛУ МБТ, полученных генотипическим и фенотипическими методами показал, что в большинстве случаев отмечается отсутствие мутаций к изониазиду и рифампицину при наличии фенотипической устойчивости. Скорее всего, этот факт объясняется наличием достаточно редко встречающихся мутаций у данных штаммов МБТ, выявление которых не предусмотрено использовавшимися тест-системами.

Было проведено сравнение фенотипической и генетической устойчивости 19 штаммов МБТ с выявленными мутациями, ассоциированными с ЛУ к фторхинолонам. В 94,74% (18 из 19) случаев выявлено совпадение генотипической и фенотипической устойчивости к офлоксацину. В отношении моксифлоксацина – из 19 штаммов только 1 штамм имел фенотипическую устойчивость при наличии мутации в 91 кодоне гена *gyrA91* (Ser-Pro), а 18 штаммов МБТ были фенотипически чувствительные. Все 19 штаммов были фенотипически чувствительны к левофлоксацину.

В литературных источниках также отмечается, что достаточно большое количество штаммов МБТ, генотипически устойчивых к фторхинолонам, фенотипически устойчивы к офлоксацину и чувствительны к моксифлоксацину (более 50%) [19,26,35].

В последние годы отмечается повсеместный рост микобактериоза, заболевания, имеющего схожую с туберкулезом клиническую и рентгенологическую симптоматику, возбудителями которого являются около 50 видов микобактерий рода *Mycobacterium* [22,38,163,179,181,190,202]. В литературных источниках отмечается, что первая причина микобактериоза легких в мире – микобактерии комплекса МАС [12,56,190,201,203,205,216]. В Российской Федерации наиболее изученными являются регионы Северо-Западного федерального округа, г.Москва [12,16,52,56,89]. Наиболее распространенными на данных территориях являлись НТМБ комплекса МАС.

При этом в подавляющем большинстве выделялись *M.avium* – от 31,5% до 61,0% в зависимости от региона [12].

В РМЭ наблюдается рост количества выделяемых НТМБ. Так в 2015г. штаммы НТМБ среди всех выделенных микобактерий составляли 2,9%, а в 2019г. – 7,0%.

За период 2015–2019гг. нетуберкулезные микобактерии выделяли 185 человек, проживающие в РМЭ. Всего было идентифицировано 395 культур от этих пациентов, при этом 177 человек выделяли НТМБ из мокроты.

При сравнении бактериовыделителей по полу среди впервые выявленных больных ТБЛ и бактериовыделителей НТМБ, было установлено, что в обеих группах преобладали мужчины ( $p<0,001$ ). В тоже время, отмечено, что женщины, выделяющие НТМБ, встречались достоверно чаще (42,94%), по сравнению с впервые выявленными женщинами–бактериовыделителями МБТ – (22,31%). Также было установлено, что наиболее часто встречаемый максимальный возрастной диапазон лиц, выделявших НТМБ составлял от 55 и старше (58,19%), а лиц, выделявших МБТ – от 25 до 54 лет (70,85%). Полученные результаты согласуются с данными литературных источников [189].

В ходе исследования было установлено, что достоверно чаще ( $p<0,001$ ) выделялись медленнорастущие НТМБ (74,07%), которые были представлены 13-ю видами. Быстрорастущие НТМБ встречались значительно реже (20,11%) и были представлены 6-ю видами. У 2 человек были идентифицированы микобактерии со средней скоростью роста *M.intermedium*, у 9 человек вид НТМБ определить не удалось. Четыре пациента последовательно выделили 2 вида НТМБ: *M.avium* – *M.kansasii*; *M.simiae* – *M.intracellulare*; *M.fortuitum* – *M.gordoniae*; *M.shimoidei* – *M.gordoniae*.

Отмечено, что чаще всего, независимо от скорости роста, бактериовыделение происходило однократно ( $p<0,001$ ) – в 70,9% случаев. Также, как и в большинстве регионов РФ, среди лиц с медленнорастущими 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 микобактерии *M.intracellulare* – в 60,76% среди НТМБ МАС комплекса. Стоит отметить, что в 60,42% случаев *M.intracellulare* выделяли неоднократно.

Микобактерии вида *M.intracellulare* являлись преобладающим видом среди всех выделенных в РМЭ НТМБ (25,40%). Вторым по встречаемости видом был *M.gordoniae* (22,22%), при этом в 92,86% случаев бактериовыделение наблюдалось однократно, третьими по выделяемости были *M.avium* (22,14%), их неоднократно выделяли в 38,7% случаев.

Среди лиц, выделявших быстрорастущие НТМБ, наиболее частым видом (независимо от кратности выделения) был вид *M.fortuitum* (42,11%).

Среди лиц, выделявших НТМБ в 2015–2019гг., 6 человек были ВИЧ инфицированы. Из них 4 человека неоднократно выделяли *M.avium*, и 2 человека однократно выделили *M.gordoniae* и *M.intermedium*.

Для полноценной оценки популяции НТМБ, был проведен анализ пациентов-бактериовыделителей по различным критериям. Все пациенты, выделившие НТМБ в 2015–2019 годах, первоначально обследовались на микобактерии туберкулеза. Чаще всего НТМБ выделяли из мокроты (177 человек), у 5 человек – из мочи, по одному человеку – из отделяемого молочной железы, из менструальной крови и трупного материала.

При анализе учреждений, направивших материал на исследование, было установлено, что в 88,70 % случаев мокрота на исследование поступила из учреждений ПТС. 4 человека обследованы дважды – первоначально в учреждениях ОЛС, затем, после получения результата микробиологического анализа они дообследовались в учреждениях ПТС. Среди выделителей НТМБ, в учреждениях ОЛС чаще всего обследование проводилось лицам с ХОБЛ и рентгенологическими изменениями в легких – 37,5% и 29,17% соответственно.

Наиболее часто НТМБ выделялись у лиц с неспецифическими заболеваниями респираторной системы – 50,83%, реже у лиц с подозрением на ТБЛ – 29,28 % и в 19,89 % случаев у лиц с установленным диагнозом и пролеченных от туберкулеза ранее. Стоит отметить, среди лиц, обследованных по

поводу ТБ и выделивших НТМБ в ПТУ, в 30,56% случаев НТМБ выявили одновременно с МБТ в интенсивную фазу лечения.

Таким образом установлено, что у лиц с симптоматикой заболевания органов дыхания и обратившихся за медицинской помощью в ЛПУ, НТМБ выделялись чаще. Полученные результаты не согласуются с ранее полученными исследованиями других авторов. По данным Т.Ф. Оттен около 70% больных микобактериозом имеют стертую клиническую картину или ее отсутствие и выявляются при профилактических осмотрах [52,90]. В литературных источниках есть отдельные исследования о группах риска по выделению микобактерий, проведенные для лиц, обследованных в том или ином конкретном противотуберкулезном учреждении, но они, как правило, не охватывают обследованием пациентов по региону в целом [53,77,89,116,189].

При сравнении выделенных НТМБ по скорости роста было установлено, что у всех категорий пациентов, кроме лиц, обследованных по поводу ХОБЛ, достоверно чаще выделялись медленнорастущие НТМБ ( $p < 0,05$ ).

Проведенное исследование показало, что у 26,56% выделителей НТМБ были обнаружены КУМ из образцов диагностического материала микроскопическим методом. При этом у 14,9% лиц КУМ обнаружены в учреждениях ОЛС. При дальнейшем исследовании культур МБ, полученных из образцов материала с положительным микроскопическим результатом, в 78,72% случаев определялись медленнорастущие виды НТМБ. Наиболее частыми видами НТМБ определялись *M.intracellulare* (34,04%) и *M.avium* (21,28%). С учетом вышеизложенного, при обследовании на микобактерии необходимо обязательное применение молекулярных методов для лиц с обнаруженными КУМ микроскопическими методами.

Достаточно остро стоит проблема лечения микобактериоза, связанная с природной устойчивостью НТМБ к большинству ПТП [48,49,50], а также с отсутствием в Российской Федерации стандартов определения ЛЧ НТМБ [49].

В ряде публикаций приведены результаты сравнительного анализа ЛЧ *M.avium* и *M.intracellulare*. Так, сотрудниками отдела микробиологии ЦНИИТ

было выявлено, что 78,8% исследованных штаммов *M. avium* и 66,7% штаммов *M. intracellulare* устойчивы к 8 препаратам панели SLOWMYCO для медленно растущих микобактерий (TREK Diagnostic Systems Ltd., Великобритания), три из 33 штаммов *M. avium* были чувствительны только к кларитромицину [49]. Результаты исследования, проведенного Московским научно-практическим центром борьбы с туберкулезом, также показали, что *M. avium* более устойчивы к лекарственным препаратам, чем *M. intracellulare* [50].

Как наиболее часто выделяемые в РМЭ и являющиеся потенциальными возбудителями микобактериоза, 23 штамма *M.intracellulare* и 12 *M.avium* были протестированы на лекарственную чувствительность. В результате проведенного исследования не было выявлено существенных различий МИК для штаммов *M.intracellulare* и *M.avium* в отношении следующих препаратов: амикацина, доксициклина, линезолида, рифабутина, стрептомицина, цiproфлоксацина. Были выявлены различия в МИК изониазида, кларитромицина, моксифлоксацина, рифампицина, триметоприм/сульфаметоксазола, этамбутола и этионамида, ингибирующих рост культур изучаемых видов.

При анализе полученных данных определена 100% чувствительность штаммов *M.intracellulare* к амикацину, кларитромицину, рифабутину и 91,7%, 83,3% и 100,0% чувствительность штаммов *M.avium* соответственно. Также, среди исследованных культур *M.intracellulare* выявлено 5 (21,7%) штаммов, чувствительных к рифампицину и 6 (26,1%) штаммов, чувствительных к этамбутолу; среди *M.avium* чувствительных штаммов к этим препаратам не выявлено. Не выявлено чувствительных штаммов обоих видов к доксициклину, линезолиду, стрептомицину, цiproфлоксацину.

Кроме того, среди штаммов *M.intracellulare*, отмечено значительное число культур с промежуточной чувствительностью/устойчивостью к моксифлоксацину – 73,9% и этамбутолу – 56,5%.

Обращает на себя внимание факт, что среди штаммов *M.intracellulare*, устойчивых к цiproфлоксацину, большинство (81,8%) ингибируется

концентрациями препарата  $\geq 8,0$  мкг/мл, находящимися за пределами МИК, обозначенными CLSI [161].

Современными международными рекомендациями предлагается предпочтение при обследовании лиц с подозрением на туберкулез отдавать быстрым молекулярным тестам и культуральной диагностике в ЖС, а микроскопические методы предлагается использовать в качестве дополнительных [3]. В тоже время отмечается неоднородность стран, и соответственно разные региональные возможности по использованию тех или иных методов.

В Российской Федерации спектр и кратность, а также последовательность применения методов по выявлению микобактерий регламентированы Приказом Минздрава от 29.12.14 № 951 и рядом документов, принятых Российским обществом фтизиатров [84,133,134,136].

В Республике Марий Эл по результатам проведенных исследований был усовершенствован алгоритм выявления МБ, который учитывает региональные особенности, в том числе и централизацию микробиологических исследований на микобактерии. Согласно этому алгоритму, в лечебных учреждениях нетуберкулёзного профиля основным методом выявления микобактерий по-прежнему остается метод микроскопии по Цилю-Нильсену 2-3-х образцов диагностического материала. При отсутствии КУМ, но наличии у пациента клинико-рентгенологической симптоматики, характерной для заболеваний органов дыхания, в том числе длительного кашля неясной этиологии, диагностированных ХОБЛ, пневмонии, проводится исследование диагностического материала методом ПЦР-РВ на наличие маркеров ДНК МБТ на базе БЛ РПТД. Диагностический материал из учреждений ОЛС РМЭ направляется в БЛ РПТД и при обнаружении КУМ микроскопическим методом с целью исключения выделения у пациентов НТМБ.

Таким образом, в учреждениях общей лечебной сети метод ПЦР-РВ практически используется как *скрининговый* для выявления туберкулёза и микобактериоза у кашляющих больных.

При получении положительных результатов микроскопическим и методом ПЦР-РВ после консультации фтизиатра больному проводится дообследование дополнительными методами 2-х образцов диагностического материала. При этом один образец диагностического материала исследуется культуральными методами на средах Левенштейна–Йенсена, Финна II и в жидкой среде Middlebrook 7H9 в автоматизированной системе ВАСТЕС MGIT 960 («Becton Dickinson and Company», США), а также люминесцентная микроскопия и ПЦР исследование (если ранее данный вид исследования не проводился). Второй образец исследуется теми же методами, что и первый, кроме метода посева в ЖС. При получении культур микобактерий в ЖС или на ППС проводится их идентификация и ТЛЧ МБТ к противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда.

При выявлении НТМБ проводится их идентификация до вида гибридизационным методом с помощью ДНК-стриповой технологии.

При поступлении диагностического материала в БЛ РПТД из учреждений туберкулезного профиля для выявления МБ применяются все доступные методы.

Кратность, объем, полноту обследования контролирует обученный лаборант, используя данные лабораторной информационной системы, которая включает бактериограммы всех жителей Марий Эл, обследованных на базе БЛ РПТД.



## 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 Т – 9,87% с превалированием сполиготипа SIT53 генотипа Т1 (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 СОКРАЩЕНИЙ**

- БЛ – бактериологическая лаборатория
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖС – жидкая(ие) питательная(ые) среды
- КДЛ – клинико-диагностическая лаборатория
- КУМ – кислотоустойчивые микобактерии
- Л-Й – плотная среда Левенштейна-Йенсена
- ЛПУ – лечебно-профилактическое(ие) учреждение(я)
- ЛУ – лекарственная устойчивость
- ЛЧ – лекарственная чувствительность
- МБТ – микобактерии туберкулеза, *Mycobacterium tuberculosis*
- МГМ – молекулярно-генетические методы
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- НЗЛ – неспецифические заболевания легких
- НТМБ – нетуберкулезные микобактерии
- ОЛС – общая лечебная сеть
- ПМСП – первичная медико-санитарная помощь
- ППС – плотная(ые) питательная(ые) среда(ы)
- ПТП – противотуберкулезные препараты
- ПТС – противотуберкулезная служба
- ПТУ – противотуберкулезное(ые) учреждение(я)
- ПФО – Приволжский федеральный округ
- ПЦР-РВ – полимеразно-цепная реакция в реальном времени
- РМЭ – Республика Марий Эл
- РПТД – Республиканский противотуберкулезный диспансер
- ТБ – туберкулез
- ТБЛ – туберкулез легких

ХОБЛ	– хроническая обструктивная болезнь легких
ТЛЧ	– тесты лекарственной чувствительности
ШЛУ	– широкая лекарственная устойчивость
Ala	– аланин
Am	– амикацин
Arg	– аргинин
Asn	– аспарагин
Asp	– аспартат
C	– цитозин
Cm	– капреомицин
CLSI	– Clinical and Laboratory Standards Institute – Институт по клиническим и лабораторным стандартам, США
Cs	– циклосерин
Cys	– цистеин
E	– этамбутол
Etio	– этионамид
G	– гуанин
Gln	– глутамин
Gly	– глицин
FQ	– фторхинолоны
H	– изониазид
His	– гистидин
Ile	– изолейцин
Leu	– лейцин
Met	– метионин
Km	– канамицин
MGIT	– Mycobacteria Growth Indicator Tube – индикаторная пробирка для выращивания микобактерий
OfI	– офлоксацин
Pro	– пролин

Pas	– ПАСК
R	– рифампицин
S	– стрептомицин
Ser	– серин
SIT	– Spoligotype International Type - международный вариант сполиготипа
T	– тимин
Thr	– треонин
Tyr	– тирозин
Val	– валин
Z	– пиразинамид

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Автоматизированная система ускоренной культуральной диагностики туберкулеза / К. Р. Быкадорова, В. Т. Чубарян, Н. И. Будина, С. И. Рыжков. – Текст : непосредственный // Туберкулез сегодня : материалы VII Российского съезда фтизиатров. – Москва, 2003. – С. 82.
2. Адамбекова, А. Д. Нетуберкулезные микобактерии и их классификация / А. Д. Адамбекова. – Текст : непосредственный // Известия ВУЗов Кыргызстана. – 2010. – № 7. – С. 43–46.
3. Алгоритм лабораторной диагностики и мониторинга лечения туберкулеза легких и туберкулеза с лекарственной устойчивостью на основе применения современных быстрых молекулярных методов. – Текст : электронный // Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро : [сайт]. – URL: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0004/336118/ELI-TV-Laboratory\\_diag\\_algorithm\\_RUS.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/336118/ELI-TV-Laboratory_diag_algorithm_RUS.pdf?ua=1) (дата обращения: 15.11.2021).
4. Аналитический обзор по туберкулезу в Российской Федерации за 2004 год: характеристики эпидемического процесса и противотуберкулезной службы. – Москва, 2006. – 55 с. – Текст : непосредственный.
5. Андреевская, С. Н. Динамика распространенности мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, в современной популяции *M. tuberculosis* в Российской Федерации / С. Н. Андреевская. – Текст : непосредственный // Вестник ЦНИИТ. – 2020. – № S 2. – С. 11-12.
6. Баранчукова, А. А. Туберкулез легких и хронические заболевания органов дыхания нетуберкулезной этиологии / А. А. Баранчукова, Е. Ю. Пушкарева. – Текст : непосредственный // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 2 (78). – С. 241-243.
7. Биоразнообразие и эволюция циркулирующих популяций бактерий и вирусов. Новые проблемы медицинской микробиологии / А. Б. Жебрун, С. Л. Мукомолов, О. В. Нарвская, Г. Я. Ценева, Л. А. Кафтырева, И. В. Мокроусов. – Текст : непосредственный // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 5. – С. 93-98.



8. Валиев, Р. Ш. Состав больных, направляемых в дифференциально-диагностическое отделение противотуберкулезного диспансера / Р. Ш. Валиев, А. Р. Валиев, Н. Р. Закирова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – № 7 (94). – С. 43-46.
9. Василенко, Н. В. Современные взгляды на генетические семейства *M. tuberculosis* / Н. В. Василенко, А. М. Будрицкий. – Текст : непосредственный // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 13, № 5. – С. 16-22.
10. Васильева, И. А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 – 2020-2021 гг. / И. А. Васильева, В. В. Тестов, С. А. Стерликов. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2022. – Т. 100, № 3. – С. 6-12.
11. Великая, О. В. Хроническая обструктивная болезнь легких у пациентов с впервые выявленным туберкулезом органов дыхания / О. В. Великая, А. В. Лушникова, Н. Е. Хорошилова. – Текст : непосредственный // Научно-медицинский вестник центрального Черноземья. – 2014. – № 58. – С. 109-112.
12. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий у больных микобактериозом на территориях Северо-Западного федерального округа России / Д. А. Старкова, В. Ю. Журавлев, А. А. Вязовая, Н. С. Соловьева, О. Н. Куликова, О. В. Нарвская. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни лёгких. – 2019. – Т. 97, № 6. – С. 16-22.
13. Вишневский, Б. И. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза : лекция / Б. И. Вишневский. – Текст : непосредственный // Медицинский альянс. – 2017. – № 1. – С. 29-35.
14. Влияние экспресс-детекции резистентности *M. tuberculosis* к рифампицину на эффективность химиотерапии у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя / А. Г. Самойлова, М. В. Буракова, И. А. Васильева, В. В. Ленская, Э. В. Ваниев. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни лёгких. – 2016. – Т. 94, № 9. – С. 18-23.

15. Внелегочный туберкулез: клинико-эпидемиологическая характеристика и диагностика / И. И. Солоненко, Г. Л. Гуревич, Е. М. Скрыгина, М. И. Дюсьмикеева. – Текст : непосредственный // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2018. – Т. 96, № 6. – С. 22-28.
16. Выделение и идентификация нетуберкулезных микобактерий / В. И. Литвинов, И. Р. Дорожкова, М. В. Макарова, М. А. Краснова, Г. Е. Фрейман. – Текст : непосредственный // Вестник РАМН. – 2010. – № 3. – С. 7-11.
17. Выявление и дифференциальная диагностика туберкулеза у пациентов пульмонологического отделения с внебольничной пневмонией и хронической обструктивной болезнью легких / И. И. Дубровская, Н. В. Багишева, А. В. Мордык, Е. Ю. Небесная, Л. И. Бахшиева. – Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2020. – № 3 (30). – С. 305-311.
18. Выявление микобактерий туберкулеза в мокроте у больных ВИЧ-инфекцией при использовании современного алгоритма этиологической диагностики заболевания / В. Н. Зимина, О. Е. Микова, Т. А. Варецкая, Д. А. Оборин, С. Ю. Дегтярева, В. И. Сергевнин. – Текст : непосредственный // Инфекционные болезни. – 2018. – № 1 (16). – С. 28-34.
19. Генетический полиморфизм и фенотипическая устойчивость *Mycobacterium tuberculosis* к офлоксацину и моксифлоксацину / Д. В. Вахрушева, Т. В. Умпелева, Н. И. Еремеева, Л. С. Лавренчук, С. Ю. Красноборова, А. Е. Панова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2020. – Т. 98, № 11. – С. 27-31.
20. Генетическое разнообразие лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Омской области / О. А. Пасечник, М. А. Дымова, В. Л. Стасенко, М. П. Татаринцева, Л. П. Колесникова, Е. С. Ляпина. – Текст : непосредственный // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 7. – С. 33-39.
21. Генотипирование уральских изолятов *Mycobacterium tuberculosis* / С. Н. Скорняков, Т. В. Умпелева, А. А. Вязовая, М. А. Кравченко, Н. И. Еремеева,

- О. В. Нарвская. – Текст : непосредственный // Биологические науки. – 2014. – № 9. – С. 2485-2488.
22. Гунтупова, Л. Д. Микобактериозы во фтизиопульмонологической практике : обзор литературы и собственный опыт / Л. Д. Гунтупова, С. Е. Борисов, И. П. Соловьева. – Текст : непосредственный // Практическая медицина. – 2011. – № 3 (51). – С. 39-50.
23. Дейкина, О. Н. Дифференциальная диагностика туберкулёза легких и внебольничной пневмонии / О. Н. Дейкина, В. Ю. Мишин, О. В. Демихова. – Текст : непосредственный // Проблемы туберкулёза и болезни легких. – 2007. – № 11. – С. 47-63.
24. Диагностика и лечение легочного микобактериоза у пациентов с подозрением на туберкулез легких / П. И. Елисеев, А. О. Марьяндышев, И. В. Тарасова, А. Хелдал, С. Г. Хиндеракер. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96, № 7. – С. 61-62.
25. Диагностика туберкулеза микробиологическими методами в учреждениях противотуберкулезной службы и общей лечебной сети / Л. И. Русакова, В. В. Пунга, Л. П. Капков, М. А. Якимова, Э. В. Путова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – № 5 (88). – С. 139-140.
26. Дифференциальная диагностика деструктивного туберкулеза легких / Н. Л. Карпина, Р. Б. Асанов, Е. Р. Шишкина, А. Э. Эргешов. – Текст : непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2019. – № S2. – С. 33-35.
27. Доклад о глобальной борьбе с туберкулезом 2019 г. : резюме / Всемирная организация здравоохранения, 2020. – Текст: электронный. – URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/978924156571-rus.pdf> (дата обращения: 23.03.2022).
28. Дорожная карта по предупреждению и борьбе с лекарственно-устойчивым туберкулезом. Комплексный план действий по профилактике и борьбе с туберкулезом с множественной и широкой лекарственной устойчивостью в

- Европейском регионе ВОЗ на 2011-2015 гг. – Копенгаген : Европейское региональное бюро ВОЗ, 2011. – С. 103. – Текст : электронный. – URL: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0009/169704/e95786r.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/169704/e95786r.pdf?ua=1) (дата обращения 15.02.2021).
29. Ершов, В. И. Анализ структуры и тенденций развития лекарственной устойчивости возбудителя туберкулёза в России и за рубежом / В. И. Ершов, С. Ю. Кашников, Н. Е. Мартынова. – Текст : электронный // Электронный эпидемиологический атлас Приволжского федерального округа. – Нижний Новгород : ННИИЭМ, 2018. – URL: <http://epid-atlas.nniiem.ru/> (дата обращения: 15.11.2021).
30. Значение молекулярно-генетических методов в ранней диагностике туберкулеза легких с МЛУ МБТ / А. А. Яковчук, О. Н. Фомин, М. В. Павлова, Н. В. Сапожникова, Л. И. Арчакова, С. В. Мазохина, Н. С. Соловьева, А. А. Старшинова, Э. К. Зильбер. – Текст : непосредственный // Множественная и широкая лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза. Проблемы, перспективы диагностики и лечения : материалы юбилейной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня образования Орловского противотуберкулезного диспансера. – Орел, 2013. – С. 89-90.
31. Ивушкина, Л. В. Мониторинг оппортунистической микрофлоры при вторичных инфекциях органов дыхания у больных туберкулезом легких и динамика устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов *Streptococcus Gr. Viridans* / Л. В. Ивушкина. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2013. – № 2. – С. 39-44.
32. Изучение лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* с помощью тест-системы Sensititre МусоТВ на основе определения критических концентраций химиопрепаратов / М. В. Макарова, Ю. Д. Исаева, Л. Ю. Крылова, В. И. Литвинов. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2015. – № 3. – С. 18-24.
33. Исаева, Т. Х. Особенности течения впервые выявленного туберкулёза лёгких в зависимости от генотипа *M. tuberculosis* / Т. Х. Исаева, И. А. Васильева, Л.

- Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Инфекционные болезни. – 2011. – Т. 9, № 2. – С. 68-72.
- 34.Исакова, Ж. Т. Мутации в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* в штаммах *M. tuberculosis*, циркулирующих в Кыргызской Республике / Ж. Т. Исакова. – Текст : непосредственный // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 3 (выпуск 2). – С. 89-91.
- 35.Исследование перекрестной чувствительности МБТ к некоторым противотуберкулезным препаратам у больных туберкулезом в Томской области / П. Н. Голубчиков, Е. А. Крук, С. П. Мишустин, В. Е. Павлова, Д. Ю. Щегерцов, А. С. Аллилуев. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97, № 12. – С. 7-12.
- 36.Ким, Т. М. Методы диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза / Т. М. Ким. – Текст : непосредственный // Известия вузов Кыргызстана. – 2015. – № 4. – С. 40-43.
- 37.Клиническая значимость комплексной характеристики возбудителя туберкулеза / О. А. Маничева, В. Ю. Журавлев, А. О. Барнаулов, Н. С. Соловьева, М. З. Догонадзе, А. А. Вязовая, Н. Н. Мельникова, М. В. Павлова, И. В. Мокроусов, Б. И. Вишневский, О. В. Нарвская. – Текст : непосредственный // Медицинский альянс. – 2013. – № 2. – С. 29-35.
- 38.Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство : в 2 т. Т. II / под ред. В. В. Долгова, В. В. Меньшикова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 808 с. – Текст : непосредственный.
- 39.Клинические рекомендации по этиологической диагностике туберкулеза / С. Н. Скорняков, М. В. Шульгина, Б. М. Ариэль, Г. С. Баласанянц, Д. В. Вахрушева, А. В. Владимиров, В. Б. Галкин, Л. М. Гринберг, В. Ю. Журавлев, М. А.Кравченко, С. Ю. Красноборова, А. В. Мордык, Т. И. Петренко. – Текст : непосредственный // Медицинский альянс. – 2014. – № 3. – С. 39-58.
- 40.Концевая, И. С. Основные генетические группы *Mycobacterium tuberculosis* в Самарской области: специальность 03.02.07 «Генетика» : автореф. дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук / Концевая Ирина Сергеевна ; ФГБОУ ВПО

- «Самарский государственный университет». – Самара, 2014. – 24 с. – Текст : непосредственный.
- 41.Кривонос, П. С. Дифференциальная диагностика туберкулеза легких и пневмоний в амбулаторных условиях / П. С. Кривонос, В. Л. Крыжановский. – Текст : непосредственный // Медицинская панорама. – 2010. – № 12. – С. 39-40.
- 42.Кричевская, Н. А. Роль молекулярно-генетических методов исследования лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в лечении больных деструктивным специфическим процессом легких / Н. А. Кричевская. – Текст : электронный // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=12350> (дата обращения: 20.10.2021).
- 43.Культуральный метод исследования микобактерий. Жидкие питательные среды и автоматизированные системы / Э. В. Севастьянова, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2020. – № 4. – С. 88-95.
- 44.Лабораторная диагностика туберкулеза : методические материалы к проведению цикла тематического усовершенствования / под ред. В. В. Ерохина. – Москва : Р.Валент, 2012. – 702 с. – Текст : непосредственный.
- 45.Лаушкина, Ж. А. Особенности нетуберкулезных заболеваний легких, выявляемых во фтизиатрических стационарах / Ж. А. Лаушкина, В. А. Краснов. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – № 7. – С. 38-42.
- 46.Лебедев, Ю. И. Множественная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у впервые выявленных больных туберкулезом легких / Ю. И. Лебедев, М. Г. Анфилова, П. П. Востриков. – Текст : непосредственный // Профилактическая медицина-2020 : сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Санкт-Петербург, 2020. – С. 7-11.

47. Лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* (исторические аспекты, современный уровень знаний). – Текст : непосредственный / И. А. Бурмистрова, А. Г. Самойлова, Т. Е. Тюлькова, Э. В. Ваниев, Г. С. Баласанянц, И. А. Васильева // Туберкулез и болезни легких. – 2020. – Т. 98, № 1. – С. 54-61.
48. Лекарственная устойчивость микобактерий: эпидемиология : (Обзор литературы) / В. И. Литвинов, Е. Ю. Носова, М. В. Макарова, М. А. Краснова, М. В. Сеницын, Е. М. Белиловский, Е. М. Богородская. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2019. – № 3. – С. 42-66.
49. Лекарственная чувствительность медленно растущих нетуберкулезных микобактерий / С. Н. Андреевская, Е. Е. Ларионова, Т. Г. Смирнова, И. Ю. Андриевская, Е. А. Киселева, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – Т. 94, № 4. – С. 43-50.
50. Лекарственная чувствительность микобактерий комплекса *avium-intracellulare* (mac) / В. И. Литвинов, М. В. Макарова, Е. Н. Хачатурьянц, Ю. Д. Михайлова, Г. Е. Фрейман, Л. Д. Гунтупова, А. О. Чижова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2018. – № 4. – С. 14-19.
51. Лекарственно-устойчивый туберкулез: перспективы ускоренной диагностики и химиотерапии / Л. Н. Черноусова, С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, О. И. Ивахненко, Е. А. Новоселова, Н. А. Шевкун. – Текст : непосредственный // Бактериология. – 2017. – № 1 (2). – С. 25-34.
52. Литвинов, В. И. Нетуберкулезные микобактерии / В. И. Литвинов, М. В. Макарова, М. А. Краснова ; ГБУ здравоохранения города Москвы "Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы". – Москва : МНПЦБТ, 2008. – 256 с. – Текст : непосредственный.

53. Литвинов, В. И. Нетуберкулезные микобактерии, микобактериозы / В. И. Литвинов. – Текст : непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2018. – № 2. – С. 5-20.
54. Лушникова, А. В. Туберкулёз лёгких и ХОБЛ / А. В. Лушникова, О. В. Великая. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 6. – С. 624. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=11263> (дата обращения 08.08.2021).
55. Ляшенко, А. А. Генетические варианты микобактерий туберкулеза и их эпидемиологическая значимость / А. А. Ляшенко. – Текст : непосредственный // ScienceRise. – 2015. – Т. 3, № 4 (8). – С. 13-18.
56. Макарова, М. В. Нетуберкулезные микобактерии / М. В. Макарова, Л. Д. Гунтупова. – Текст: электронный // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2020. – № 2 (20). – С. 97-102. – URL: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102> (дата обращения 07.07.2021).
57. Марьяндышев, А. О. Чувствительность и специфичность методов генотипирования при диагностике туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя и микобактериозов. – Текст : непосредственный / А. О. Марьяндышев, П. И. Елисеев // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2014. – № 1-2. – С. 64-70.
58. Мета-анализ распространенности *Mycobacterium tuberculosis* генотипов beijing и latin-american mediterranean в Российской Федерации и странах ближнего зарубежья / О. А. Пасечник, А. И. Блох, А. А. Вязовая, В. Л. Стасенко. – Текст : непосредственный // Журнал инфектологии. – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 97-106.
59. Метод ускоренной диагностики туберкулеза / Т. Р. Возякова, О. Е. Стебловская, В. Н. Максимова, Ж. В. Еленкина, Л. В. Афанасьева. – Текст : электронный. – URL: [www.med.sar.ru](http://www.med.sar.ru). (дата обращения 18.03.2020).
60. Методы идентификации микобактерий / Е. Е. Ларионова, С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Э. В. Севастьянова, Л. Н. Черноусова. – Текст :



- непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2021. – № 1. – С. 87-98.
61. Микобактериозы органов дыхания / В. И. Литвинов, Л. Д. Гунтупова, М. В. Макарова, Е. Н. Хачатурьянц. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2019. – № 4. – С. 32-47.
62. Микробиологическая диагностика туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя / Л. Н. Черноусова, С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова. – Текст : непосредственный // Болезни органов дыхания. Приложение к журналу Consilium Medicum. – 2019. – № 1. – С. 13–16.
63. Мишин, В. Ю. Выявление и диагностика туберкулеза легких в учреждениях первичной медико-санитарной помощи / В. Ю. Мишин. – Текст : непосредственный // Российский медицинский журнал. – 2013. – Т. 21, № 7. – С. 373-378.
64. Молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза методом ПЦР в реальном времени. Технология «АМПЛИТУБ». – Текст: электронный. – URL: <http://syntol.ru/upload/iblock/668/668cfb7845b8f32a223124ad74a3a780.pdf>. (дата обращения: 22.06.2020).
65. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с различным ВИЧ-статусом в Омской области / А. А. Вязовая, О. А. Пасечник, М. П. Татаринцева, О. В. Нарвская, И. В. Мокроусов. – Текст : непосредственный // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 49.
66. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Уральского региона России / Т. В. Умпелева, М. А. Кравченко, Н. И. Еремеева, А. А. Вязовая, О. В. Нарвская. – Текст : непосредственный // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 1. – С. 21-28.
67. Молекулярные основы возникновения лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis* / М. А. Дымова, А. Н. Ширшова, Е. А. Храпов, У.

- А. Кожамкулов, Т. И. Петренко, А. Г. Чередниченко, М. Л. Филипенко. – Текст : непосредственный // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия : Биология, клиническая медицина. – 2012. – Т. 10, № 2. – С. 243-251.
68. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GenoType Mycobacterium CM/AS (HAIN Lifescience, Германия) / Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская, В. В. Устинова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 5. – С. 54-59.
69. Мониторинг лекарственной устойчивости штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Омской области / Л. П. Колесникова, О. А. Пасечник, Е. С. Ляпина, Н. Л. Ковалевич, Н. Д. Пиценко. – Текст : непосредственный // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2015. – Т. 5, № 9. – С. 1131-1134.
70. Мордовская, Л. И. Опыт использования ПЦР в диагностике туберкулеза / Л. И. Мордовская, С. Д. Алексеева. – Текст : непосредственный // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 91-156.
71. Морозова, Т. И. Молекулярно-генетический анализ штаммов *M. tuberculosis* в Саратовской области / Т. И. Морозова, Т. Ю. Салина, А. Н. Данилов. – Текст : непосредственный // Медицинский Альянс. – 2015. – № 1. – С. 73-74.
72. Морозова, Т. И. Распространенность и спектр первичной лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза у больных туберкулезом и поздней стадией ВИЧ-инфекции / Т. И. Морозова, Т. И. Салина. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2018. – № 3. – С. 74-75.
73. Мусатова, Н. В. Диагностика и дифференциальная диагностика милиарного туберкулеза легких / Н. В. Мусатова, Н. В. Кузьмина. – Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2008. – № 3. – С. 98-101.

74. Мутации в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированные с генотипической МЛУ: доминирующие варианты в современной (2011-2018 гг.) популяции российских штаммов и метаанализ мировых данных / С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андриевская, Э. В. Севастьянова, Л. Н. Черноусова, А. Э. Эргешов. – Текст : непосредственный // Уральский медицинский журнал. – 2018. – № 8. – С. 5-9.
75. Мутации генов и лекарственная устойчивость *M.tuberculosis* у пациентов, находящихся под наблюдением в городе Москве / М. А. Краснова, Е. М. Белиловский, С. Е. Борисов, А. А. Хахалина, Ю. Д. Михайлова, Е. Ю. Носова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97, № 12. – С. 34-45.
76. Мякишева, Т. В. Эпидемиологическая ситуация и динамика лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Смоленской области за 2005-2010 гг. / Т. В. Мякишева, М. А. Гуденков. – Текст : непосредственный // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 1. – С. 4-9.
77. Нетуберкулезные микобактерии у пациентов с заболеваниями органов дыхания (клинико-лабораторное исследование) / А. Э. Эргешов, Е. И. Шмелев, М. Н. Ковалевская, Е. Е. Ларионова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2016. – № 3 (26). – С. 303-308.
78. Нетуберкулезные микобактерии: современные возможности видовой идентификации / А. В. Лямин, А. М. Ковалёв, А. В. Жестков, О. В. Кондратенко, Д. Д. Исмагуллин. – Текст : непосредственный // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 11-14.
79. Нечаева, О. Б. Туберкулез в России 2019. – Текст: электронный. – URL: <https://medne.t.ru/images/materials/СМТ/tuberkulez-2019.pdf> (дата обращения: 12.04.2021).
80. Новые возможности диагностики внелегочного туберкулеза / М. И. Дюсьмикеева, Е. М. Скрыгина, Н. В. Яцкевич, Д. С. Котович, И. И. Солонко,

- Ю. А. Сороковик. – Текст : непосредственный // Лечебное дело : научно-практический терапевтический журнал. – 2018. – № 5 (63). – С. 32-38.
81. Новые возможности диагностики туберкулеза в пульмонологическом отделении стационара / Е. А. Бородулина, Б. Е. Бородулин, А. Т. Инькова, Е. С. Вдоушкина, Л. В. Поваляева. – Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2019. – Т. 29, № 3. – С. 321-326.
82. О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации : Приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109. – Москва, 2003. – 347 с. – Текст : непосредственный.
83. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Республики Марий Эл в 2021 году: Доклад. – Йошкар-Ола: Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Марий Эл, 2022. – С. 66-68. – Текст : непосредственный.
84. Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания : Приказ Минздрава РФ от 29.12.14 № 951. – Москва, 2014. – 44 с. – Текст : непосредственный.
85. Опыт применения технологии «ТБ-ТЕСТ» («БИОЧИП-ИМБ», Россия) в диагностическом алгоритме / Д. В. Вахрушева, Н. И. Еремеева, Т. В. Умпелева, К. В. Белоусова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – № 95 (10). – С. 29-35.
86. Особенности бактериологической диагностики туберкулеза у пациентов, коморбидных по хронической обструктивной болезни легких / С. А. Руденко, Л. В. Пузырева, А. В. Мордык, Ю. А. Багишева. – Текст : непосредственный // Медицинский альманах. – 2017. – № 2 (47). – С. 113-116.
87. Особенности спектра лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза у впервые выявленных больных / О. А. Пасечник, Е. Д. Астафурова, Р. В. Бокарева, Л. Н. Кортусова. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – С. 10-24.

88. Отраслевые и экономические показатели противотуберкулёзной работы в 2018–2019 гг. Аналитический обзор основных показателей и статистические материалы / С. А. Стерликов, О. Б. Нечаева, В. Б. Галкин, И. М. Сон, В. В. Тестов, С. А. Попов, В. С. Бурыхин, С.Б. Пономарёв, Л. И. Русакова, Н. И. Мезенцева, Д. А. Кучерявая, О. В. Обухова, А. В. Дергачёв, С. С. Саенко ; под ред. С.А. Стерликова. – Москва: РИО ЦНИИОИЗ, 2020. – С.13-18. – Текст
89. Оттен, Т. Ф. Микобактериоз / Т. Ф. Оттен, А. В. Васильев. – Санкт-Петербург : Медицинская пресса, 2005. – 224 с. – Текст : непосредственный.
90. Оттен, Т. Ф. Микобактериоз легких: клинико-бактериологические критерии диагностики / Т. Ф. Оттен. – Текст : непосредственный // Большой Целевой Журнал о туберкулезе. – 1999. – № 3. – С. 17-19.
91. Оценка комплекса микробиологических и молекулярно-генетических методов исследований для диагностики туберкулеза / Э. В. Севастьянова, В. А. Пузанов, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 1 – С. 35-41.
92. Оценка результатов выявления микобактерий, полученных различными методами исследования / Э. В. Севастьянова, Е. Е. Ларионова, Т. Г. Смирнова, И. Ю. Андриевская, С. Н. Андреевская, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Медицинский альянс. – 2018. – № 3. – С. 25-30.
93. Оценка эффективности ускоренных бактериологических и молекулярно-генетических методов в диагностике и лечении туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью / Л. К. Суркова, Е. М. Скрягина, Е. Н. Николенко, О. М. Залуцкая, Н. В. Яцкевич. – Текст : непосредственный // Мультирезистентный туберкулез : новые научные достижения и их практическое применение : материалы международной научно-практической конференции (г. Минск, 17-18 ноября 2016 года). – Минск, 2016. – С. 78-83.
94. Панова, А. Е. Лабораторная диагностика туберкулёза / А. Е. Панова // Цикл онлайн-вебинаров «Актуальные проблемы диагностики, профилактики и терапии туберкулеза и сочетанных инфекций» : [сайт]. – Текст : электронный.

- URL: [http:// phtziatr.iopd.ru>images/News/2020/2020-Lab-diag](http://phtziatr.iopd.ru/images/News/2020/2020-Lab-diag) (дата обращения 08.12.2021).
95. Патогенные и условно-патогенные микобактерии / М. В. Шульгина, О. В. Нарвская, И. В. Мокроусов, И. А. Васильева // Москва : НЬЮ-ТЕРРА, 2018. – 104 с., ил. – Текст : непосредственный.
96. Пахомова, Е. В. Результаты этиологической диагностики туберкулеза у больных коинфекцией ВИЧ-инфекция / туберкулез в Республике Карелия / Е. В. Пахомова, Ю. М. Маркелов, Т. В. Сунчалина. – Текст : непосредственный // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2018. – Т. 96, № 1. – С. 18-23.
97. Перельман, М. И. Туберкулез в Российской Федерации / М. И. Перельман. – Текст: электронный. – URL: [federalbook.ru/ FSZ/Tom8 /VI/](http://federalbook.ru/FSZ/Tom8/VI/) (дата обращения: 12.08.2021).
98. Применение метода ПЦР в реальном времени для определения и контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза / М. А. Владимирский, Ю. С. Аляпкина, Д. А. Варламов, Я. И. Алексеев, Л. К. Шипина, М. В. Шульгина, Л. В. Домотенко, К. Р. Быкадорова, Н. Н. Гащенко, Б. Ендоурова, Б. В. Иванова, Е. А. Ильина, О. А. Левкова, Т. В. Маркова, В. П. Наземцева, Е. П. Павлова, А. И. Полозов, Н. В. Шишкина. – Текст : непосредственный // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – Т. 85, № 4. – С. 38-44.
99. Причины поздней диагностики острых деструктивных заболеваний легких / Е. В. Кашуба, О. Ф. Козлова, С. Н. Лешок, Н. Г. Белобородова, Л. И. Замятина, А. В. Бердюгин, Н. А. Ушарова. – Текст : непосредственный // Множественная и широкая лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза. Проблемы, перспективы диагностики и лечения : материалы юбилейной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня образования Орловского противотуберкулезного диспансера. – Орел, 2013. – С. 23-24.
100. Проблемы организации выявления и диагностики туберкулеза легких в общей лечебной сети / А. В. Павлунин, М. А. Шарафутдинова, С. Б. Борисова,

- Р. Ф. Мишанов, Е. В. Медоваров. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 11. – С. 18-22.
101. Пшеничникова-Пеленёва, И. М. Генотипические и фенотипические маркеры лекарственной устойчивости микобактерий туберкулёза у больных туберкулёзом в сочетании с ВИЧ-инфекцией / И. М. Пшеничникова-Пеленёва, А. Е. Ширинкина, Х. Азизулла. – Текст : электронный // Пульс : медико-фармацевтический журнал. – URL: [http://dx doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2019-7-49-53](http://dx.doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2019-7-49-53) (дата обращения: 08.07.2021).
102. Расчет клинической и экономической эффективности алгоритмов этиологической диагностики туберкулеза / Д. В. Вахрушева, С. Н. Скорняков, Н. И. Еремеева, Т. В. Умпелева, К. В. Белоусова, М. А. Кравченко. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 5. – С.65-71.
103. Результаты it-мониторинга распространенности лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза на территории Ярославской области в 2011-2018 годах / М. Н. Голованова, О. Г. Челнокова, И. А. Ефремов, А. Г. Николаев, О. Ю. Соснина. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2019. – № 2. – С. 24-28.
104. Результаты пилотного исследования распространения туберкулеза с лекарственной устойчивостью в городе Москве / Е. М. Белиловский, Ю. Д. Михайлова, А. О. Темлякова, М. А. Краснова, А. А. Хахалина, И. В. Перетокина, Г. Е. Фрейман, С. Г. Сафонова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2019. – № 3. – С. 4-12.
105. Роль теста GeneXpert MTB/RIF в повышении эффективности лечения больных впервые выявленным МЛУ туберкулезом легких в Ставропольском крае Российской Федерации / Е. С. Чумакова, О. Г. Комиссарова, Р. Ю. Абдуллаев, В. С. Одинец. – Текст : непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2018. – №1. – С. 76-83.

106. Рубинштейн, Г. Р. Дифференциальная диагностика заболеваний легких / Г. Р. Рубинштейн. – Москва : Медгиз, 1954. – 376 с. – Текст : непосредственный.
107. Салина, Т. Ю. Генетическое разнообразие штаммов *Mycobacterium tuberculosis* у больных без бактериовыделения / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова, Н. В. Шишкина. – Текст : непосредственный // Актуальные проблемы туберкулеза : материалы VII межрегиональной научно-практической и учебно-методической конференции с международным участием / под общей редакцией А. В. Асеева. – Тверь, 2018. – С. 91-93.
108. Салина, Т. Ю. Молекулярно-генетический анализ и спектр мутаций в генах *katG*, *inhA*, *rpoB*, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду и рифампицину у больных туберкулезом и ВИЧ-инфекцией / Т. Ю. Салина, С. А. Чуркин, Т. И. Морозова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – Т. 94, № 8. – С. 54-59.
109. Салина, Т. Ю. Распространенность мутаций в генах микобактерий туберкулеза, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду и рифампицину, у больных туберкулезом в разных возрастных группах / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни лёгких. – 2019. – Т. 97, № 4. – С. 12-18.
110. Севастьянова, Э. В. Современные алгоритмы микробиологической диагностики туберкулеза / Э. В. Севастьянова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни лёгких. – 2018. – № 7 (96). – С. 11-17.
111. Сивокозов, И. В. Трудности дифференциальной диагностики диссеминированных процессов в легких / И. В. Сивокозов, Е. И. Шмелев, О. В. Ловачева. – Текст : непосредственный // Медицинский совет. – 2013. – №11. – С. 58-61.
112. Синьков, В. В. Эпидемиология туберкулеза в России: эпидемиологические и исторические доказательства в пользу сценария распространения «пекинского» генотипа *M. tuberculosis* в XX веке / В. В. Синьков, Е. Д.



- Савилов, О. Б. Огарков. – Текст : непосредственный // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2010. – № 6 (55). – С. 23-27.
113. Современная характеристика биологии и перспективы диагностики штаммов *M. tuberculosis* / А. В. Москалев, В. Б. Сбойчаков, А. В. Апчел, В. Н. Цыган. – Текст : непосредственный // Вестник Российской Военно-медицинской академии. – 2018. – № 4 (64). – С. 214-222.
114. Современные подходы к ускоренной диагностике и определению лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза с использованием бактериологических и молекулярно-генетических методов / С. Г. Сафонова, Е. Ю. Носова, К. Ю. Галкина, И. Р. Дорожкова. – Текст : непосредственный // Туберкулёз и социально значимые заболевания. – 2016. – № 4. – С. 11–15.
115. Современный взгляд на диагностические ошибки при полостных образованиях в легких / Н. Л. Карпина, Р. Б. Асанов, Е. Р. Шишкина, А. Д. Егорова, А. Э. Эргешов. – Текст : непосредственный // Врач. – 2021. – № 2. – С. 32-36.
116. Соломай, Т. В. Эпидемиологические особенности микобактериозов, вызванных нетуберкулезными микобактериями / Т. В. Соломай. – Текст : непосредственный // Санитарный врач. – 2015. – № 3.– С. 30-36.
117. Сочетанные инфекции. Туберкулез и ВИЧ-инфекция / В. Ю. Мишин, А. В. Мишина, М. В. Левченко, А. Л. Собкин, А. Э. Эргешов. – Текст : непосредственный // Consilium Medicum. – 2017. – № 19 (11). – С. 59-63.
118. Спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, у клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* отражает трансмиссивность мутантных клонов / А. Э. Эргешов, С. Н. Андреевская, Е. Е. Ларионова, Т. Г. Смирнова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Молекулярная биология. – 2017. – № 51 (4). – С. 595-602.
119. Спектр первичной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к лекарствам у больных туберкулезом в зависимости от статуса по вирусу иммунодефицита человека / В. Н. Зимица, О. Е. Микова, Т. А. Варецкая, Д. А. Оборин, С. Ю.

- Дегтярева, В. И. Сергевнин. – Текст : непосредственный // Терапевтический архив. – 2017. – № 11 (89). – С. 50-54.
120. Сравнительное изучение генотипов *M. tuberculosis* из приграничных районов Монголии и Республики Бурятия / С. Н. Жданова, О. Б. Огарков, А. Д. Молонов, М. В. Бадлеева, Л. С. Унтанова, Е. Д. Савилов, Ю. А. Баранова, Л. В. Тейхриб, П. В. Корнилова. – Текст : непосредственный // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – № 2 (96). – С. 63-66.
121. Сравнительные аспекты течения впервые выявленного туберкулеза, изолированного и при его сочетании с ХОБЛ, у пациентов старше 50 лет / Н. В. Багишева, А. В. Мордык, С. А. Руденко, Ю. А. Неганова, Н. А. Неганова. – Текст : непосредственный // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – №3. – С. 73-77.
122. Сравнительный анализ биологических свойств основных семейств генотипов *M. tuberculosis* у впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания / Н. Г. Павлов, Г. И. Алексеева, М. К. Винокурова, М. В. Черных, М. В. Яковлева, Е. И. Иванова. – Текст : непосредственный // Якутский медицинский журнал. – 2021. – № 2 (74). – С. 76-81.
123. Сравнительный анализ результатов молекулярно-генетических и культуральных методов в определении лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза / Н. П. Кушнир, В. С. Ложкин, Н. Л. Ковалевич, А. Н. Коломеец. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97, № 11. – С. 65-66.
124. Стандартные операционные процедуры "Определение чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам второго ряда в системе ВАСТЕС MGIT 960/320" / Л. Н. Черноусова, Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, А. Е. Панова, Н. Н. Гащенко, С. Н. Андреевская. – Москва, 2015. – 35 с. – Текст : непосредственный.
125. Сюнякова, Д. А. Особенности эпидемиологии туберкулеза в мире и в России в период 2015-2020 гг. : аналитический обзор / Д. А. Сюнякова. – Текст : электронный // Социальные аспекты здоровья населения : электронный

- научный журнал. – 2021. – № 3 (67). – URL: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/1273/30/lang,ru/> (дата обращения: 07.10.2021).
126. Тарашкевич, Н. В. Эффективность молекулярно-генетического метода GeneXpert MTB/RIF для диагностики туберкулеза / Н. В. Тарашкевич, Е. С. Камёнок. – Текст : электронный // Новые задачи современной медицины : материалы III Международной научно-практической конференции. – Санкт Петербург, 2014. – С. 68-70. – URL: <https://moluch.ru/conf/med/archive/153/6676/> (дата обращения 02.10.2021).
127. ТБ/ВИЧ в Российской Федерации. Эпидемиология, особенности клинических проявлений и результаты лечения / Г. Ж. Ашенова, В. Б. Галкин, З. М. Загдын, О. Г. Зырянова, М. А. Комкова, Ю. С. Кононенко, М. В. Лехляйдер, М. А. Милютина, Б. М. Малиев, О. Б. Нечаева, О. В. Овсянкина, В. И. Панасюк, С. В. Петухова, Н. Д. Пирогова, С. Б. Пономарёв, С. А. Попов, Л. И. Русакова, О. А. Подгайная, А. К. Свичарская, С. В. Смердин, С. А. Стерликов, А. Н. Стрелков, В. В. Тинькова, Е. Г. Фролов, Л. Н. Чиганова, Е. А. Юхнова ; под ред. С. А. Стерликова. – Москва: РИО ЦНИИОИЗ, 2018. – С. 32-40. – ISBN: 978-5-9906257-4-7. – Текст : непосредственный.
128. Тесты лекарственной чувствительности микобактерий. Часть 1. Метод абсолютных концентраций на плотной среде Левенштейна-Йенсена / Э. В. Севастьянова, Е. Е. Ларионова, С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2021. – № 2. – С. 81-93.
129. Тесты лекарственной чувствительности микобактерий. Часть 3. Метод пропорций на жидкой питательной среде / Т. Г. Смирнова, Е. Е. Ларионова, С. Н. Андреевская, Э. В. Севастьянова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2021. – № 4. – С. 59-78.

130. Туберкулез в Российской Федерации 2008 гг. : аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. – Москва, 2009. – С. 112–130. – Текст : непосредственный.
131. Туберкулез легких и пневмонии – важнейшие аспекты диагностики на уровне специализированного консультативного приема / А. Ф. Московчук, В. Ф. Болотникова, А. В. Давид, Е. В. Бурдух, Н. Н. Наливайко, И. Д. Левченко. – Текст : непосредственный // Туберкулез и социально значимые заболевания. – 2013. – № 2. – С. 77-78.
132. Ускоренная культуральная диагностика туберкулеза с использованием автоматизированных систем ВАСТЕС MGIT 960 и МВ/ВАСТ / О. А. Иртуганова, Н. С. Смирнова, А. М. Мороз, В. И. Литвинов. – Текст : непосредственный // Проблемы туберкулеза. – 2002. – № 1. – С. 58-62.
133. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания. – Тверь : Триада, 2014. – 56 с. – Текст : непосредственный.
134. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза у ВИЧ-инфицированных. – Москва, 2014. – 38 с. – Текст : непосредственный.
135. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. – Тверь : Триада, 2014. – 72 с. – Текст : непосредственный.
136. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. – Москва, 2015. – 36 с. – Текст : непосредственный.
137. Фенотипическая чувствительность к противотуберкулезным препаратам штаммов *M. tuberculosis* с мутациями, ассоциированными с устойчивостью к рифампицину и изониазиду / Л. Н. Черноусова, Е. Е. Ларионова, Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская, И. Ю. Андриевская, А. Э. Эргешов. – Текст :

- непосредственный // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2017. – № 1. – С. 10-18.
138. Фтизиатрия / Д. Б. Гиллер, В. Ю. Мишин, П. Н. Новоселов, М. В. Шилова, И. И. Мартель, И. И. Ениленис, В. В. Короев, О. Ш. Кесаев, Г. В. Щербакова, А. А. Глотов, Л. П. Северова, Б. Д. Гиллер, А. Ю. Мушкин, С. П. Завражнов, А. В. Мишина, К. И. Аксенова, О. Н. Дейкина, И. А. Денисенко, Т. П. Дударова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 576 с. – ISBN 978-5-9704-5490-9. – Текст : непосредственный.
139. Характеристика клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием молекулярно-биологических методов / И. Г. Шемякин, В. Н. Степаншина, И. Ю. Иванов, М. Ю. Липин, О. В. Коробова, В. А. Анисимова. – Текст : непосредственный // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. – 2003. – № 1. – С. 32-40.
140. Характеристика лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией / Г. В. Панов, С. Н. Скорняков, А. И. Цветков, Е. Е. Ларионова, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 2. – С. 50-54.
141. Характеристика популяции *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Карелия / Вязовая А. А., Соловьева Н. С., Сунчалина Т. В., Мокроусов И. В., Журавлев В. Ю., Нарвская О. В. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – № 94(8) С. 48-53.
142. Химиотерапия туберкулеза: проблемы и перспективы / И. А. Васильева, А. Г. Самойлова, А. Э. Эргешов, Т. Р. Багдасарян, Л. Н. Черноусова. – Текст : непосредственный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 67, № 11. – С. 9-14.
143. Хоменко, А. Г. Туберкулез. Руководство для врачей / А. Г. Хоменко. – Москва : Медицина, 1996. – 496 с. – Текст : непосредственный.
144. Хроническая обструктивная болезнь легких и туберкулез как взаимоотягощающие заболевания / Н. В. Багишева, Ю. А. Неганова, Н. А.

- Неганова, А. В. Мордык, О. Г. Иванова, Т. Л. Батищева, А. С. Безукладова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 6. – С. 21–22.
145. Черняев, А. Л. Диагностические ошибки в пульмонологии / А. Л. Черняев. – Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2005. – № 3. – С. 5-11.
146. Чункаева, Д. Д. К вопросу о микробиологической диагностике туберкулеза и лекарственной устойчивости : обзор литературы / Д. Д. Чункаева, А. А. Мансурова. – Текст : непосредственный // Наука и Здоровоохранение. – 2017. – № 6. – С. 116-130.
147. Шилова, М. В. Заболеваемость туберкулезом населения Российской Федерации / М. В. Шилова. – Текст : непосредственный // Медицинский алфавит. Серия «Обзорение». – 2019. – Т. 1, № 15 (390). – С. 7-18.
148. Эпидемическая ситуация по туберкулёзу в России. – Текст : электронный // ФГБУ ЦНИИОЗ: [сайт]. – URL: <https://mednet.ru/images/materials/СМТ/tuberkulez-2019.pdf> (дата обращения: 15.11.2021).
149. Эргешов, А. Э. Новые технологии диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза / А. Э. Эргешов, Л. Н. Черноусова, С. Н. Андреевская. – Текст : непосредственный // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2019. – Т. 74, № 6. – С. 413-422.
150. Эффективность ускоренного метода выявления и определения лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам / А. Д. Адамбекова, А. Ш. Алишеров, Г. К. Гончарова, А. М. Мусаева. – Текст : непосредственный // Здоровоохранение Кыргызстана. – 2013. – № 1. – С. 13-17.
151. Эффективность химиотерапии туберкулеза легких у впервые выявленных пациентов при разных сроках определения множественной лекарственной устойчивости возбудителя / М. В. Буракова, И. А. Васильева, Э. В. Ваниев, Т. Р. Багдасарян, А. Г. Самойлова. – Текст : непосредственный // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 11. – С. 63-68.

152. Adam, J. C. Diagnosis of active tuberculosis disease: From microscopy to molecular techniques / J. C. Adam, L. W. Nancy. – Text : direct // Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases. – 2016. – Vol. 4. – P. 33-43.
153. A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting / L. E. Kivihya-Ndugga, M. R. van Cleeff, W. A. Githui, L. W. Nganga, D. K. Kibuga, J. A. Odhiambo, P. R. Klatser. – Text : direct // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2003. – Vol. 7. – P. 1163-1171.
154. A microbiological revolution meets an ancient disease: improving the management of tuberculosis with genomics / M. Wlodarska, J. C. Johnston, J. L. Gardy, P. Tangd. – Text : direct // Clinical Microbiology Reviews. – 2015. – Vol. 28(2). – P. 523-539.
155. At Baltic crossroads: a molecular snapshot of *Mycobacterium tuberculosis* population diversity in Kaliningrad, Russia / I. Mokrousov, T. Otten, T. Zozio, E. Turkin, V. Nazemtseva, A. Sheremet, B. Vishnevsky, O. Narvskaya, N Rastogi. – Text : direct // FEMS Immunology and medical microbiology. – 2009. – Vol. 55, № 1. – P. 13-22.
156. Augustynowicz-Kopec, E. Evaluation of Bactec MGIT 960 fluorescent method in diagnosis of tuberculosis /E. Augustynowicz-Kopec, A. Jaworski, Z. Zwolska. – Text : direct // // Pneumonologia i alergologia polska. – 2002. – Vol. 70(9-10). – P.450-457. – ISSN: 0867-7077.
157. Babafemi, E. O. Effectiveness of real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pathological samples: a systematic review and meta-analysis / E. O. Babafemi. – Text : electronic // Syst Rev: [сайт]. – URL : doi: 10.1186/s13643-017-0608-2 (дата обращения: 15.11.2021).
158. Bhatt, M. Pulmonary tuberculosis as differential diagnosis of lung cancer /M. Bhatt, S. Kant, R. Bhaskar. – Text : direct // South Asian Journal Cancer. – 2012. – Vol. 48. – P. 36-42.

159. Brode, S. K. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review / S. K. Brode, C. L Daley, T. K. Marras. – Text : direct // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2014. – Vol. 18(11). – P. 1370-1377. – ISSN 1027-3719.
160. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hebei, China: genotypes and drug susceptibility phenotypes / Yanan Li, Xinrui Cao, Shiming Li, Hao Wang, Jianlin Wei, Peng Liu, Jing Wang, Zhi Zhang, Huixia Gao, Machao Li, Kanglin Wan, Erhei Dai. – Text : electronic // *BMC Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 16 (107). – URL: doi: 10.1186/s12879-016-1441-2 (дата обращения: 15.11.2021).
161. Clinical and laboratory standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved Standard-Second Edition, CLSI Document M 24–A2. Text : electronic // Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne. – 2011. – URL: <https://clsi.org> / (дата обращения: 17.07.2021).
162. Daley, C. L. 36 Nontuberculous mycobacterial infections / C. L. Daley, D. E. Griffith. – Text : direct // *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*. Vol. 2. – 6th Edition. – Amsterdam : Elsevier Inc, 2016. – P. 629-645.
163. Daley, C. L. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections / C. L. Daley, D. E. Griffith. – Text : direct // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2010. – Vol. 14(6). – P. 665-671.
164. Davood, A. Mycobacteriosis and tuberculosis: laboratory diagnosis / A. Davood, M. Tahereh, G. Kazem. – Text : direct // *The Open Microbiology Journal*. – 2018. – Vol. 12. – P. 41-58.
165. Diagnosis of tuberculosis: available technologies, limitations, and possibilities / S. K. Garg, R. P. Tiwari, D. Tiwari, D. Tiwari, R. Singh, D. Malhotra, V. K. Ramnani, G. B. Prasad, R. Chandra, M. Fraziano, V. Colizzi, P. S. Bisen. – Text : direct // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2003. – Vol. 17(5). – P. 155-163.



166. Diagnostic accuracy of in-house real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis / Z. Wei, X. Zhang, C. Wei, L. Yao, Y. Li, X. Zhang, H. Xu, Y. Jia, R. Guo, Y. Wu, K. Yang, X. Gao. – Text : direct // BMC Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 19. – P. 701.
167. Diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF for tuberculosis detection in different regions with different endemic burden: a systematic review and metaanalysis / S. Li, B. Liu, M. Peng, M. Chen, W. Yin, H. Tang, Y. Luo, P. Hu, H. Ren. – Text : direct // PLoS One. – 2017. – Vol. 12 (7). – P. e0180725.
168. Differences in risk factors and drug susceptibility between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* lung diseases in China / Z. Zhang, Y. Pang, Y. Wang, C. Cohen, Y. Zhao, C. Liu. – Text : direct // The International Journal of Antimicrobial Agents. – 2015. – Vol. 45. – P. 491-495.
169. Dynamic antibody responses to the *Mycobacterium tuberculosis* proteome / S. Kunnath-Velayudhan, H. Salamon, H. Y. Wang, A. L. Davidow, D. M. Molina, V. T. Huynh, D. M. Cirillo, G. Michel, E. A. Talbot, M. D. Perkins, P. L. Felgner, X. Liang, M. L. Gennaro. – Text : direct // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Vol. 107. – P. 14703-14708.
170. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial lung disease and tuberculosis, Hawaii, USA / J. Adjemian, T. B. Frankland, Y. G. Daida, J. R. Honda, K. N. Olivier, A. Zelazny, S. Honda, D. R. Prevots. – Text : electronic // Emerging Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 23(3). – P. 439–447. – URL: <https://doi.org/10.3201/eid2303.161827> (дата обращения: 16.03.2020).
171. Epidemiology of tuberculosis and progress toward meeting global targets – worldwide, 2019 / R. Fukunaga, P. Glaziou, J. B. Harris, A. Date, K. Floyd, T. Kasaeva. — Text : electronic // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2021. – Vol. 70. – P. 427-430. – URL: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7012a4> (дата обращения: 13.11.2021).
172. Evaluation of the effectiveness of BACTEC MGIT 960 for the detection of mycobacteria in Bangladesh / M. Hasan, S. K. Munshi, M. S. Banu Momi, F.

- Rahman, R. Noor. – Text : direct // International Journal of Mycobacteriology. – 2013. – Vol. 2. – P. 214-219.
173. Evaluation of the nitrate reductase assay for rapid detection of extensively drug-resistant tuberculosis / S. Rosales, L. Pineda-García, N. Andino, N. Almendarez, H. Membreño, S. E. Hoffner. – Text : direct // The international journal of tuberculosis and lung disease. – 2009. – Vol. 13. – P. 1542-1549.
174. Falkinham, J. Mycobacterial aerosols and respiratory disease / J. Falkinham. – Text : direct // Emerging Infectious Diseases. – 2003. – Vol. 9. – P. 763-767.
175. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review / E. Avalos, D. Catanzaro, A. Catanzaro, G. Theodore, B. Stephanie, A. John, R. Timothy. – Text : electronic // PLoS One. – 2015. – Vol.10 (3). – P. e0120470. – URL : doi:10.1371/journal.pone.0120470 (дата обращения: 21.10. 2020).
176. Global Tuberculosis Report 2020. – Text : electronic // World Health Organization 2020. – URL: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf] (дата обращения 15.11.2021).
177. Gordin, F. F. *Mycobacterium avium complex* // in: Part III Infectious Diseases and Their Etiologic Agents, Section M. Mycobacterial Diseases / F. F. Gordin, C. R. Horsburgh. – Text : direct // Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8 th Edition. – 2015. – Vol. – P. 214-257. – ISBN 9781455748013.
178. Grandjean, L. Tuberculosis in the developing world: recent advances in diagnosis with special consideration of extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) / L. Grandjean, D. Moore. – Text : direct // Current Opinion in Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 21 (5). – P. 454-461.
179. Griffith, D. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of non-tuberculosis mycobacterial diseases / D. Griffith, T. Aksamit, B.

- Brown-Elliott. – Text : direct // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2007. – Vol. 175(4). – P. 367-416.
180. Heifets, L. MIC as a quantitative measurement of the susceptibility of *Mycobacterium avium* strains to seven antituberculosis drugs / L. Heifets. – Text : direct // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1988. – Vol. 32. – P. 1131-1136.
181. Heifets, L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria / L. Heifets. – Text : direct // Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. – 2004. – Vol. 25 (3). – P. 283-2953.
182. Heifets, L. Qualitative and quantitative drug-susceptibility tests in mycobacteriology / L. Heifets. – Text : direct // The American review of respiratory disease. – 1988. – Vol. 137. – P. 1217-1222.
183. Heifets, L. Susceptibility testing of *Mycobacterium avium complex* isolates / L. Heifets. – Text : direct // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1996. – Vol. 40. – P. 1759-1767.
184. Highest prevalence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation / M. A. Dymova, V. N. Kinsht, A. G. Cherednichenko, E. A. Khrapov, A. V. Svistelnik, M. L. Filipenko. – Text : direct // The Journal of Medical Microbiology. – 2011. – Vol. 60. – P. 1003-1009.
185. Highly transmitted M. tuberculosis strains are more likely to evolve MDR/XDR and cause outbreaks, but what makes them highly transmitted? / A. K. Alame Emane, X. Guo, H.E. Takiff, S. Liu. – Text : direct // Tuberculosis. – 2019. – Vol. 129. – P. 92-102.
186. Kumar, G. Whole cell & culture filtrate proteins from prevalent genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* provoke better antibody / G. Kumar. – Text : direct // T cell. – 2012. – Vol. 135. – P. 745-755.
187. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting / V. N. Chihota, A. D. Grant, K. Fielding, B. Ndibongo, A. Zyl,

- D. Muirhead, G. J. Churchyard. – Text : direct // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2010. – Vol. 14(8). – P. 1024-1031.
188. Lu, D. Comparison of the automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens / D. Lu, B. Heeren, W. M. Dunne. – Text : direct // The American Journal of Clinical Pathology. – 2002. – Vol. 118 (4). – P. 542-545.
189. Management of nontuberculous mycobacterial infection in the elderly / M. Mirsaedi, M. Farshidpou, G. Ebrahimi, S. Aliberti, J. O. Falkinham 3<sup>rd</sup>. – Text : direct // European journal of internal medicine. – 2014. – Vol. 25 (4). – P. 356-363.
190. Marras, T. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria / T. Marras, C. Daley . – Text : direct // Journal Clinics in Chest Medicine. – 2002. – Vol. 23 (3). – P. 553-567.
191. Mass spectrometry-based identification of new serum biomarkers in patients with multidrug resistant pulmonary tuberculosis / D. Lin, W. Wang, F. Qiu, Y. Li, X. Yu, B. Lin, Y. Chen, C. Lei, Y. Ma, J. Zeng, J. Zhou. – Text : direct // Nan fang yi ke da xue xue bao. – 2019. – Vol. 39. – P. 1409-1420.
192. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria / M. Cruciani, C. Scarparo, M. Malena, O. Bosco, G. Serpelloni, C. Mengoli. – Text : direct // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Vol. 42(5). – P. 2321-2325.
193. Mokrousov, I. The quiet and controversial: Ural family of *Mycobacterium tuberculosis* / I. Mokrousov . – Text : direct // Infection, Genetics and Evolution. – 2012. – N 12. – P. 619-629.
194. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* circulated in Moscow, Russian Federation / M. V. Afanas'ev, L. N. Ikryannikova, E. N Il'ina, A. V.Kuz'min, E. E. Larionova, T. G. Smirnova, L. N. Chernousova, V. M. Govorun. – Text : direct // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 30, № 2. – P. 181-191.

195. Multidrug-resistance tuberculosis in Europe, 2010-2011 / G. Gunther, F. van Leth, S. Alexandru, N. Altet, K. Avsar, D. Bang, R. Barbuta, G. Bothamley, A. Ciobanu, V. Crudu, M. Davilovits, M. Dedicoat, R. Duarte, G. Gualano, H. Kunst, W. de Lange, V. Leimane, C. Magis-Escurra, A. M. McLaughlin, I. Muylle, V. Polcová, E. Pontali, C. Popa, R. Rumetshofer, A. Skrahina, V. Solodovnikova, V. Spinu, S. Tiberi, P. Viikklepp, C. Lange; TBNET. – Text : direct // Emerging Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 21, № 3. – P. 409-416.
196. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia / S. Simons, J. van Ingen, P. R Hsueh, N. Van Hung, P. N. Dekhuijzen, M. J. Boeree, D. van Soolingen. – Text : direct // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 17 (3). – P. 343-349.
197. Performance of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of mycobacterium in Bangkok, Thailand / L. O. Srisuwanvilai, P. Monkongdee, L. J. Podewils, K. Ngamlert, V. Pobkeeree, P. Puripokai, P. Kanjanamongkolsiri, W. Subhachaturas, P. Akarasewi, C. D. Wells, J. W. Tappero, J. K. Varma. – Text : direct // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2008. – № 61 (4). – P. 214-219.
198. Pfyffer, G. E. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system / G. E. Pfyffer, F. Palicova, S. Ruesch-Gerdes. – Text : direct // Journal of Clinical Microbiology. – 2002. – Vol. 40. – P. 1670-1674.
199. Prevalence and species spectrum of both pulmonary and extrapulmonary nontuberculous mycobacteria isolates at a tertiary care center / J. Umrao, D. Singh, A. Zia, S. Saxena, S. Sarsaiya, S. Singh, J. Khatoon, T. N. Dhole. – Text : direct // International Journal of Mycobacteriology. – 2016. – Vol. 5. – P. 288-293.
200. Prevalence of Beijing and Haarlem genotypes among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Iran: Systematic review and meta-analysis / S. Tarashia, A. Fatehab, F. R. Jamnaniab, S. D. Siadatab, F. Vaziriab. – Text : direct // Tuberculosis. – 2017. – Vol. 107. – P. 31-37.

201. Prevots, D. R. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review / D. R. Prevots, T. K Marras. – Text : direct // Clinics in chest medicine. – 2015. – Vol. 36 (1). – P. 13-34.
202. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium complex*, to species rank as *Mycobacterium chimaera sp. nov* / E. Tortoli, L. Rindi, M. J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, R. M. Kroppenstedt, N. Lari, R. Mattei, A. Mariottini, G. Mazzearelli, M. I. Murcia, A. Nanetti, P. Piccoli, C. Scarparo. – Text : direct // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2004. – Vol. 54. – P. 1277-1285.
203. Pulmonary disease caused by non-tuberculous mycobacteria / N. Wassilew, H. Hoffmann, C. Andrejak, C. Lange. – Text : direct // Respiration. – 2016. – Vol. 91, № 5. – P. 386-402.
204. Pulmonary infection and colonization with nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000–2012 / J. Y. Chien, C. C. Lai, G. W. Sheng, C. J. Yu, P. R. Hsueh. – Text : direct // Emerging Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 20(8). – P. 1382-1385.
205. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998-2010 / T. K. Marras, D. Mendelson, A. Marchand-Austin, K. May, F. B. Jamieson. – Text : direct // Emerging Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 19. – P.1889-1891.
206. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology / D. Helb, M. Jones, E. Story, C. Boehme, E. Wallace, K. Ho, J. Kop, M. R. Owens, R. Rodgers, P. Banada, H. Safi, R. Blakemore, N. T. Lan, E. C. Jones-López, M. Levi, M. Burday, I. Ayakaka, R. D. Mugerwa, B. McMillan, E. Winn-Deen, L. Christel, P. Dailey, M. D. Perkins, D. H. Persing, D. Alland. – Text : direct // Journal of Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 48 (1). – P. 229-237.
207. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using genotype MTBDRsl assay: a meta-analysis. / Y. Feng, S. Liu, Q. Wang, L. Wang, S. Tang, J. Wang, W. Lu. – Text : direct // PLoS One. – 2013. – № 8(2). – P. 55292.

208. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance / C. Boehme, P. Nabeta, D. Hillemann, M. P. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore, R. Rustomjee, A. Milovic, M. Jones, S. M. O'Brien, D. H. Persing, S. Ruesch-Gerdes, E. Gotuzzo, C Rodrigues, D. Alland, M. D. Perkins. – Text : direct // The New England Journal of Medicine. – 2010. – Vol. 363 (11). – P. 1005-1015. – ISSN 0028-4793.
209. Salman, H. S. Guidelines for second-line drug susceptibility testing in MGIT based on published studies. Critical concentrations and procedures / H. S. Salman. – Text : direct // Recommendations for testing the sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to second-line anti-tuberculosis drugs using MGIT, based on published research results. Critical concentrations and procedures. – 2014. – P. 28.
210. Siddiqi, S. H. MGIT procedure manual for BACTEC MGIT 960TB system / S. H. Siddiqi, S. Rusch-Gerdes. – Text : direct // Руководство по работе с системой BACTEC MGIT 960. – 2006. – P 89.
211. Significant difference in drug susceptibility distribution between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* / A. Renvoisé, C. Bernard, N. Veziris, E. Galati, V. Jarlier, J. Robert. – Text : direct // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 52. – P. 4439-4440.
212. SITVITWEB-a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. – Text: electronic. – URL : <http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/> (дата обращения: 21.01.2021).
213. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. / K. R. Steingart, V. Ng, M. Henry, P. C. Hopewell, A. Ramsay, J. Cunningham, R. Urbanczik, M. D. Perkins, M. A. Aziz, M. Pai. – Text : direct // The Lancet Infectious Diseases. – 2006. – Vol. 6. – P. 664-674.
214. TB diagnostic tests: how do we figure out their costs? / H. Sohn, J. Minion, H. Albert, K. Dheda, M. Pai – Text : direct // Expert review of anti-infective therapy. – 2009. – Vol. 7 (6). – P. 723–733.

215. The diagnosis and treatment of tuberculosis / I. Suárez, S. M. Fünfer, S. Kröger, J. Rademacher, G. Fätkenheuer, J. Rybniker. – Text : direct // Deutsches Ärzteblatt International – 2019. – Vol. 116 (43). – P. 729-735.
216. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTMNET collaborative study / W. Hoefsloot, J. van Ingen, C. Andrejak, K. Angeby, R. Bauriaud, P. Bemer, N. Beylis, M. J. Boeree, J. Cacho, V. Chihota, E. Chimara, G. Churchyard, R. Cias, R. Daza, C. L. Daley, P. N. Dekhuijzen, D. Domingo, F. Drobniowski, J. Esteban, M. Fauville-Dufaux, D. B. Folkvardsen, N. Gibbons, E. Gómez-Mampaso, R. Gonzalez, H. Hoffmann, P. R. Hsueh, A. Indra, T. Jagielski, F. Jamieson, M. Jankovic, E. Jong, J. Keane, W. J. Koh, B. Lange, S. Leao, R. Macedo, T. Mannsåker, T.K. Marras, J. Maugein, H. J. Milburn, T. Mlinkó, N. Morcillo, K. Morimoto, D. Papaventsis, E. Palenque, M. Paez-Peña, C. Piersimoni, M. Polanová, N. Rastogi, E. Richter, M. J. Ruiz-Serrano, A. Silva, M. P. da Silva, H. Simsek, D. van Soolingen, N. Szabó, R. Thomson, T. Tórtola Fernandez, E. Tortoli, S. E. Totten, G. Tyrrell, T. Vasankari, M. Villar, R. Walkiewicz, K. L. Winthrop, D. Wagner. – Text : direct // The European Respiratory Journal. – 2013. – Vol. 42(6). – P. 1604-1613.
217. Tomioka, H. In vitro susceptibilities of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* to various drugs / H. Tomioka, K. Sato, H. Saito. – Text : direct // Kekkaku. – 1991. – Vol. 66. – P. 489-492.
218. Trends in testing for *Mycobacterium tuberculosis complex* from US public health laboratories, 2009-2013 / F. Tyrrell, C. Stafford, M. Yakrus, M. Youngblood, A. Hill, S. Johnston. – Text : direct // Public Health Reports. – 2017. – Vol. 132(1). – P. 56-64.
219. Use of liquid TB culture and drug susceptibility testing (DST) in low and medium income settings. Summary of the report of the expert group meeting on the use of liquid culture media. – Text : electronic // Geneva : World Health Organization, 2007. – URL: [[www.who.int/entity/tb/dots/laboratory](http://www.who.int/entity/tb/dots/laboratory)] (дата обращения 15.11.2021).



220. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis complex* isolates / D. Hillemann, M. Weizeneegger, T. Kubica, E. Richter, S. Niemann. – Text : direct // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Vol. 43. – P. 3699-3703.
221. World Health Organization: Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis. Geneva, October 2020. – Text: electronic // WHO: [сайт]. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/> (дата обращения: 15.11.2021).
222. Yoon, H. J. Nontuberculosis mycobacterial infections at a specialized tuberculosis treatment centre in the Republic of Korea / H. J. Yoon, H. Y. Choi, M. Ki. – Text : direct // BMC Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 17. – P. 432.