

Панов Григорий Валентинович

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ
Mycobacterium tuberculosis, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С СОЧЕТАННОЙ
ПАТОЛОГИЕЙ (ТУБЕРКУЛЕЗ / ВИЧ)

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Черноусова Лариса Николаевна

Официальные оппоненты:

Шагинян Игорь Андроникович – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией

Краснова Мария Александровна – кандидат медицинских наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», отдел проблем диагностики туберкулеза, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 года в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Актуальность изучения биологических свойств и эпидемиологической значимости *M.tuberculosis* при сочетанной инфекции ВИЧ и туберкулез обусловлена тем, что в XXI веке туберкулез и ВИЧ-инфекция являются распространенными социально-зависимыми инфекционными заболеваниями, тесно связанными между собой эпидемиологически (Бабаева И.Ю. и др., 2010). Распространению туберкулёза у больных ВИЧ-инфекцией способствуют снижение иммунологической резистентности, высокая инфицированность населения микобактериями туберкулёзного комплекса и идентичность групп риска по обеим инфекциям (больные наркоманией; лица, ведущие асоциальный образ жизни; люди страдающие алкоголизмом и др.) (Коломиец В.М. и др., 2009; Бабаева И.Ю. и др., 2010).

На фоне снижения естественной резистентности к туберкулезу, обусловленной иммунодефицитом при ВИЧ-инфекции в стадии СПИД, туберкулез чаще протекает в виде острой и преимущественно генерализованной формы (Фролова О.П., 2002; Murray J. et al., 2005; Асанов Б.М. и др., 2009; Кожушко М.Ю., Евстигнеев И.В., 2010). Умирают от туберкулёза 40-60% больных ВИЧ-инфекцией (Бабаева И.Ю. и др., 2010).

У Свердловской области одно из ведущих мест по распространенности как туберкулеза, так и ВИЧ-инфекции. Регион занимает второе место в Уральском федеральном округе (УФО) по пораженности постоянного населения туберкулезом и 76-е ранговое место из 85 субъектов РФ. Распространенность туберкулеза в Свердловской области в 2014 году составила 218,0 на 100 000 населения (в РФ – 137,3 на 100 000 населения). По данным *Федерального центра СПИД* Свердловская область в 2014 г. занимала 2-ое место среди наиболее пораженных ВИЧ субъектов РФ – 1391,1 на 100 тыс. населения (в целом по РФ – 494,6 на 100 тыс. населения). Свердловская область лидирует среди регионов РФ по абсолютному количеству больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ: из 25578 больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией, которые на окончание 2014 года состояли на противотуберкулезном учете в РФ, 2702 проживают в Свердловской области (всего по УФО – 5112 больных). Заболеваемость туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, в Свердловской области возросла за период с 2013 до 2014 г. на 15%: с 20,1 на 100 000 населения в 2013 году до 23,1 на 100 000 населения в 2014 году (Подгаева В.А., 2014; Нечаева О.Б., 2015).

До сих пор нет единого мнения о путях развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных: реактивация из очагов ранее перенесенного туберкулеза или суперинфицирование (Daley C.L. et al., 1992; Б.Р. Блум, 2002). Не уточнено влияние ВИЧ-инфекции на бактериовыделение и эпидемическую опасность пациентов (Загдын З.М. и др., 2010; Зимина, В.Н. и др., 2011). Также нет единого мнения по поводу частоты формирования лекарственной устойчивости у *M.tuberculosis*, выделяемых от больных с ко-инфекцией (Мишин В.Ю., Карачунский М., 2003; Руководство ВОЗ WHO/НТМ/ТВ/2006; Асанов Б.М. и др., 2009; Зайцева Е.В. и др., 2010). Практически отсутствует информация о принадлежности микобактерий туберкулеза, выделенных от больных указанной категории, к генетическим группам.

От комплексного решения этих вопросов во многом будет зависеть тактика ведения больных с ко-инфекцией ВИЧ/туберкулез, т.к. в настоящее время, вследствие противоречивой информации о биологических особенностях *M.tuberculosis*, выделенных от этой группы больных, ряд авторов склоняется к мнению, что ведение данных пациентов должно осуществляться в соответствии с общими принципами лечения больных туберкулезом, без выделения их в отдельную категорию. Другие утверждают, что повышенная восприимчивость к инфекциям, на фоне ослабленного иммунитета, определяет высокий риск нозокомиального распространения *M.tuberculosis* и необходимость изоляции пациентов (домашние условия; боксированные палаты специализированных отделений) (Daley C.L. et al., 1992; Руководство ВОЗ WHO/НТМ/ТВ/2006; Лисневич Н.Н., 2009). Необходимость решения этих и ряда других вопросов определяют актуальность данной работы.

Степень разработанности темы исследования

Известно, что на степень эпидемиологической опасности различных категорий больных влияет их способность передавать возбудителя в популяции. Это зависит как от особенностей течения процесса, находящих свое отражение в массивности бактериовыделения, так и от свойств возбудителя. К таким свойствам часто относят скорость роста *M.tuberculosis* в культуре. Также важно знать генотип возбудителя, т.к. для некоторых генотипов описаны специфические биологические свойства, повышающие их трансмиссивность и дающие им преимущество для выживания в макроорганизме. Кроме того, степень опасности возбудителя обусловлена его лекарственной чувствительностью и считается тем выше, чем больше препаратов включено в спектр его резистентности.

В мире и в РФ широко проводятся исследования, направленные на изучение лекарственной устойчивости и генотипических вариантов возбудителя туберкулеза. Описаны основные штаммовые линии и начато изучение биологических особенностей входящих в них штаммов (Нарвская О.В., 2005; Василенко Н.В. и др., 2006; Андреевская С.Н., 2008; Мокроусов И.В., 2009; Воронкова, О.В. и др. 2011; Дымова М.А., 2011; Вязовая А.А. и др., 2012; Морозова Т.И. и др., 2014; Умпелева Т.В. , 2014; Mokrousov I., 2015). Однако эти методы редко применяются конкретно для характеристики штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с положительным ВИЧ-статусом. Есть работы, описывающие популяцию *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией, изолированно от основной циркулирующей в регионе популяции *M.tuberculosis* (Хазова Е.Ю., Иванова Н.А., 2014). Однако данный подход не дает ответа на вопрос, является ли такое распределение лекарственной устойчивости и генотипов характерным именно для *M.tuberculosis*, выделенных от больных с ВИЧ-инфекцией, или является особенностью региональной популяции *M.tuberculosis*. Поэтому основной интерес представляли работы, сравнивающие штаммы *M.tuberculosis*, выделенные от больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ, и ВИЧ-отрицательных больных. Таких публикаций мало и результаты, полученные в них, не всегда однозначно характеризуют возбудителя. Так, в работе, описывающей лекарственную устойчивость *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ, в пенитенциарных учреждениях Санкт-Петербурга не было выявлено прямой взаимосвязи между ВИЧ-статусом и встречаемостью лекарственной устойчивости

(частота множественной лекарственной устойчивости у штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-позитивных больных составила 40,6%, ВИЧ-негативных - 46,6%) (Владимиров К.Б. и др., 2014). Аналогичные результаты были получены в работе P.J. Easterbrook et al, 2004. В других работах, напротив, были выявлены ассоциации между ВИЧ-статусом больного и наличием множественной и/или широкой лекарственной устойчивости у *M.tuberculosis* (Gandhi N.R. et al., 2006; Parolina L., Morozova T., 2009; Sotgiu G. et al., 2009; Andrews J.R. et al., 2010).

При исследовании молекулярно-эпидемиологических особенностей штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией, разными группами исследователей были получены противоположные результаты: в одних работах не показано различий в распространении конкретных генотипических групп *M.tuberculosis* среди больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией, по сравнению с общей популяцией больных туберкулезом (Easterbrook P.J. et al., 2004; Chernyaeva E. et al., 2012), в других работах были выявлены ассоциации с определенным генотипом *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных (Sheen P. et al., 2013).

Жизнеспособность и массивность роста *M.tuberculosis* при ко-инфекции ВИЧ практически не изучена. Существует только одна работа, посвященная изучению этого параметра, в которой показано, что у ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом, по сравнению с ВИЧ-негативными, выделяются *M.tuberculosis* с большей жизнеспособностью (Корецкая Н. М., Большакова И.А., 2012).

Таким образом, несмотря на широкое распространение сочетанного заболевания туберкулез/ВИЧ, штаммы *M.tuberculosis* от этой категории пациентов до сих пор остаются мало охарактеризованными.

Цель работы: характеристика биологических свойств и оценка эпидемиологической значимости возбудителя туберкулеза при сочетанной патологии ВИЧ и туберкулез на поздних стадиях заболевания.

Задачи исследования:

1. Оценить жизнеспособность *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной инфекцией ВИЧ и туберкулез, по скорости и массивности роста.
2. Определить фенотипическую устойчивость к противотуберкулезным препаратам *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной инфекцией ВИЧ и туберкулез.
3. Описать спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к основным противотуберкулезным препаратам 1 и 2 ряда, у *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной инфекцией ВИЧ и туберкулез.
4. Провести генотипирование штаммов *M.tuberculosis* методом сполитотипирования и оценить кластерный состав *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной инфекцией ВИЧ и туберкулез.

Научная новизна исследования

Получены новые данные о биологических особенностях микобактерий, выделенных на поздних стадиях от больных с сочетанной инфекцией ВИЧ и туберкулез, касающиеся их жизнеспособности, структуры лекарственной чувствительности и степени кластеризации.

Показано, что у штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной патологией ВИЧ/туберкулез, достоверно чаще встречалась

множественная лекарственная устойчивость, подтвержденная культуральными и молекулярно-генетическими методами исследования.

Анализ лекарственной резистентности штаммов *M.tuberculosis* показал, что фенотипическая устойчивость всегда сопровождалась наличием мутаций в целевых генах. Выявлены специфические мутации в целевых генах устойчивости к рифампицину и изониазиду, не приводящие к развитию фенотипической устойчивости к этим препаратам.

Впервые дана молекулярно-эпидемиологическая характеристика штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в г. Екатеринбурге и Свердловской области, и установлено, что исследуемая популяция содержала основные характерные для РФ штаммовые линии: Beijing, H, LAM и T, но штаммы линии Beijing встречались достоверно чаще (74,68% против 62,00%, $p < 0,05$), а штаммы линии T1 - достоверно реже (3,16% против 14,67%, $p < 0,01$), чем в группе штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-негативных больных туберкулезом.

Штаммы *M.tuberculosis*, выделенные от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ, отличается большая степень кластеризации, что подтверждает более интенсивную передачу возбудителя в этой группе и свидетельствует в пользу теории развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации.

Описана специфическая эпидемиологическая особенность региональных штаммов *M.tuberculosis* и выявлено преобладание штаммов, типичных для Центральной и Северной Азии, при этом штаммы, характерные для Европейского региона, встречались реже.

Показано, что штаммы *M.tuberculosis*, относящиеся к штаммовым линиям T5_RUS и H4-Ural, эндемичной для уральского региона, характеризовались достаточно высоким уровнем трансмиссивности, штаммы остальных малых кластеров – низким уровнем трансмиссивности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные о жизнеспособности, структуре лекарственной чувствительности и молекулярно-эпидемиологических особенностях штаммов *M.tuberculosis* расширяют представление о биологических свойствах и генетической структуре *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией.

Учитывая, что больные туберкулезом в сочетании с ВИЧ (в стадии СПИД) представляют собой эпидемически значимую группу, необходима разработка для таких больных специальных мероприятий, направленных на предупреждение распространения особо опасных штаммов *M.tuberculosis*.

Полученные данные о неоднозначном влиянии мутаций в целевых генах на развитие фенотипической резистентности могут служить основой для изучения эволюции *M.tuberculosis*.

Сполигопрофили 308 штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных из Свердловской области Уральского региона, включены в международную базу данных SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe).

Данные генотипирования *M.tuberculosis* могут быть использованы для создания карты циркуляции лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis* на территории Российской Федерации.

Создана региональная рабочая коллекция штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, характеризующаяся различными профилями резистентности и принадлежностью к разным сполиготипам.

Материал настоящего исследования используется в цикле лекций «Диагностика туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией» и «Эпидемиология туберкулеза» на кафедре инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" (акт внедрения от 27.04.2017г.); в учебном процессе преподавания раздела «Частная микробиология» студентам 2-го курса лечебно-профилактического, педиатрического и медико-профилактического факультетов на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава Российской Федерации (акт внедрения от 11.05.2017г.); в цикле лекций, посвященных туберкулезу с множественной лекарственной устойчивостью и ко-инфекцией вируса иммунодефицита человека, в отделении телемедицины и постдипломного образования научно-организационного отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (акт внедрения от 17.05.2017г.).

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы спланирована согласно поставленной цели исследования. Предметом исследования явились биологические свойства штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией. Научная литература, посвященная проблеме туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией, лекарственной резистентности и молекулярной эпидемиологии *M.tuberculosis*, была проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические и статистические методы. Результаты, полученные представленными методами, были соотнесены между собой. Сопоставляли результаты определения фенотипической и генотипической ЛЧ, сполиготип штамма с характером ЛУ. На основании сравнения делали выводы об особенностях штаммов МБТ, выделенных от больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ-инфекцией в стадии СПИД.

Штаммы *M.tuberculosis*

Объект исследования – 331 штамм *M.tuberculosis*, выделенный от впервые выявленных ранее не леченных больных туберкулезом (n=331). Все пациенты проходили обследование с декабря 2012 г. по ноябрь 2013 г. в диспансерах ГБУЗ Свердловской области "Противотуберкулезный диспансер" г. Екатеринбурга. 165 больных туберкулезом (ТБ), сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД (источник штаммов группы I), были направлены в ГБУЗ Свердловской области "Противотуберкулезный диспансер" для уточнения диагноза после обследования в ГБУЗ Свердловской области "Свердловский областной центр профилактики и борьбы со СПИД" г. Екатеринбурга. 166 ВИЧ-отрицательных больных ТБ (источник штаммов группы II) отбирались параллельно из числа пациентов, обратившихся за помощью в диспансеры ГБУЗ Свердловской области "Противотуберкулезный диспансер" г. Екатеринбурга.

Микробиологические методы исследования

Получение культур *M.tuberculosis*

Для получения культур МБТ из диагностического материала использовали метод посева на ППС Левенштейна-Йенсена и «Новая», который осуществляли согласно Приказа № 109 МЗ РФ от 21.03.2003. Просмотр культур для определения скорости роста проводили ежедневно. Интенсивность роста оценивали по 3-х балльной системе: (1+) – 1 - 20 КОЕ - "скудное" бактериовыделение; (2+) – 21 - 100 КОЕ - "умеренное" бактериовыделение; (3+) – > 100 КОЕ - "обильное" бактериовыделение.

Определение жизнеспособности культур МБТ, выделенных из диагностического материала до начала лечения

Жизнеспособность МБТ оценивалась по скорости роста и массивности бактериовыделения по общепринятой методике (Методы математического анализа эпидемиологической ситуации по туберкулезу, 1998). При массивности роста МБТ менее 20 колоний (скудное бактериовыделение) и скорости роста более 30 суток жизнеспособность считалась низкой. При массивности роста более 100 колоний (обильное бактериовыделение) и скорости роста менее 30 суток жизнеспособность оценивалась как высокая.

Определение лекарственной чувствительности на плотных питательных средах методом абсолютных концентраций

После получения культуры МБТ из нее готовили суспензию, содержащую 500×10^6 КОЕ в 1 мл (оптический стандарт мутности № 5), которую разводили в 10 раз стерильным физиологическим раствором и инокулировали на среды с лекарственными препаратами (чистые субстанции Sigma-Aldrich, США) и контрольную пробирку без препаратов. Результат учитывали на 21 день после посева. Культуру считали чувствительной к данной концентрации препарата, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 колоний при обильном росте в контрольной пробирке, устойчивой – более 20 колоний.

Молекулярно-генетические методы исследования

Определение спектра мутаций в генах МБТ, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам

Выделение ДНК из культур для исследования проводили с помощью набора для выделения «М-Сорб-Туб-Автомат» (Синтол, Россия) по инструкции изготовителя набора с использованием автоматизированных станций для выделения нуклеиновых кислот «Freedom EVO 100», (ТЕСАН, Швейцария) и Abbott m2000sp (Abbott, США). Кратко, процесс выделения состоял из следующих этапов: лизис клеток и высвобождение ДНК, осаждение ДНК из раствора, сорбция ДНК на магнитном носителе, промывка ДНК от других компонентов лизированного материала и элюция ДНК с магнитного сорбента в раствор.

Первичная идентификация микобактерий (наличие в геноме специфического участка ДНК – IS6110) и накопление продуктов амплификации осуществлялось с использованием тест-системы «АМПЛИТУБ-РВ» (Синтол, Россия), согласно инструкции изготовителя. Выделенную ДНК после идентификации использовали для определения генотипической устойчивости МБТ к рифампицину (ген *rpoB*), изониазиду (гены *katG*, *inhA* и *ahpC*) и фторхинолонам (ген *gyrA*) с использованием

наборов "ТБ-БИОЧИП-1" и "ТБ-БИОЧИП-2" (БИОЧИП-ИМБ, Россия), согласно инструкции производителя.

Сполиготипирование

Сполиготипирование проводили с набором реагентов для сполиготипирования (Isogen Bioscience BV, Нидерланды) в соответствии инструкцией производителя. Результаты сполиготипирования оценивали визуально по наличию или отсутствию каждого из 43-х спейсоров.

Коэффициент активности трансмиссии МБТ оценивали по формуле (Small P. M. et al., 1994):

$$КАТ = \frac{[\text{число кластеризованных штаммов}] - [\text{число кластеров}]}{\text{общее число штаммов}} \times 100\%$$

Статистические методы исследования и программное обеспечение

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного пакета BioStat v5 (Analyst Soft, США). Для оценки значимых различий между группами использовали критерий хи-квадрат (χ^2) для таблиц сопряженности 2x2; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для филогенетического анализа штаммов *M.tuberculosis* применяли метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) и метод построения минимального охватывающего дерева с привлечением интернет-ресурса www.migu-vntrplus.org.

Личный вклад автора в получении результатов

Личное участие автора в получении научных результатов, изложенных в диссертации, осуществлялось на всех этапах работы и выразилось в анализе и обобщении литературных данных, разработке дизайна исследования, сборе и подготовке диагностического материала, в выполнении всего объема бактериологических и молекулярно-генетических исследований. Автором лично были проанализированы полученные результаты, сформулированы выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Жизнеспособность штаммов *M.tuberculosis*, определенная по массивности и скорости роста, не отличается у штаммов, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД, и у ВИЧ-негативных больных туберкулезом. В обеих группах преобладают *M.tuberculosis* со средней и высокой жизнеспособностью.

2. Штаммы *M.tuberculosis*, выделенные от больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ в стадии СПИД, характеризуются высокой частотой множественной лекарственной устойчивости и низкой частотой лекарственной чувствительности, по сравнению со штаммами, выделенными от ВИЧ-негативных больных туберкулезом, вне зависимости от филогенетической линии штаммов. Однако спектры мутаций и профили фенотипической резистентности устойчивых штаммов *M.tuberculosis* у штаммов обеих групп не отличаются. Преобладают мутации *rpoB531 Ser→Leu* и *katG315 Ser→Thr*.

3. Штаммы *M.tuberculosis*, выделенные от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД, более кластеризованы, чаще представлены генотипом Beijing и реже содержат штаммы-синглетоны, в отличие от группы штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-негативных больных туберкулезом.

Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности результатов работы свидетельствует достаточный объем исследованной выборки штаммов МБТ: 165 штаммов, выделенных от ранее не леченых пациентов с сочетанной ВИЧ/ТБ-инфекцией, и 166 штаммов, выделенных от ВИЧ отрицательных больных туберкулезом. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, логически вытекают из результатов проведенных комплексных микробиологических исследований, включающих как традиционные бактериологические, так и молекулярно-генетические тесты. Все исследования проведены с использованием современного сертифицированного и поверенного оборудования, с использованием международных протоколов генотипирования. Полученные данные обрабатывались с использованием общепринятых статистических подходов с использованием программного пакета BioStat v5 (Analyst Soft) и представлены в виде графиков и таблиц.

Диссертация апробирована на заседании отделов микробиологии, иммунологии, патоанатомии, электронной микроскопии и биохимии, отделов легочной хирургии и фтизиатрии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (протокол № 1 от 15.09.2016 г.).

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на Областных он-лайн совещаниях специалистов лабораторной службы противотуберкулезных учреждений Свердловской области по итогам деятельности в 2013 и 2014 годах (Екатеринбург, 2014, 2015); цикле усовершенствования «Избранные вопросы фтизиатрии» (Екатеринбург, 2014); Совещании для врачей по использованию ускоренных методов этиологической диагностики туберкулеза в ГБУЗ СО "ПТД" (Екатеринбург, 2015); Производственном совещании по результатам организации диспансерной работы фтизиатрических подразделений за 11 месяцев 2015 года (Екатеринбург, 2015); Съезде фтизиатров России «Актуальные вопросы противотуберкулезной помощи в Российской Федерации» - X съезд Российского общества фтизиатров (Воронеж, 2015); Заседании секции микробиологии и иммунологии туберкулеза Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2015, 2016); Семинаре «Ускоренные методы этиологической диагностики туберкулеза» (Екатеринбург, 2016); Конференции сотрудников ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (Москва, 2016).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, 3 - в других изданиях, 4 - в сборниках материалов конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 140 страницах печатного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, четырех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки, списка сокращений и списка использованных литературных источников. Диссертация иллюстрирована 31 таблицей и 11 рисунками. Список литературы содержит 201 источник, в том числе 65 – отечественных и 136 - зарубежных публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика жизнеспособности *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом (по скорости и массивности роста)

При анализе роста МБТ при посеве диагностического материала на ППС не было получено достоверных отличий между группами по скорости (рост в срок от 3 до 8 недель – 91,52% штаммов группы I и 93,98% штаммов группы II) и массивности роста культуры (скудное бактериовыделение – 49,70% и 51,81%, соответственно по группам, обильное бактериовыделение – 31,52% и 35,54%, соответственно по группам), а также по оцененной на основе этих параметров жизнеспособности штаммов. В обеих группах преобладали МБТ со средним и высоким уровнем жизнеспособности (98/165, 59,39% – группа I и 103/166, 62,05% – группа II).

Особенности фенотипической лекарственной чувствительности *M.tuberculosis* у пациентов с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ

При оценке первичной лекарственной чувствительности МБТ было показано, что в группе I, по сравнению с группой II, достоверно реже встречались чувствительные штаммы (52/165 (32%) против 84/166 (51%), $p<0,01$). Штаммы МБТ группы I, по сравнению с МБТ группы II, достоверно чаще были устойчивы к рифампицину (51,52% против 32,53%, $p<0,01$), изониазиду (61,82 % против 45,78%, $p<0,01$), стрептомицину (46,67 % против 34,34%, $p<0,05$) и этамбутолу (15,15 % против 7,23%, $p<0,05$) (таблица 1).

Таблица 1 – Фенотипическая устойчивость МБТ к основным ПТП 1 и 2 ряда

Препарат	Число устойчивых штаммов из				P (I-II)
	Группы I (ТБ+ВИЧ) n=165		Группы II (ТБ ВИЧ-отр.) n=166		
	абс.	%	абс.	%	
рифампицин	85	51,52	54	32,53	0,001
изониазид	102	61,82	76	45,78	0,005
стрептомицин	77	46,67	57	34,34	0,03
этамбутол	25	15,15	12	7,23	0,035
офлоксацин	12	7,27	13	7,83	0,689
канамицин	14	8,48	11	6,63	0,666
протионамид	нет		нет		-

По спектрам резистентности к ПТП достоверных отличий между группами не выявлено (таблица 2).

При анализе характера лекарственной чувствительности было показано, что число штаммов с МЛУ в группе I составило 83/165 (50,30%), что было достоверно выше ($p<0,01$), чем в группе II (52/166, 31,33%) (таблица 3). Достоверных отличий по структуре МЛУ между штаммами МБТ двух групп выявлено не было (таблица 4).

Таблица 2 – Спектры фенотипической резистентности штаммов МБТ

Число препаратов	Спектр ЛУ	Число устойчивых штаммов				P (I-II)
		Группа I (ТБ+ВИЧ) n=113		Группа II (ТБ ВИЧ-отр.) n=82		
		абс.	%	абс.	%	
1	H	6	5,31	9	10,98	>0,05
	R	2	1,77	1	1,22	>0,05
	S	8	7,08	4	4,88	>0,05
	Ofx	1	0,88	0	0,00	>0,05
2	HS	9	7,96	13	15,85	>0,05
	HKm	0	0,00	1	1,22	>0,05
	HR*	22	19,47	13	15,85	>0,05
3	HSE	2	1,77	1	1,22	>0,05
	HEKм	1	0,88	0	0,00	>0,05
	HRS*	28	24,78	16	19,51	>0,05
	HRKм*	0	0,00	1	1,22	>0,05
	HROfx*	3	2,65	0	0,00	>0,05
4	HEOfxKм	1	0,88	0	0,00	>0,05
	HRSE*	13	11,50	5	6,10	>0,05
	HRSKм*	5	4,42	3	3,66	>0,05
	HRSOfx*	3	2,65	8	9,76	>0,05
5	RSEOfxKм	0	0,00	1	1,22	>0,05
	HRSEKм*	5	4,42	2	2,44	>0,05
	HRSEOfx*	2	1,77	1	1,22	>0,05
	HRSOfxKм**	1	0,88	1	1,22	>0,05
6	HRSEOfxKм**	1	0,88	2	2,44	>0,05

Примечание: * спектр резистентности соответствует МЛУ

** спектр резистентности соответствует ШЛУ

Таблица 3 – Характер фенотипической лекарственной чувствительности МБТ

Характер лекарственной чувствительности	Число штаммов				P (I-II)
	Группа I (ТБ+ВИЧ) n=165		Группа II (ТБ ВИЧ-отр.) n=166		
	абс.	%	абс.	%	
Чувствительные	52	31,52	84	50,60	0,000
Монорезистентные	17	10,30	14	8,43	>0,05
Полирезистентные	13	7,88	16	9,64	>0,05
МЛУ	83	50,30	52	31,33	0,001
Всего	165	100	166	100	

Таблица 4 – Структура фенотипической М/ШЛУ у МБТ двух изучаемых групп

МЛУ	Группа I (ТБ+ВИЧ)		Группа II (ТБ ВИЧ-отр.)		P (I-II)
	абс.	%	абс.	%	
только к HR или в комбинации с ПТП, кроме Kм и Ofx	63	75,90	34	65,38	>0,05
в комбинации с Kм (пре-ШЛУ (Kм))	10	12,05	6	11,54	>0,05
в комбинации с Ofx (пре-ШЛУ (Ofx))	8	9,64	9	17,31	>0,05
в комбинации с Kм и Ofx (ШЛУ)	2	2,41	3	5,77	>0,05
Всего	83	100	52	100	>0,05

Таким образом, при анализе фенотипической лекарственной резистентности методом абсолютных концентраций на ППС было показано, что штаммы, выделенные от ВИЧ-инфицированных больных ТБ, достоверно реже были чувствительны к ПТП, но достоверно чаще имели МЛУ, по сравнению со штаммами МБТ, выделенными от ВИЧ-негативных больных ТБ. При этом спектр ЛУ и структура МЛУ достоверно не отличались между группами.

Молекулярно-генетические особенности устойчивости к противотуберкулезным препаратам *M.tuberculosis*, выделенных от больных с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ

Результаты определения генотипической устойчивости и спектра мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам у МБТ двух групп представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Число штаммов МБТ с мутациями в генах, детерминирующих устойчивость к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам

Генотипическая устойчивость	Число штаммов				P (I-II)
	Группа I (ТБ+ВИЧ) n=165		Группа II (ТБ ВИЧ-отр) n=166		
	абс.	%	абс.	%	
К рифампицину (мутантный <i>rpoB</i>)	87	52,73	59	35,54	0,002
К изониазиду (мутации хотя бы в одном из трех генов)	106	64,24	80	48,19	0,005
- мутантный <i>katG</i>	102	61,82	75	45,18	0,003
- мутантный <i>inhA</i>	16	9,70	15	9,04	>0,05
- мутантный <i>ahpC</i>	нет		2	1,20	>0,05
К фторхинолонам (мутантный <i>gyrA</i>)	12	7,27	13	7,83	>0,05
МЛУ-генотип	85	51,52	58	34,94	0,003
Пре-ШЛУ-генотип	11	6,67	12	7,23	>0,05

Показано, что в группе I достоверно чаще ($p<0,01$) выявлялись мутации, ответственные за устойчивость к рифампицину (87/165, 52,73% против 59/166, 35,54%) и мутации, ответственные за устойчивость к изониазиду (106/165, 64,24% против 80/166, 48,19%).

В спектре мутаций в различных кодонах гена *rpoB* достоверных отличий по группам выявлено не было: чаще всего выявлялись мутации в 531 кодоне гена *rpoB* (73/87, 83,91% – группа I, 47/59, 79,66% – группа II), причем, как правило, в белковом продукте гена мутация приводила к замене серина на лейцин. Также не было показано достоверных отличий при анализе спектра мутаций среди штаммов с генотипической устойчивостью к изониазиду: частота встречаемости мутаций в 315 кодоне *katG*, в том числе в виде сочетанных мутаций, в группе I составила 102/106, 96,22%, а в группе II – 75/80, 93,75%.

Мутации в гене *gyrA*, приводящие к возникновению устойчивости к фторхинолонам, были выявлены в 12/165, 7,27% случаях в группе I и в 13/166, 7,83% – в группе II. Чаще всего регистрировались мутации в 94 кодоне (9/12 и 9/13, соответственно по группам).

Таблица 6 – Спектр мутаций в генах, определяющих устойчивость МБТ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам

Препарат	Мутации	Ген/кодон или № нуклеотидной позиции	Замена	Число штаммов			
				Группа I (ТБ+ВИЧ)		Группа II (ТБ ВИЧ-отр.)	
				абс.	%	абс.	%
Рифампицин	Единичные	<i>rpoB</i> 511	Leu→Pro	-	-	2	3,39
		<i>rpoB</i> 512	Ser→Thr	-	-	1	1,69
		<i>rpoB</i> 516	Asp→Tyr	3	3,45	1	1,69
			Asp→Val	1	1,15	1	1,69
		<i>rpoB</i> 526	His→Arg	1	1,15	-	-
			His→Asn	2	2,30	3	5,08
			His→Asp	1	1,15	-	-
			His→Cys	1	1,15	1	1,69
			His→Leu	1	1,15	-	-
		<i>rpoB</i> 531	His→Tyr	1	1,15	1	1,69
			Ser→Cys	1	1,15	-	-
			Ser→Leu	71	81,61	47	79,66
	<i>rpoB</i> 533	Ser→Trp	1	1,15	-	-	
		Leu→Pro	1	1,15	1	1,69	
	Сочетанные	<i>rpoB</i> 511; 516	Leu→Arg; Asp→Tyr	1	1,15	-	-
		<i>rpoB</i> 516; 526	Asp→Gly; His→Asn	-	-	1	1,69
		<i>rpoB</i> 526; 533	His→Asn; Leu→Pro	1	1,15	-	-
Всего				87	100	59	100
Изониазид	Единичные	<i>katG</i> 315	Ser→Thr(1)	85	80,19	62	77,50
		<i>katG</i> 315	Ser→Thr(2)	4	3,77	-	-
		<i>inhA</i> 15	C→T	4	3,77	4	5,00
		<i>ahpC</i> 9	G→A	-	-	1	1,25
	Сочетанные	<i>katG</i> 315; 335	Ser→Thr(1); Ile→Val	1	0,94	1	1,25
		<i>katG</i> 315; <i>inhA</i> 15	Ser→Thr(1); C→T	11	10,38	9	11,25
		<i>katG</i> 315; <i>inhA</i> 8	Ser→Thr(1); T→G	1	0,94	2	2,50
		<i>katG</i> 315; <i>ahpC</i> 10	Ser→Thr(1); C→T	-	-	1	1,25
Всего				106	100	80	100
Фторхинолоны	Единичные	<i>gyrA</i> 90	Ala→Val	3	-	3	-
		<i>gyrA</i> 91	Ser→Pro	-	-	1	-
		<i>gyrA</i> 94	Asp→Ala	1	-	1	-
			Asp→Gly	6	-	5	-
	<i>gyrA</i> 94	Asp→Tyr	2	-	3	-	
Всего				12	-	13	-

Примечание: Ser→Thr(1) соответствует замене AGC → ACC
Ser→Thr(2) соответствует замене AGC → ACA

Анализ сочетания мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду и рифампицину, показал, что МЛУ-генотип был выявлен у 85/165 (51,52%) штаммов МБТ, выделенных от больных группы I, и у 58/166 (34,94%) штаммов МБТ, выделенных от больных группы II. Отличия между группами по этому параметру были статистически достоверны ($p < 0,01$). Самым частым МЛУ генотипом в обеих группах был *rpoB531 Ser→Leu + katG315 Ser→Thr* (64/85, 75,29% – группа I и 38/58, 65,52% – группа II).

Таким образом, в результате проведения сравнительного анализа спектра мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к ПТП, было показано, что частота генотипической устойчивости к рифампицину и изониазиду у штаммов МБТ группы I достоверно превышала этот показатель у штаммов МБТ группы II. Достоверной разницы в спектре мутаций среди генотипически устойчивых штаммов двух групп выявлено не было.

Генетический полиморфизм штаммов *M.tuberculosis*

Для 308 штаммов МБТ (158 группы I и 150 группы II) было проведено генотипирование по полиморфизму локусов прямых повторов (сполиготипирование). Было показано, что штаммы МБТ группы I, выделенные от больных с ТБ, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД, отличается большая степень кластеризации: в группе I было идентифицировано 28 сполигопрофилей, распределенных по 12 кластерам, в группе II – 40 сполигопрофилей, распределенных по 14 кластерам; КАТ в группе I составил 82,28% против 73,33% в группе II. Полученные результаты могут указывать на более интенсивную передачу штаммов МБТ в этой группе, и скорее свидетельствует в пользу теории развития ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации.

При идентификации полученных сполигопрофилей с помощью международной базы данных SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe) было показано, что исследуемая популяция содержала основные характерные для РФ штаммовые линии: Beijing, H, LAM, T, X.

Чтобы сгруппировать штаммы согласно их филогении, сполигопрофили были проанализированы с использованием метода попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), позволяющего построить дендрограмму, и метода построения минимального охватывающего дерева, позволяющего определить значимые клональные комплексы (КК), включающие наиболее тесно филогенетически связанные штаммы. Оба метода были осуществлены с привлечением интернет-ресурса www.miru-vntrplus.org. Минимальное охватывающее дерево было построено с допущением внутри клонального комплекса различий по двум спейсорам. Информация о КК, выделенных в результате построения минимального охватывающего дерева, была соотнесена с дендрограммой сполигопрофилей исследованных штаммов, построенной с помощью алгоритма UPGMA (рисунок 1).

В результате было показано, что исследуемая популяция МБТ была представлена 7-ю клональными комплексами (КК), расположенными на двух главных ветвях филогенетического дерева. Ветвь 1 включала в себя КК4, состоящий из штаммов группы Beijing. Ветвь 2 была представлена 6-ю клональными комплексами МБТ, среди которых встречались штаммы с минимальным числом делеций в локусе прямых повторов (КК1), являющиеся вариантами линии T, эндемичные для Уральского региона штаммы КК3 и характерный для России клональный комплекс КК2 (варианты T5_RUS).

На основе анализа числа кластеризованных штаммов внутри каждого КК, был определен КАТ для МБТ каждого КК (таблица 7). Как следует из таблицы 7, максимальная активность трансмиссии была характерна для МБТ, принадлежащих к КК4 (Beijing) (КАТ=97,63%). МБТ клональных комплексов 2 (T5_RUS) и 3 (H4-Ural) также характеризовались достаточно высоким уровнем трансмиссии (КАТ = 60,00% и 65,38%, соответственно). Штаммы МБТ, относящиеся к КК1, КК5 и КК6, характеризовались низким уровнем трансмиссии.

Таблица 7 – КАТ штаммов МБТ, относящихся к различным КК

КК	Число кластеризованных штаммов	Число кластеров	Всего штаммов в КК	КАТ (%)
1	13	5	27	29,63
2	14	2	20	60,00
3	19	2	26	65,38
4	209	3	211	97,63
5	4	2	7	28,57
6	5	2	8	37,50

В таблице 8 приведена сводная информация о распределении штаммов МБТ двух групп по основным КК, определенным с учетом построения минимального охватывающего дерева и дендрограммы по алгоритму UPGMA.

Таблица 8 - Распределение штаммов МБТ, выделенных от больных ТБ двух групп по КК

Главная ветвь	КК	Число штаммов					
		Группа I (ТБ+ВИЧ)		Группа II (ТБ ВИЧ отр)		Всего в двух группах	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	4	118	74,68*)	93	62,00*)	211	68,51
	синглетоны	-	-	2	1,33	2	0,65
2	1	5	3,16**)	22	14,67**)	27	8,77
	2	11	6,96	9	6,00	20	6,49
	3	14	8,86	12	8,00	26	8,44
	5	4	2,53	3	2,00	7	2,27
	6	3	1,90	5	3,33	8	2,60
	7	2	1,27	-	-	2	0,65
	синглетоны	1	0,63	4	2,67	5	1,62
Всего		158	100	150	100	308	100

Примечание: *) $p=0,023$

***) $p=0,001$

Как видно из таблицы 8, в группе I достоверно чаще, чем в группе сравнения, встречались штаммы, принадлежащие к КК4 (Beijing) – 118/158 (74,68%) против 93/150 (62,00%), $p<0,05$. Штаммы КК 1 (линия T с минимальным числом делеций в DR-локусе),

напротив, достоверно чаще встречались в группе штаммов МБТ, выделенных от больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом (5/158, 3,16% – группа I и 22/150, 14,67% – группа II, $p < 0,01$). Штаммы – синглтоны, не вошедшие в клональные комплексы, которые, с большой долей вероятности, были выделены от больных, у которых болезнь развилась в результате эндогенной реактивации, чаще встречались в группе II (6 штаммов), чем в группе I (1 штамм).

Определение характера лекарственной чувствительности МБТ разных филогенетических линий показало, что МЛУ, вне зависимости от ВИЧ-статуса пациентов, от которых были выделены штаммы, наблюдалась у МБТ филогенетической ветви 1, которая в основном была представлена штаммами группы Beijing: 56,78% штаммов ветви 1 против 27,50% штаммов ветви 2 в группе I и 44,21% штаммов ветви 1 против 10,91% штаммов ветви 2 в группе II. Напротив, чувствительные штаммы МБТ чаще выявлялись на филогенетической ветви 2, также вне зависимости от анализируемой группы штаммов: 22,88% штаммов ветви 1 против 57,50% штаммов ветви 2 в группе I и 34,74% штаммов ветви 1 против 74,55% штаммов ветви 2 в группе II. Суммарно, среди штаммов МБТ ветви 1 чувствительные варианты встречались достоверно реже (28,17%), чем среди штаммов МБТ ветви 2 (67,37%), $p < 0,01$; варианты с МЛУ – достоверно чаще среди штаммов МБТ ветви 1 (51,17%), чем среди штаммов МБТ ветви 2 (17,89%), $p < 0,01$.

Тем не менее, вне зависимости от принадлежности к филогенетической группе, МЛУ чаще наблюдалась у МБТ, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ: МЛУ обладало 56,78% штаммов филогенетической ветви 1 группы I против 44,21% штаммов филогенетической ветви 1 группы II и 27,50% штаммов филогенетической ветви 2 группы I против 10,91% штаммов филогенетической ветви 2 группы II. Чувствительными же чаще были штаммы МБТ группы II: 22,88% штаммов филогенетической ветви 1 группы I против 34,74% штаммов филогенетической ветви 1 группы II и 57,50% штаммов филогенетической ветви 2 группы I против 74,55% штаммов филогенетической ветви 2 группы II.

При анализе лекарственной чувствительности в зависимости от КК, было показано, что у МБТ КК4 (Beijing) достоверно чаще встречались полирезистентные и МЛУ штаммы (132/211, 62,56%), по сравнению со штаммами, чувствительными ко всем ПТП, и с монорезистентностью (79/211, 37,44%), $p < 0,01$. Все штаммы МБТ, относящиеся к КК1 (варианты T1), были чувствительными или монорезистентными. Среди штаммов МБТ, принадлежащих к КК3 (варианты H4-Ural), КК5 (варианты H1) и КК6 (варианты LAM9), также преобладали чувствительные и монорезистентные штаммы (19/26 (73,08%), 6/7 и 6/8, соответственно). В КК2 (варианты T5_RUS) с равной частотой были представлены как штаммы чувствительные и монорезистентные, так и штаммы полирезистентные и с МЛУ – по 10 штаммов каждой категории.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования был выявлен ряд биологических особенностей, характерных для МБТ, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД. Так, было показано, что массивность бактериовыделения у больных, являющихся источниками исследуемых штаммов МБТ, и скорость роста выделяемых МБТ не отличаются по группам. У больных, являющихся источником МБТ группы I, достоверно чаще, чем в группе II, регистрировались распространенные формы ТБ, но ассоциации между клинической формой ТБ и кластерной принадлежностью МБТ не показано. Число чувствительных штаммов, выявленное культуральными и молекулярно-

генетическими методами, в группе I было достоверно ниже, чем в группе II. Фенотипически МБТ группы I достоверно чаще, чем МБТ группы II, были устойчивы к рифампицину, изониазиду, стрептомицину и этамбутолу. Аналогичные результаты были получены молекулярно-генетическими методами для рифампицина и изониазида. Также в группе I было выявлено достоверно больше штаммов с МЛУ вне зависимости от филогенетической линии, однако различия между группами по спектру мутаций в генах, связанных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам не выявлены. Штаммы МБТ группы I были более кластеризованы, среди них достоверно чаще, чем в группе II, встречались МБТ группы Beijing, характеризующиеся большой долей МЛУ, но достоверно реже встречались МБТ, входящие в группу штаммов, являющихся вариантом T1, как правило, чувствительным к ПТП.

Таким образом, было показано, что МБТ, выделенные от больных ко-инфекцией ТБ/ВИЧ, характеризуются высокой долей множественной лекарственной устойчивости, ассоциированной с преобладающими мутациями в генах *rpoB531 Ser→Leu* и *katG315 Ser→Thr*; высокой частотой встречаемости МБТ генетического кластера Beijing, обладающих повышенной трансмиссивностью. Высокая степень кластеризации штаммов этой группы свидетельствует в пользу теории развития ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации. ВИЧ-инфицированные больные ТБ (в стадии СПИД), представляют собой эпидемически значимую группу, что диктует необходимость разработки специальных мероприятий, направленных на предупреждение распространения особо опасных штаммов МБТ.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что в группе штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией в стадии СПИД (группа I), и в группе штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом (группа II), преобладали *M.tuberculosis* со средним и высоким уровнем жизнеспособности (59,39% – группа I и 62,05% – группа II), достоверных отличий по этому параметру между группами получено не было.

2. Установлено, что в группе I достоверно реже встречались чувствительные к противотуберкулезным препаратам штаммы *M.tuberculosis* (32%), по сравнению с группой II (51%) ($p < 0,01$), но достоверно чаще были представлены штаммы, устойчивые к рифампицину, изониазиду, стрептомицину и этамбутолу. Штаммов с множественной лекарственной устойчивостью в группе I было достоверно больше (50,30%), чем в группе II (31,33%) ($p < 0,01$).

3. Показано, что в группе I достоверно чаще, чем в группе II встречались штаммы *M.tuberculosis* с мутациями в генах, обуславливающих устойчивость к рифампицину и изониазиду, однако, среди генотипически резистентных штаммов, не было выявлено достоверных отличий по спектру мутаций в целевых генах. Штаммы *M.tuberculosis* с генотипом, обуславливающим множественную лекарственную устойчивость, достоверно чаще встречались в группе I. Преобладающим генотипом, обуславливающим множественную лекарственную устойчивость, в обеих группах был *rpoB531 Ser→Leu + katG315 Ser→Thr* (75,29% и 65,52% от числа МЛУ-штаммов, соответственно по группам).

4. Продемонстрирована большая кластеризация штаммов *M.tuberculosis* в группе I, по сравнению со штаммами *M.tuberculosis* группы II. Исследованные штаммы, согласно международной базе данных SITVITWEB, принадлежали к 7 штаммовым линиям: Beijing/Beijing-like, H, T, LAM, MANU, S, X.

5. Выделены 7 клональных комплексов, расположенных на двух главных ветвях филогенетического дерева, разделяющих группу штаммов Beijing (клональный комплекс 4) с другими 6-ю клональными комплексами. В группе I достоверно чаще, чем в группе II, встречались штаммы *M.tuberculosis*, принадлежащие к клональному комплексу 4. Штаммы клонального комплекса 1 (варианты T1) достоверно чаще встречались в группе II. Штаммы других клональных комплексов распределялись по группам с одинаковой частотой.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На фоне высокой распространенности в Свердловской области сочетанной инфекции ВИЧ и туберкулез, что является фактором риска для распространения лекарственно-устойчивого возбудителя туберкулеза, необходим мониторинг развития туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью у этой категории больных.

2. При ранней коррекции химиотерапии по результатам молекулярно-генетических методов важно учитывать спектр мутаций и, в случае выявления мутаций, не всегда приводящих к развитию фенотипической резистентности, подтверждать результат определением лекарственной чувствительности культуральными методами.

3. При выявлении фенотипической чувствительности при наличии мутаций в целевых генах, необходим тщательный контроль лекарственной чувствительности в процессе терапии для своевременного определения возможного развития резистентности.

4. Для осуществления микробиологического мониторинга туберкулеза в регионе необходимо определять спектр фенотипической лекарственной устойчивости, а также проводить генотипические исследования штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, определяя молекулярно-эпидемиологические маркеры и мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Планируется дальнейшее проведение исследований, направленных на изучение биологических особенностей *M.tuberculosis*, выделяемых от больных туберкулезом, сочетанным с ВИЧ-инфекцией. В частности, необходимо продолжить изучение жизнеспособности *M.tuberculosis*, выделяемых от этой категории больных, в зависимости от клинической формы туберкулеза и генотипической характеристики возбудителя.

2. Для выявленных в регионе штаммов *M.tuberculosis* с генотипом, обеспечивающим формирование множественной лекарственной устойчивости без снижения жизнеспособности возбудителя, планируется проведение мониторинга формирования лекарственной резистентности к другим противотуберкулезным препаратам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Панов, Г.В.** Характеристика лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза, выделенных от впервые выявленных ВИЧ/ТБ пациентов Свердловской области / **Г.В. Панов** // Материалы 12-й ежегодной Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом "Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей", 21 марта 2013 г. - Москва, 2013. - С.47-50.
2. **Панов, Г.В.** Первичная резистентность к противотуберкулезным препаратам микобактерий туберкулеза, выделенных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-негативных пациентов / **Г.В. Панов**, С.Н. Скорняков, А.И. Цветков, Л.Н. Черноусова // Фтизиатрия и пульмонология. – 2013. - №2 (7). – С.33.
3. **Панов, Г.В.** Анализ спектра мутаций, определяющих устойчивость микобактерий туберкулеза, от ранее не леченных ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом легких / **Г.В. Панов** // Материалы 13-й ежегодной Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом "Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей", 21 марта 2014 г. - Москва, 2014. - С. 215-218.
4. **Панов, Г.В.** Споллиготипирование *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от ранее не леченных ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом легких / **Г.В. Панов**, Е.Е. Ларионова // Материалы 14-й ежегодной Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом "Новые технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей", 20 марта 2015 г. - Москва, 2015. - С. 166-168.
5. **Панов, Г.В.** Оценка необходимости изоляции больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией с точки зрения опасности микробиологического контакта / **Г.В. Панов**, А.И. Цветков, Л.Н. Черноусова, Е.Е. Ларионова // Фтизиатрия и пульмонология. – 2015. - №2 (10). – С.316-317.
6. **Панов, Г.В.** Мутации в геноме МЛУ штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от ранее не леченных ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом легких в Свердловской области / **Г.В. Панов**, С.Н. Андреевская, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, А.И. Цветков, Л.Н. Черноусова // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, 30 марта – 1 апреля 2015 г., Москва. - Приложение № 1 к журналу «Инфекционные болезни». - 2015. - Т.13. – С.260-261.
7. **Панов, Г.В.** 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 // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2015. – Т.93. - №2. – С.50-53.
8. **Панов, Г.В.** Генетический полиморфизм изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от ранее не леченных больных туберкулезом легких в сочетании с ВИЧ-инфекцией / **Г.В. Панов**, А.И. Цветков, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, Л.Н. Черноусова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2015. – Т.93. - №6. – С.111-112.
9. **Панов, Г.В.** Сравнительный анализ фенотипической и генотипической устойчивости микобактерий туберкулеза, выделенных от ранее не леченных больных легочными формами туберкулеза в сочетании с поздними стадиями ВИЧ-инфекции в Свердловской области / **Г.В. Панов**, А.И. Цветков, С.Н. Андреевская, Е.Е. Ларионова // Фтизиатрия и пульмонология. – 2016. - №1 (12). – С.94-95.

10. **Панов, Г.В.** Анализ мутаций микобактерий туберкулеза, определяющих их лекарственную устойчивость, у больных с нелеченным туберкулезом легких при разном ВИЧ-статусе в Свердловской области. / **Г.В. Панов**, С.Н. Андреевская, Е.Е. Ларионова, А.И. Цветков, Л.Н. Черноусова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. - Т.95. - №2. - С.27-32.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

КК - клональный комплекс

ЛЧ - лекарственная чувствительность

ЛУ - лекарственная устойчивость

МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

ППС - плотные питательные среды

ПТП - противотуберкулезный препарат

СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита

ШЛУ - широкая лекарственная устойчивость

Ala - аланин

Arg - аргинин

Asn - аспарагин

Asp - аспаргат

C - цитозин

Cys - цистеин

DR - direct repeat - прямой повтор

E - этамбутол

G - гуанин

Gln - глутамин

Gly - глицин

H - изониазид

His - гистидин

Ile - изолейцин

Km - канамицин

Leu - лейцин

Met - метионин

Ofx - офлоксацин

Pro - пролин

R - рифампицин

S - стрептомицин

Ser - серин

SIT - Spoligotype International Type - международный вариант сполиготипа

T - тимин

Thr - треонин

Tyr - тирозин

UPGMA - unweighted pair-group method of arithmetic averages - невзвешенный попарный метод арифметических средних

Val - валин