

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

На правах рукописи

Панов Григорий Валентинович

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
профессор Черноусова Лариса Николаевна

Москва – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы исследования	5
Цель работы	8
Задачи исследования:.....	8
Научная новизна исследования	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	10
Методология и методы исследования.....	11
Штаммы <i>M.tuberculosis</i>	12
Микробиологические методы исследования.....	14
Молекулярно-генетические методы исследования	16
Статистические методы исследования и программное обеспечение	21
Личный вклад автора в получение результатов.....	22
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	22
Степень достоверности и апробация результатов	23
Публикации.....	24
Структура и объем диссертации	24
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	25
1.1. Сочетанная патология ВИЧ/ТБ.....	25
1.1.1. Эпидемиология сочетанной патологии ВИЧ/ТБ	25
1.1.2. Клинические особенности и диагностика туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц.....	28
1.2. Лекарственная устойчивость <i>M.tuberculosis</i>	29
1.2.1. Базовые концепции и распространенность лекарственно-устойчивого туберкулеза в РФ.....	29
1.2.2. Механизмы формирования лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам.....	31
1.2.3. Основные подходы, используемые в диагностике лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i>	36
1.3. Молекулярная эпидемиология <i>M.tuberculosis</i>	40
1.3.1. Молекулярное типирование штаммов микобактерий туберкулёзного комплекса	40

1.3.1.1. Генотипирование по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов, содержащих IS6110.....	41
1.3.1.2. Генотипирование микобактерий туберкулезного комплекса по локусу прямых повторов (сполиготипирование).....	41
1.3.1.3. Генотипирование штаммов микобактерий туберкулезного комплекса методом MIRU-VNTR.....	43
1.3.2. Молекулярно-эпидемиологические особенности популяции штаммов <i>M.tuberculosis</i> , циркулирующих в РФ	44
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
ГЛАВА 2. Характеристика жизнеспособности <i>M.tuberculosis</i> , выделенных от ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом (по скорости и массивности роста).....	48
ГЛАВА 3. Особенности фенотипической лекарственной чувствительности <i>M.tuberculosis</i> у пациентов с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ	51
ГЛАВА 4. Молекулярно-генетические особенности устойчивости к противотуберкулезным препаратам <i>M.tuberculosis</i> , выделенных от больных с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ	59
4.1. Спектр мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, у штаммов <i>M.tuberculosis</i> группы I	59
4.2. Спектр мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, у штаммов <i>M.tuberculosis</i> группы II.....	64
4.3. Сравнительный анализ генотипической резистентности штаммов <i>M.tuberculosis</i> групп I и II.....	68
ГЛАВА 5. Генетический полиморфизм штаммов <i>M.tuberculosis</i>	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ.....	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	109
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

ВВЕДЕНИЕ

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 [4]. 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.) [4, 21, 23]. 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 [3, 22, 61, 134]. Умирают от туберкулёза 40-60% больных ВИЧ-инфекцией [4, 134].

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, а распространенность туберкулеза в Свердловской области в 2014 году составила 218,0 на 100 000 населения (в РФ – 137,3 на 100 000 населения) [40, 43]. 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) [55]. 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 [40, 43].

До сих пор нет единого мнения о путях развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных: реактивация из очагов ранее перенесенного туберкулеза или суперинфицирование [6, 87]. Не уточнено влияние ВИЧ-инфекции на бактериовыделение и эпидемическую опасность пациентов [15, 17]. Также нет единого мнения по поводу частоты формирования лекарственной устойчивости у *M.tuberculosis*, выделяемых от больных с ко-инфекцией [3, 16, 29, 189]. 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) [25, 87, 189]. 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 [1, 8, 12, 13, 14, 32, 35, 36, 57, 132]. 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* [63]. 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%) [11]. Аналогичные результаты были получены в работе P.J. Easterbrook [94]. В других работах, напротив, были выявлены ассоциации между ВИЧ-статусом больного и наличием множественной и/или широкой лекарственной устойчивости у *M.tuberculosis* [68, 98, 139, 159].

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 [83, 94], в других работах были выявлены ассоциации с определенным генотипом *M.tuberculosis*, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных [151].

Имеются противоречивые данные, касающиеся интенсивности бактериовыделения у ВИЧ-инфицированных пациентов. Ряд исследователей утверждает, что в связи с резким снижением эксудативно-пролиферативных процессов на фоне тяжелого иммунодефицита полости распада в легких на поздних стадиях ВИЧ-инфекции отмечаются нечасто, именно поэтому бактериовыделение регистрируется реже и пациенты в меньшей степени опасны, чем ВИЧ-негативные [17]. Другие считают, что на фоне снижения иммунитета происходит активное размножение популяции микобактерий туберкулеза, что приводит к увеличению патогенности возбудителя туберкулеза и более интенсивному бактериовыделению [15].

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 [24].

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 сполиготипирования 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. Дизайн исследования приведен на рисунке 1.

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.

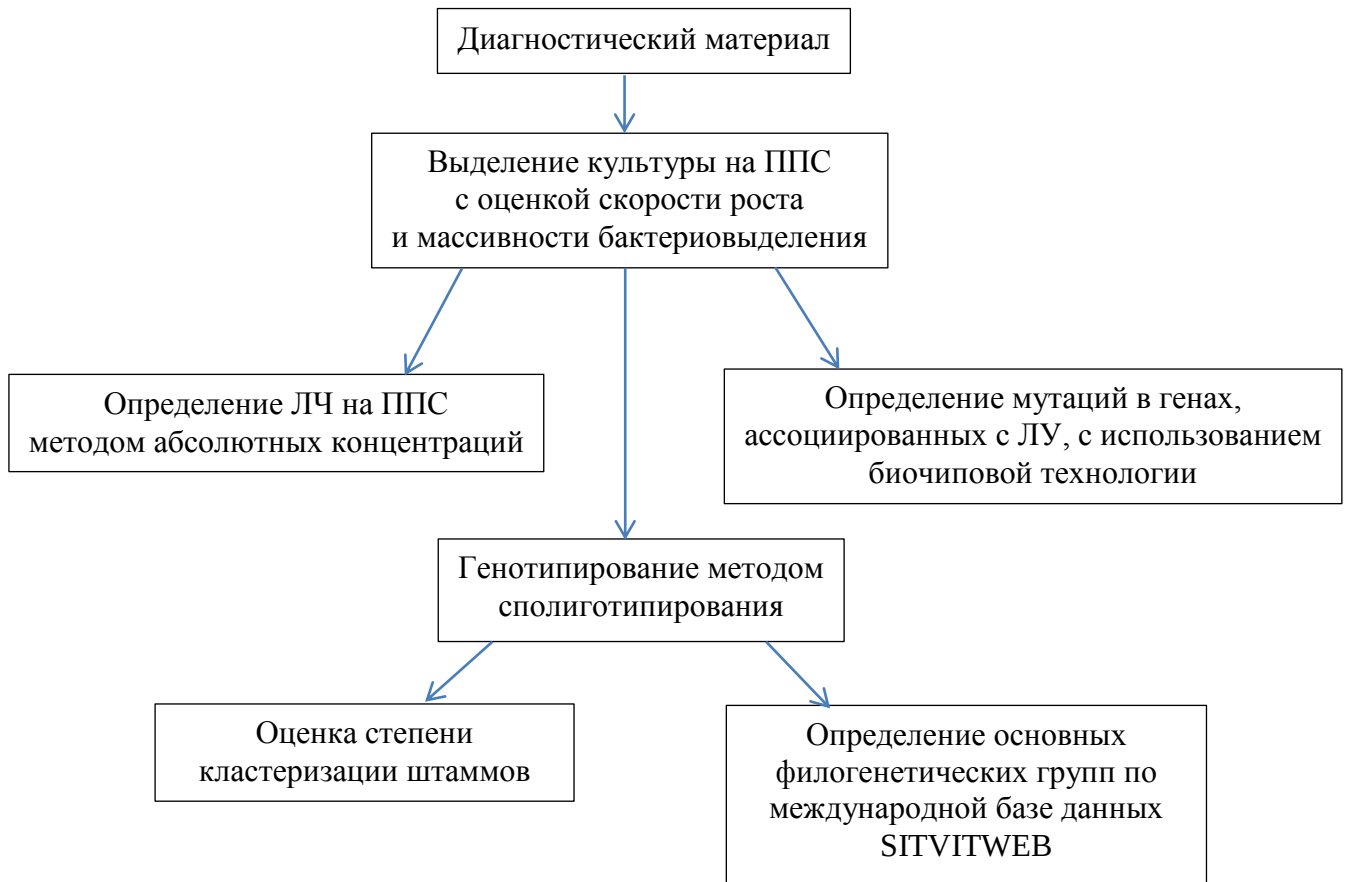


Рисунок 1 - Дизайн исследования

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 Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Свердловской области "Противотуберкулезный диспансер" г. Екатеринбурга. 165 больных туберкулезом (ТБ), сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД (источник штаммов группы I), были направлены в Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области "Противотуберкулезный диспансер" для уточнения диагноза после обследования в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения 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 Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Свердловской области "Противотуберкулезный диспансер" г. Екатеринбурга.

Половой состав больных ТБ с ко-инфекцией ВИЧ и ВИЧ-негативных был идентичным (таблица 1). В обеих группах преобладали мужчины (114/165, 69,09% и 118/166, 71,08%, соответственно по группам).

Таблица 1 – Распределение больных туберкулезом легких, послуживших источником штаммов МБТ, по полу

Пол	Число больных	Группа I (ВИЧ/ТБ)	Группа II (ТБ ВИЧ-отр)
М	абс.	114	118
	%	69,09	71,08
Ж	абс.	51	48
	%	30,91	28,92
Всего	абс.	165	166
	%	100	100

Наибольшей по численности была возрастная группа 25-44 года (таблица 2): среди больных ТБ с ВИЧ-инфекцией их число составило 158/165 (95,76%), а среди больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом – 106/166 (63,86%). Число больных этого возраста в группе I было достоверно выше ($p < 0,01$), чем в группе II и это было справедливо как в отношении мужчин, так и женщин.

Таблица 2 – Распределение больных туберкулезом легких, послуживших источником штаммов МБТ, по возрасту

Группа	Число больных	Возраст						Всего
		18-24	25-34	35-44	45-54	55-64	65 и старше	
1 (ВИЧ/ТБ)	абс.	2	94	62	5	2	-	165
	%	1,21	56,97	37,58	3,03	1,21	-	100
2 (ТБ ВИЧ-отр)	абс.	23	54	52	25	11	1	166
	%	13,86	32,53	31,33	15,06	6,63	0,60	100

По клиническим формам среди больных, ставших источником штаммов МБТ, были выявлены существенные отличия (таблица 3). Если у больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом доминировал инфильтративный туберкулез (156/166, 93,98%), то в группе больных с сопутствующей ВИЧ-инфекцией инфильтративный туберкулез встречался достоверно реже (59/165, 35,76%). У больных этой группы часто встречались распространенные формы ТБ: генерализованный ТБ (10,91%), диссеминированный ТБ (20,61%) и ТВГЛУ (24,24%), которые в группе ВИЧ-негативных больных ТБ практически не были представлены.

Таблица 3 – Характеристика больных туберкулезом легких, послуживших источником штаммов МБТ, по клиническим формам

Клинические формы	Группа I (ВИЧ/ТБ)		Группа II (ТБ ВИЧ-отр.)	
	абс.	%	абс.	%
Генерализованный ТБ	18	10,91	-	-
Диссеминированный ТБ	34	20,61	2	1,20
Инфильтративный ТБ	59	35,76	156	93,98
Милиарный ТБ	1	0,61	-	-
Очаговый ТБ	6	3,64	4	2,41
Казеозная пневмония	-	-	1	0,60
ТВГЛУ	40	24,24	-	-
Туберкулома	-	-	1	0,60
Цирротический ТБ	-	-	1	0,60
Туберкулезный плеврит	7	4,24	1	0,60

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 [45]. Перед посевом патологический материал подвергали гомогенизации и деконтаминации. Для этого в пробирку к мокроте, экссудату и другому негомогенному материалу добавляли 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия, затем встряхивали. Жидкие материалы предварительно центрифугировали и работали с осадком. Флакон с

материалом инкубировали 18 - 20 часов в термостате при 37 °С. После этого каждый образец центрифугировали при 3000g в течение 15 минут. Удаляли супернатант и продолжали работу с осадком. К осадку стерильно добавляли несколько капель 6% соляной кислоты до получения нейтрального значения рН. Посев проводили инокуляцией равных объемов материала (примерно по 0,5 - 0,6 мл) в 2 пробирки с яичными средами – Левенштейна-Йенсена и «Новая» с учетом стерильности. Засеянные пробирки закрывали ватно-марлевыми пробками и помещали в наклонном положении в горизонтальные штативы - "диваны" и термостатировали при температуре 37 °С. Через 2 - 3 суток инкубации ватно-марлевые пробки заменяли герметичными резиновыми и пробирки переводили в вертикальное положение. Инкубацию продолжали в течение 12 недель. Просмотр культур для определения скорости роста проводили ежедневно.

Интенсивность роста оценивали по 3-х балльной системе [45]:

(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 [27]. 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. Среда готовили согласно [45]. Результат учитывали на 21 день после посева. При скудном росте в контрольной пробирке, все пробирки с препаратами оставляли еще на 1 - 2 недели в термостате до получения выраженного роста в контроле и окончательно оценивали результат теста. 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

Для проведения анализа полученные образцы культур были предобработаны «инактивирующим реагентом А» (Синтол, Россия) в соотношении 1:1. После тщательного перемешивания образцы были инкубированы 15-60 минут при комнатной температуре. По окончании времени инкубации пробирки с инактивированными образцами центрифугировались при 3000g в течение 10 минут. Полученные осадки переносились в пробирки типа «Эппендорф». Из полученных осадков культур выделяли ДНК 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», (TECAN, 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. Для этого полученную ДНК возбудителя вносили в готовую реакционную смесь в микропробирки на 0,2 мл в объеме 20 мкл. Также для оценки достоверности полученных результатов вносили калибровочные образцы, положительный и отрицательный контрольные образцы, предоставленные в наборе.

Амплификацию ДНК и детекцию результатов осуществляли на термоциклере с оптическим модулем CFX-96 (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя тест-системы: начальная денатурация при 94 °C / 15 мин, затем 45 циклов, включающих денатурацию ДНК при 94 °C / 15 сек., с последующими отжигом праймеров и элонгацией при 63 °C / 40 сек. Оценка полученных результатов осуществлялась по графикам кривых накопления продукта амплификации; результат считался достоверным при отсутствии индикации сигналов амплификации в отрицательном контрольном образце и достоверно сработавшем внутреннем положительном контроле.

Выделенную ДНК после идентификации использовали для определения генотипической устойчивости МБТ с использованием наборов "ТБ-БИОЧИП-1" и "ТБ-БИОЧИП-2" (БИОЧИП-ИМБ, Россия) [48, 49].

Процесс определения точечных мутаций, ответственных за возникновение ЛУ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, проводился, согласно инструкции изготовителя, в 4 этапа и включал две стадии ПЦР, гибридизацию продуктов второго этапа ПЦР на биологическом микрочипе и визуализацию результатов гибридизации.

На первой стадии ПЦР происходит амплификация специфичной для МБТ нуклеотидной последовательности IS6110-элемента и фрагментов генома, отвечающих за возникновение резистентности к рифампицину (ген *rpoB*), изониазиду (гены *katG*, *inhA* и *ahpC*), определяемые набором "ТБ-БИОЧИП-1", и к фторхинолонам (ген *gyrA*), выявляемые набором "ТБ-

БИОЧИП-2". Амплификационную смесь для проведения данного этапа ПЦР готовили согласно Инструкции к наборам "ТБ-БИОЧИП-1" и "ТБ-БИОЧИП-2". Состав реакционной смеси: вода деионизованная со степенью очистки MQ – 19,5 мкл, 10-кратный буфер для ПЦР – 3 мкл, водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов – 3 мкл, специфичный для каждого набора водный раствор праймеров для проведения первой стадии ПЦР – 0,6 мкл, Taq ДНК-полимераза – 0,6 мкл, урацил-N-гликозилаза – 0,3 мкл (общий объем – 27 мкл). Анализируемые образцы ДНК вносили в объеме 3 мкл. Реакцию амплификации проводили с использованием термоциклера с оптическим модулем CFX 96 (Bio-Rad, США). Предварительную денатурацию ДНК осуществляли при 95 °С в течение 4 мин. Затем, в течение 36 циклов, проводили наработку целевых последовательностей при следующем температурно-временном режиме: 95 °С / 30 сек. (денатурация ДНК), 67 °С / 30 сек. (отжиг праймеров) и 72 °С / 30 сек. (элонгация). Завершающую инкубацию проводили при 72 °С в течение 5 мин.

Результаты ПЦР оценивали электрофорезом продуктов амплификации в 2% агарозном геле при 10 В/см в течение 20 мин. Положительными результатом реакции при использовании набора "ТБ-БИОЧИП-1" считали наличие пяти полос в дорожке соответствующих 5 полосам положительного контроля (309 п.н. (IS6110), 212 п.н. (*rpoB*), 166 п.н. (*katG*), 133 п.н. (*inhA*), 126 п.н. (*ahpC*), а при использовании набора "ТБ-БИОЧИП-2" – двух полос размером 309 п.н. (IS6110) и 181 п.н. (*gyrA*).

Наличие амплифицированного фрагмента ДНК в виде светящейся полосы в дорожке с исследуемым образцом мокроты, соответствующей 309 п.н., свидетельствовало о присутствии в образце ДНК МБТ. Для проведения 2-го этапа ПЦР использовали те образцы, в которых было подтверждено наличие ДНК МБТ.

Вторая стадия ПЦР, проводимая по асимметричному типу, служит для получения преимущественно одноцепочечных флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов, и представляет собой мультиплексную амплификацию

фрагментов ДНК МБТ, комплементарных олигонуклеотидам, иммобилизированным в ячейках микрочипа.

Данную стадию ПЦР проводили, согласно инструкции изготовителя набора, в реакционной смеси состава: вода деионизованная со степенью очистки MQ для проведения ПЦР – 37 мкл, 10-кратный буфер для ПЦР - 5 мкл, водный раствор дезоксинуклеозидтрифосфатов – 5 мкл, специфичный для каждого набора водный раствор праймеров для проведения второй стадии ПЦР – 1 мкл, Taq ДНК-полимераза – 1 мкл (общий объем – 49 мкл). В качестве ДНК-матрицы использовали ПЦР-продукты, полученные на первой стадии ПЦР, которые вносили в объеме 1 мкл. Для проведения реакции использовали термоциклер с оптическим модулем CFX 96 (Bio-Rad, США).

Предварительную денатурацию ДНК проводили при 95 °С в течение 5 мин. Далее, в течение 37 циклов, проводили наработку целевых последовательностей при следующем температурно-временном режиме: 95°С / 20 сек. (денатурация ДНК), 61 °С ("ТБ-БИОЧИП-1")/ 63 °С ("ТБ-БИОЧИП-2") / 30 сек. (отжиг праймеров) и 72 °С / 30 сек. (элонгация). Завершающую инкубацию осуществляли при 72 °С в течение 5 мин.

Гибридизацию на биологическом микрочипе проводили с продуктом второй стадии ПЦР с целью идентификации мутаций, приводящих к устойчивости МБТ к рифампицину и изониазиду ("ТБ-БИОЧИП-1") и фторхинолонам ("ТБ-БИОЧИП-2"). Биологический микрочип представляет собой подложку с упорядоченно расположенными микроячейками полиакриламидного геля, содержащими ковалентно иммобилизованные олигонуклеотидные зонды, последовательности которых комплементарны как немутантным фрагментам генов, так и фрагментам, содержащим мутации. При гибридизации одноцепочечный флуоресцентно-меченый фрагмент ДНК, полученный в ходе двухэтапной ПЦР, образует высокостабильный гибридизационный комплекс только с полностью комплементарным иммобилизованным зондом (т.е. каждый нуклеотид

изучаемой мишени образует совершенный гибридизационный дуплекс с соответствующим нуклеотидом в составе зонда).

Для проведения реакции гибридизации на микрочип вносили 20 мкл буфера для гибридизации и 10 мкл реакционной смеси, полученной после второй стадии ПЦР. Гибридизацию проводили в закрытом суховоздушном термостате при 37 °С в течение 6-18 ч. По окончании гибридизации биочипы отмывали дистиллированной водой, подогретой до 37 °С. Высушивали биочип в струе воздуха до полного исчезновения капель на поверхности подложки.

Анализ результатов гибридизации проводили с помощью универсального аппаратно-программного Комплекса (УАПК) для анализа биологических микрочипов (ТУ 9443-004-02699501-2006). Установка и эксплуатация комплекса осуществлялась в соответствии с Руководством по эксплуатации Комплекса. Для возбуждения флюорофорных групп красителя, встроенного в процессе второй стадии ПЦР в исследуемый фрагмент генома и входящего в состав гибридизационного комплекса, использовали монохроматический свет с длиной волны 655 нм ("ТБ-БИОЧИП-1") / 650 нм ("ТБ-БИОЧИП-2"). Флуоресцентные сигналы каждой ячейки регистрировали ПЗС-камерой и подвергали оцифровке. Сравнение флуоресцентных сигналов в ячейках проводилось специальным программным обеспечением, используя заданный алгоритм. На основании анализа свечения формировался отчет об отсутствии/наличии мутаций в исследуемой ДНК микобактерий и, соответственно, о чувствительности/устойчивости исследуемого штамма к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам.

Сполиготипирование

Сполиготипирование проводили с набором реагентов для сполиготипирования (Isogen Bioscience BV, Нидерланды) в соответствии инструкцией производителя. Амплификацию DR-области хромосомной ДНК МБТ проводили со специфическими праймерами Dra (меченный биотином) и

Drb при температурно-временном режиме: 96 °C / 3 мин.; 20 циклов 96 °C / 1 мин., 55 °C / 1 мин., 72 °C / 30 сек. Гибридизацию меченных биотином продуктов амплификации ДНК с 43 спейсорными олигонуклеотидами, иммобилизованными на входящий в состав набора мембране, осуществляли в миниблоттере, согласно инструкции производителя. Мембрану располагали перпендикулярно маркированным слотам миниблоттера. В слоты вносили продукты амплификации ДНК. Инкубацию проводили при 60 °C в течение часа. Отмытую мембрану для активации хемилюминесценции гибридизовали с конъюгатом стрептавидина и пероксидазы при 42 °C в течение 1-1,5 часов. Детекцию хемилюминесценции проводили с реагентами из набора ECL (Amersham Biosciences, США) согласно указаниям производителя. Для проявления сигнала мембрану экспонировали на светочувствительной пленке Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, США). Результаты сполитипирования оценивали визуально по наличию или отсутствию каждого из 43-х спейсоров.

Коэффициент активности трансмиссии МБТ оценивали по формуле [155]:

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

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.miru-vntrplus.org.

Личный вклад автора в получение 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сочетанная патология ВИЧ/ТБ

1.1.1. Эпидемиология сочетанной патологии ВИЧ/ТБ

Одно из первых исследований, посвященное риску развития туберкулеза у ВИЧ-инфицированных индивидуумов, было проведено более 20 лет назад Р.А. Selwyn et al. Показано, что ТБ является одной из наиболее распространенных оппортунистических инфекций среди ВИЧ-инфицированных лиц, особенно в регионах с высокой распространенностью туберкулеза [149, 193].

Считается безусловно доказанным взаимное влияние друг на друга ТБ и ВИЧ-инфекции. Положительный ВИЧ-статус способствует развитию активного туберкулеза как у недавно инфицированных МБТ больных, так и у больных с имевшимся латентным туберкулезом, для которых ВИЧ-инфицирование является основным фактором риска активации латентной инфекции. Так, риск перехода латентного туберкулеза в активную форму у лиц, инфицированных ВИЧ, составляет 5-10% ежегодно, в то время как у лиц с отрицательным ВИЧ-статусом – 5-10% на протяжении всей жизни, что обусловлено иммунодефицитом, вызванным ВИЧ [193]. Кроме того, показано, что ВИЧ-инфекция приводит к увеличению частоты рецидивов ТБ, связанных как с эндогенной реактивацией, так и экзогенной реинфекцией [112, 123].

Поэтому, начиная с 1980-х годов, эпидемия ВИЧ привела к значительному увеличению числа случаев активного туберкулеза и смертности от него во многих странах, особенно в Южной и Восточной Африке. По данным ВОЗ, в 2014 году из 9,6 млн. зарегистрированных случаев туберкулеза, в 12% (1,2 млн. случаев) у больных был зарегистрирован положительный ВИЧ-статус; 74% из этих ВИЧ-позитивных

случаев приходились на Африканский регион. Уровень смертности от ВИЧ-ассоциированного туберкулеза в мире продолжает оставаться на высоком уровне – 390.000 случаев в 2014 году. Из всех зарегистрированных в 2014 году смертей от туберкулеза 25% приходилось на ВИЧ-ассоциированный туберкулез [196].

В Российской Федерации, несмотря на то, что заболеваемость ТБ имеет тенденцию к снижению, происходит постоянный рост показателя заболеваемости ТБ, сочетанного с ВИЧ. Так, в 2013 году по сравнению с 2012 годом заболеваемость туберкулезом снизилась на 7,5% (с 68,1 до 63,1 на 100 тыс. населения), в 2014 году еще на 5,6% (59,5 на 100 000 населения), в 2015 году на 3% (57,7 на 100 000 населения), а по сравнению с 2008 годом, когда наблюдался пик заболеваемости (85,1 на 100 тыс. населения), снижение составило 32,2%. Заболеваемость ТБ, сочетанным с ВИЧ-инфекцией, напротив, неуклонно увеличивалась и составляла в 2009 году – 4,4; в 2011 году – 5,6; в 2012 году – 5,9; в 2013 году – 6,5, в 2014 году – 7,4, в 2015 году 8,2 на 100 тыс. населения. При этом каждый десятый (15,1% в 2014 году, 17,3% в 2015 году) впервые выявленный случай туберкулеза сочетался с ВИЧ-инфекцией. Максимальный показатель заболеваемости туберкулезом при сочетании с ВИЧ-инфекцией среди постоянного населения в 2015 г. отмечался в Уральском ФО (19,8 на 100 000 населения) и Сибирском ФО (20,0); из субъектов Российской Федерации – в Иркутской области (35,3), Кемеровской области (32,5), Новосибирской области (22,7), Свердловской области (25,5), Тюменской области (22,5), Алтайском крае (24,0) [39, 40].

Распространенность ТБ в РФ в целом также имеет тенденцию к снижению: так, в 2015 г. по сравнению с 2014 г. показатель общей распространенности туберкулеза (на окончание года) снизился на 6,0% (с 137,3 до 129,1 на 100 000 населения). При этом отмечается ежегодный рост распространенности сочетания туберкулеза и ВИЧ-инфекции: 2009 г. – 10,2; 2014 г. – 17,5; 2015 г. – 19,7 на 100 000 населения. Свердловская область

лидирует по числу пациентов с сочетанием туберкулеза и ВИЧ-инфекции (2915 чел.), что составляет приблизительно 10% от всех пациентов с коинфекцией, зарегистрированных в России на окончание 2015 года (28821 чел) [40].

Показатель смертности постоянного населения от туберкулеза в РФ снизился на 10,8% и составил в 2015 году 7,4 на 100 тыс. населения [40]. Происходящее снижение смертности от туберкулеза возникает за счет увеличения смертности от ВИЧ-инфекции больных туберкулезом [42]. Так, по данным ЦНИИОИЗ, снижение показателя смертности от туберкулеза в 2015 г. по сравнению с 2014 г. (умерло меньше на 1 332 чел.) произошло более чем в половине случаев (709 чел.) за счет увеличения регистрации смертности от ВИЧ-инфекции в поздних стадиях пациентов, умерших фактически от туберкулеза, поскольку каждый второй пациент, зарегистрированный как умерший от ВИЧ-инфекции в поздних стадиях (4Б, 4В и 5), умирает от прогрессирования туберкулеза (2014 г. – 53,3%; 2015 г. – 47,6%) [40].

В целом, распространению туберкулёза у больных ВИЧ-инфекцией способствуют высокая инфицированность населения микобактериями туберкулёзного комплекса (МБТК), идентичность групп риска по обеим инфекциям (больные наркоманией, заключённые, лица, ведущие асоциальный образ жизни), а также высокая степень иммуносупрессии [4, 44, 138, 146]. Возможно, лидирующее положение Уральского ФО среди регионов с коинфекцией ВИЧ и ТБ, стало причиной того, что в 2015 году там был отмечен рост показателя «заболеваемость туберкулезом» на 4,3% (с 75,1 до 78,3 на 100 тыс. населения) [40].

Таким образом, ВИЧ-ассоциированный туберкулез имеет большое значение для здравоохранения РФ и, в отсутствии адекватных мер контроля, может привести к ухудшению эпидемических показателей по ТБ в стране.

1.1.2. Клинические особенности и диагностика туберкулеза у ВИЧ-инфицированных лиц

Клиническое течение туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией, зависит от количества CD4⁺ - лимфоцитов, определяющих тяжесть иммуносупрессии [114]. Принятым пороговым значением считается 200 CD4⁺ клеток в 1 мкл крови. Если количество CD4⁺ - лимфоцитов превышает пороговое значение, то иммуносупрессия не считается выраженной. В этом случае формируется классическая гранулема, на рентгенограмме в легких визуализируются типичные ограниченные туберкулезные очаги с частым распадом. Экстрапульмонарная локализация очагов, а также поражения плевры и лимфатических узлов встречается нечасто [88].

При выраженной иммуносупрессии, когда число CD4⁺ клеток становится ниже 200 в 1 мкл крови, гранулемы как правило не формируются [88]. Рентгенологическая картина легкого характеризуется отсутствием распада, милиарной диссеминацией и диффузной интерстициальной инфильтрацией. Характерны плевральные и перикардальные выпоты, увеличение прикорневых лимфоузлов. Часто наблюдается поражение нескольких долей легкого. В 10% случаев, даже при наличии массивного бактериовыделения, изменения на рентгенограмме могут отсутствовать [7].

Также для туберкулеза при выраженной иммуносупрессии характерна гематогенная диссеминация МБТ с поражением периферических лимфоузлов, внутренних органов и центральной нервной системы [121]. В целом, частота туберкулеза внелегочной локализации может достигать 50% [88]. Наиболее неблагоприятной формой внелегочного ТБ, ассоциированного с ВИЧ, летальность при которой достигает 100%, является туберкулезный менингит [80].

Важной задачей является диагностика и дифференциальная диагностика ТБ, ассоциированного с ВИЧ. Согласно "Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению туберкулеза у ВИЧ-

инфицированных" все впервые выявленные больные ВИЧ-инфекцией (взрослые и дети) должны быть обследованы на предмет исключения активного туберкулеза и латентной туберкулезной инфекции. Аналогичным образом всем больным туберкулезом должно быть предложено тестирование на ВИЧ с проведением до- и послетестового консультирования [60].

При слабой иммуносупрессии диагностика ТБ существенно не отличается от классической схемы, применяемой к неинфицированным лицам. При выраженной иммуносупрессии процесс диагностики осложняется тем, что снижается чувствительность кожных туберкулиновых проб, вплоть до полного отсутствия чувствительности при количестве CD4⁺ клеток 100 в 1 мкл крови, вследствие угнетения реакции гиперчувствительности замедленного типа, в которой задействованы Т-лимфоциты [22]. Кроме того, часто при ВИЧ-инфицировании наблюдаются заболевания легких, вызванные другими оппортунистическими инфекциями и вторичными заболеваниями, по клиническим и рентгенологическим проявлениям схожие с проявлениями туберкулеза, что также существенно затрудняет диагностику [60].

В целом, учитывая, что вследствие взаимодействия ТБ и ВИЧ-инфекции, регистрируются более высокие показатели заболеваемости и смертности, ранняя диагностика и лечение ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц, может улучшить исход терапии и предотвратить распространение ТБ.

1.2. Лекарственная устойчивость *M.tuberculosis*

1.2.1. Базовые концепции и распространенность лекарственно-устойчивого туберкулеза в РФ

Согласно современным представлениям, существует два вида ЛУ микобактерий туберкулеза: первичная и приобретенная (или вторичная) [9, 26, 201]. Согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) первичной является устойчивость, выявленная у МБТ, выделенных от пациентов, никогда ранее не принимавших ПТП или принимающих их не

более 4-х недель, что указывает на инфицирование пациента ЛУ штаммом МБТ [188, 191]. С эпидемиологической точки зрения показатель первичной ЛУ характеризует состояние популяции возбудителя туберкулеза [62]. В свою очередь, вторичная ЛУ МБТ к ПТП является косвенным показателем эффективности химиотерапии, т.к. она возникает на фоне лечения [28, 175, 191].

По числу ПТП, к которым конкретный штамм МБТ обладает устойчивостью, различают следующие варианты ЛУ [31, 271, 284]:

- монорезистентность – наличие ЛУ к одному ПТП, при этом сохраняется чувствительность к другим препаратам;
- полирезистентность – выявление ЛУ к двум или более ПТП, кроме сочетания рифампицина и изониазида;
- множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) – устойчивость к двум основным ПТП первого ряда (изониазид и рифампицин), независимо от наличия ЛУ к другим ПТП;
- широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ) – сочетанная устойчивость МБТ к изониазиду, рифампицину, любому препарату из группы фторхинолонов и канамицину и/или амикацину и/или капреомицину, независимо от наличия устойчивости к другим ПТП.

Лекарственно-устойчивые формы туберкулеза являются наиболее значимой проблемой для противотуберкулезной службы РФ. Отмечается неуклонный рост распространенности МЛУ ТБ среди контингентов, состоящих на учете на окончание года: с 23,6 на 100 тыс. населения в 2011 году до 24,8 – в 2014 г. и 25,5 – в 2015 г. Также продолжается рост доли больных с МЛУ ТБ среди бактериовыделителей – с 34,2% в 2011 г. до 43,9% в 2014 г. и 47,5% – в 2015 г. [37, 40, 43]. При этом в Свердловской области распространенность МЛУ ТБ в 2013 г. составляла 28,0, в 2014 г. – 35,5 на 100 тыс. населения и в 2015 г. – 38,5 на 100 тыс. населения, превышая средний показатель по России (24,2 – 2013г., 24,8 – 2014г. и 25,5 – 2015 г.) [38, 39, 40, 43].

Среди впервые выявленных больных ТБ органов дыхания в РФ с 2009 по 2013 года отмечалась стабилизация показателя на уровне 4,0-4,1 на 100 тыс. населения, но с 2014 года начал происходить рост показателя: 4,6 на 100 тыс. населения в 2014 г., 5,2 на 100 тыс. населения – в 2015 г. При этом рост доли МЛУ ТБ среди впервые выявленных бактериовыделителей отмечался всегда: с 13,0% в 2009 г. до 17,4% в 2013, 20,4% в 2014г. и 23,0% в 2015г. [39, 40, 43]. В Свердловской области доля больных с МЛУ ТБ среди впервые выявленных больных составила – 12,7% в 2013г. и 18,9% в 2014г. [38, 43].

Россия, по данным ВОЗ, входит в число стран, в которых регистрируются случаи ШЛУ ТБ. На настоящий момент в РФ не проводится учет случаев этой формы туберкулеза, однако, зная, что по оценкам ВОЗ распространенность ШЛУ ТБ прямо коррелирует с числом случаев МЛУ ТБ (составляет 9,6% от контингента пациентов с МЛУ ТБ, [196]), можно предположить, что в РФ происходит нарастание и ШЛУ ТБ.

Все пациенты, у которых хотя бы раз были выявлены штаммы с МЛУ/ШЛУ, подлежат особому учету, т.к. лечение таких пациентов из-за ограниченного ассортимента ПТП крайне затруднено, является длительным по срокам и требует применения ПТП резервного ряда, большинство из которых являются дорогостоящими и зачастую вызывают побочные реакции [10, 31, 41, 52, 56, 189].

1.2.2. Механизмы формирования лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам

В основе формирования устойчивости МБТ к тому или иному ПТП лежат спонтанные мутации, возникающие с частотой от 10^{-6} до 10^{-8} репликаций. Поскольку мутационные события между собой не связаны, то вероятность появления у МБТ устойчивости одновременно к трем препаратам составляет от 10^{-18} до 10^{-20} , т.е. шансы формирования ЛУ на фоне комбинированного лечения тремя эффективными ПТП практически исключены. Следовательно, появление клинической формы лекарственно-

устойчивого туберкулеза вследствие возникновения спонтанных мутаций и размножения мутантного клона возможно только вследствие терапевтических ошибок, к которым можно отнести неадекватные схемы терапии и несоблюдение больным назначенного курса лечения [99, 180]. Последовательное накопление мутаций в генах, ассоциированных с возникновением ЛУ к ПТП, может привести к формированию МЛУ/ШЛУ генотипа. Ниже приведены молекулярные механизмы формирования ЛУ к основным ПТП.

Изониазид. Изониазид является одним из основных ПТП 1-го ряда ввиду его высокой эффективности, обусловленной низкой минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) в отношении МБТ, составляющей 0,02 - 0,2 мкг/мл. Препарат действует в отношении активно делящихся МБТ. Изониазид является пролекарственной формой, активирующейся под действие фермента каталазы-пероксидазы (KatG), которая кодируется геном *katG* [199]. Основной мишенью активной формы изониазида считается фермент InhA (редуктаза еноил-ацилпереносящего белка), задействованный в синтезе миколовой кислоты на этапе элонгации жирных кислот [70]. Частота формирования устойчивости к изониазиду составляет 10^{-5} - 10^{-6} репликаций, т.е. возникает чаще, чем резистентность к другим ПТП. Основным механизмом развития резистентности к изониазиду являются мутации на уровне гена *katG*, наиболее распространенной из которых является KatG S315T, обнаруживаемая у 50-95% устойчивых к изониазиду штаммов [104, 199, 200].

Также устойчивость к изониазиду могут обуславливать мутации в промоторе оперона *mabA/inhA*, приводящие к гиперпродукции InhA, а также мутации в самом гене *inhA*, снижающие аффинность белкового продукта к препарату [70, 144]. Мутации на уровне *inhA* или его промотора, как правило, приводят к низкому уровню устойчивости к изониазиду [104, 200]. Часто в таких штаммах выявляются дополнительные мутации в *katG*, вследствие чего уровень устойчивости к изониазиду повышается [106]. Кроме того, мутации

на уровне *inhA* также приводят к устойчивости к этионамиду, который структурно родственен изониазиду [70].

Третий, наиболее редкий механизм формирования резистентности к изониазиду, связан с мутациями на участке промотора *ahpC*, кодирующего редуктазу алкилгидропероксида, приводящими к его гиперпродукции [152]. Данный вид мутаций приводит к низкому уровню резистентности к изониазиду или вообще не влияет на чувствительность к препарату [107].

Рифампицин. Рифампицин – второй основной ПТП первого ряда, который активен как в отношении реплицирующихся МБТ, так и МБТ с низкой метаболической активностью, находящихся в стационарной фазе роста. Это свойство рифампицина позволяет сократить время лечения ТБ с 12-18 месяцев до 9 месяцев [130]. Рифампицин препятствует синтезу РНК, блокируя β -субъединицу РНК-полимеразы, кодируемую геном *rpoB* [201]. Приблизительно у 96% штаммов МБТ, устойчивых к рифампицину, мутации локализованы на участке гена *rpoB* протяженностью 81 п.н. Частота возникновения значимых мутаций в *rpoB* составляет 10^{-7} - 10^{-8} репликаций. [169]. Наиболее распространены мутации в кодонах 531, 526 и 516. Мутации на уровне *rpoB*, как правило, приводят к возникновению высокого уровня резистентности (МИК > 32 мкг/ мл) и перекрестной устойчивости ко всем препаратам рифампицинового ряда. Однако описан ряд мутаций в кодонах 511, 516, 518 и 522, в результате которых формируется низкий уровень устойчивости к рифампицину и рифапентену, а чувствительность к рифабутину и рифалазилу сохраняется [74, 187].

Пиразинамид. Пиразинамид, также как изониазид и рифампицин, относится к ПТП первого ряда. Пиразинамид является уникальным препаратом из-за своей активности в отношении персистирующих МБТ в кислой среде, характерной для очагов туберкулезного поражения, на которые не действуют другие ПТП [130]. Это свойство пиразинамида позволило сократить срок лечения ТБ с 9-12 месяцев до 6-ти. Пиразинамид является пролекарством, активной формой которого является пиразиновая кислота

(РОА), возникающая при воздействии фермента пиразинамидазы/никотинамидазы, кодируемой микобактериальным геном *prnA* [147]. На поверхности микобактериальной клетки РОА, под действием кислой среды туберкулезного очага переходит в протонированную форму, которая, вновь проникая в микобактериальную клетку, приводит к нарушению мембранного потенциала и негативно влияет на мембранный транспорт [201].

Основным механизмом формирования у МБТ устойчивости к пиразинамиду является нарушение активности пиразинамидазы вследствие мутаций в гене *prnA*, которые выявляются у 72-97% резистентных штаммов [82, 147, 148]. Мутации в *prnA*, приводящие к резистентности, крайне полиморфны и бессистемно располагаются на всей протяженности гена. Тем не менее отмечено, что чаще мутации сосредоточены на трех участках гена: с 3 по 17 кодон, с 61 по 85 кодон и со 132 по 142 кодон [122, 148].

Этамбутол - еще один препарат первого ряда, который применяется в комбинации с изониазидом, рифампицином и пиразинамидом для профилактики возникновения ЛУ. Этамбутол обладает бактериостатическим действием на МБТ и активен только в отношении делящихся клеток. В основе механизма действия этамбутола лежит блокирование фермента арабинозилтрансферазы, кодируемого геном *embB*, что препятствует синтезу арабиногалактана в клеточной стенке [166, 170]. Мутации в гене *embB* регистрируются приблизительно у 68% устойчивых к этамбутолу штаммов, а частота мутагенеза составляет приблизительно 10^{-5} репликаций. Для устойчивых к этамбутолу штаммов, не несущих мутации в *embB*, механизм формирования резистентности до сих пор не известен и требует дополнительных исследований [201].

Аминогликозиды (стрептомицин, канамицин/амикацин/капреомицин). Стрептомицин – антибиотик класса аминогликозидов, активный против разных видов бактерий, включая МБТ. Стрептомицин активен только в отношении делящихся МБТ и не действует на покоящиеся и

внутриклеточные формы [105, 130]. Для МБТ описано две мишени воздействия стрептомицина: рибосомный белок S12, входящий в структуру 30S субъединицы рибосомы, и субъединица 16S рРНК. При действии стрептомицина на мишени становится невозможным правильное считывание информации с мРНК во время процесса трансляции, в результате чего тормозится синтез белков в клетке МБТ [90]. Устойчивость к стрептомицину возникает вследствие мутаций на уровне гена *rpsL* (кодирует белок S12) или гена *rrs* (кодирует 16S рРНК), которые встречаются у 50% и 20% штаммов МБТ, устойчивых к стрептомицину, соответственно [97, 111, 135].

Канамицин и его производное амикацин также блокируют синтез белков в бактериальной клетке, связываясь с 16S рРНК, поэтому устойчивость к этим препаратам также возникает вследствие мутаций в гене *rrs* [66, 164]. К возникновению высокого уровня резистентности к канамицину и амикацину приводит мутация в 1400 положении этого гена [66, 164].

Полипептидный антибиотик капреомицин, помимо характерной для всех аминогликозидов мишени 16S рРНК, также воздействует на метилтрансферазу рРНК, принимающую участие в процессе трансляции белков. Этот фермент кодируется геном *tlyA* и, следовательно, мутации в этом гене также могут приводить к устойчивости к капреомицину [113, 128].

Фторхинолоны синтетические антибактериальные препараты широкого спектра действия, являются одними из основных препаратов, используемых для химиотерапии больных туберкулёзом с МЛУ [58, 140]. Мишенью действия фторхинолонов является АТФ-зависимая ДНК-топоизомераза II типа (ДНК-гираза), отвечающая за суперспирализацию ДНК. В состав фермента входят две субъединицы - А и В, кодируемые, соответственно, генами *gyrA* и *gyrB* [201]. В основном мутации, приводящие к резистентности к фторхинолонам, сосредоточены в областях, обозначаемых QRDR (Quinolone region drug resistance), протяженностью 320 п.н. в *gyrA* и 375 п.н. в гене *gyrB* [167]. В 45-85% случаев, устойчивость к фторхинолонам сопряжена с мутациями в

QRDR гена *gyrA*, чаще в кодонах 90, 91 и 94 [161, 167]. Кроме того, описаны редко встречаемые мутации в кодонах 74, 83, 87, 88 *gyrA* [126, 161]. Мутация в 95 кодоне *gyrA* не приводит к развитию устойчивости к фторхинолонам и является вариантом проявления полиморфизма структуры гена [160]. Мутации на уровне *gyrB* редки и регистрируются лишь у 7% устойчивых к фотохинолонам штаммов [182].

Этионамид/протионамид. Этионамид обладает бактерицидными свойствами только против *M. tuberculosis*, *M. avium/intracellulare* и *M. leprae*. Этионамид – пролекарственная форма, которая активируется монооксигеназой EtaA/EthA, окисляющей препарат до соответствующего S-оксида, который в дальнейшем окисляется до 2-этил-4-амидопиридина [71, 91]. Мишень активной формы этионамида совпадает с мишенью изониазида (редуктаза еноил-ацилпереносящего белка InhA) и, следовательно, механизм действия этионамида также заключается в блокировании синтеза миколовой кислоты [70]. Такой же механизм активации и воздействия на МБТ характерен и для протионамида, обладающего почти такой же структурой и активностью, как и этионамид. Следовательно, мутации в гене, кодирующем фермент-активатор пролекарственной формы EtaA/EthA, а также на уровне гена, кодирующего мишень препаратов InhA, обуславливают резистентность к этионамиду и протионамиду [71, 91].

1.2.3. Основные подходы, используемые в диагностике лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*

Определение лекарственной чувствительности МБТ, выделенных от больных ТБ, является необходимой процедурой для назначения персонализированных режимов терапии и проведения эпидемиологического мониторинга [45, 58, 173]. В настоящее время существует два основных подхода к определению ЛЧ МБТ. Во-первых, фенотипические методы, суть которых состоит в культивировании микобактерий в присутствии ПТП для определения наличия роста культуры (указывает на резистентность) или его

ингибирование (свидетельствует о чувствительности). Во-вторых, генотипические методы, которые ориентированы на выявление мутаций, связанных с устойчивостью к конкретным ПТП [59, 197].

Фенотипические культуральные методы считаются "золотым стандартом" определения лекарственной чувствительности, могут проводиться на плотных и жидких питательных средах и подразделяются, в свою очередь, на прямые и непрямые. При прямом методе тестирования для проведения теста на определение лекарственной чувствительности (ТЛЧ) используется соответствующим образом предобработанный клинический образец. При непрямом – для тестирования используется культура МБТ, полученная при посеве клинического образца. Непрямой метод тестирования является наиболее валидированным и позволяет получать результат независимо от исходного числа МБТ в диагностическом материале. В настоящее время в международной практике для проведения ТЛЧ используются методы пропорций, абсолютных концентраций и коэффициента резистентности [45, 197]. Как правило, использование того или иного метода зависит от принятых в конкретной стране методологических подходов.

В РФ традиционно применяется непрямое определение лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена. Учитывая, что срок выделения МБТ после посева диагностического материала на плотных средах составляет не менее 1-1,5 месяцев, результат ТЛЧ этим методом возможно получить не ранее, чем через 2-2,5 месяца от момента получения диагностического образца [45].

Современные технологии культивирования МБТ на жидких питательных средах, такие, как ВАСТЕС MGIT, позволяют сократить время получения результата ТЛЧ в среднем до 4-12 суток после получения культуры и повысить чувствительность анализа на 10-15%, по сравнению с культивированием на ППС [153, 190].

Молекулярно-генетические методы (МГМ) определения лекарственной чувствительности позволяют определять устойчивость к основным ПТП в течение нескольких суток непосредственно из диагностического материала, выявляя целевые мутации в геноме МБТ. Эти методы представлены гибридизационными технологиями или аллель-специфичной ПЦР.

Гибридизационные МГМ основаны на связывании продуктов ПЦР со специфическими олигонуклеотидными зондами, расположенными на матрице. В качестве матрицы, в зависимости от метода, может использоваться биологический микрочип или ДНК-стрип. Вывод о наличии устойчивости к препарату делается по результатам гибридизации [59].

В качестве примера гибридизационных МГМ, использующих в качестве матрицы биочип, можно привести отечественную разработку компании "Биочип" (ИМБ РАН), представленную тест-системами "ТБ-БИОЧИП-1" и "ТБ-БИОЧИП-2". "ТБ-БИОЧИП-1" позволяет определять генотипическую устойчивость к рифампицину, за счет выявления 27 точечных мутаций в гене *rpoB*, и изониазиду, выявляя мутации в генах *katG* (11 мутаций), *inhA* (5 мутаций) и *ahpC* (5 мутаций). Специфичность метода при установлении устойчивости к рифампицину составляет 95%, к изониазиду – более 80%, чувствительность – не менее 500 геном-эквивалентов [48]. «ТБ-БИОЧИП-2» позволяет определять устойчивость к фторхинолонам по наличию 10 вариантов точечных мутаций в гене *gyrA*, и специфичность набора оставляет не менее 80% [2, 49].

В наборах GenoType MTBDRplus и GenoType MTBDRsl производства Hain Lifescience (Германия), в качестве гибридизационной матрицы использован ДНК-стрип. GenoType MTBDRplus применяется для определения ЛУ к рифампицину и изониазиду (специфичность 98% и 92%, соответственно), а GenoType MTBDRsl – для определения ЛУ к фторхинолонам, этамбутолу и аминогликозидам/циклическим пептидам (специфичность более 81%) [77, 165, 192, 194].

К тест-системам, основанным на аллель-специфичной ПЦР, относится GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, США), рекомендованный экспертами ВОЗ для стран с высоким бременем туберкулеза. Данный тест применяется для выявления в диагностическом материале ДНК МБТ и определения устойчивости возбудителя к рифампицину, используя молекулярные зонды, перекрывающие всю целевую поверхность *rpoB* [195]. Результаты анализа возможно получить в течение нескольких часов от момента поступления диагностического материала, а применение закрытого картриджа для всех этапов анализа полностью исключает риск контаминации образца. Однако, возможности применения GeneXpert MTB/RIF ограничены мониторингом только рифампицин-резистентных штаммов МБТ.

Отечественной разработкой, основанной на аллель-специфичной ПЦР, является тест-система «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО Синтол), использующая мультиконкурентную аллель-специфичную ПЦР в режиме реального времени. Данная тест-система позволяет выявлять наиболее распространенные точечные мутации в генах *rpoB* (11 вариантов), *katG* (3 варианта) и *inhA* (1 вариант), приводящие к устойчивости к рифампицину и изониазиду. Результаты определения устойчивости МБТ к двум препаратам, полученные с использованием «Амплитуб-МЛУ-РВ», в 94% случаев совпадают с данными культуральной диагностики [34].

Важно отметить, что на данном этапе развития технологий, определение устойчивости МБТ молекулярно-генетическими методами является лишь первой стадией обследования, позволяя быстро и достоверно определять устойчивость к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, что позволяет отделять поток больных с МЛУ/ШЛУ ТБ на этапе поступления в стационар. Для развернутого определения лекарственной чувствительности необходимо применение культуральных методов [59].

1.3. Молекулярная эпидемиология *M.tuberculosis*

1.3.1. Молекулярное типирование штаммов микобактерий туберкулёзного комплекса

В основу молекулярного типирования микобактерий легло выявление индивидуальных особенностей нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов, что позволило формировать группы МБТ, объединенные на базе филогении. Впервые молекулярно-генетические методы впервые были применены в начале 90-х годов прошлого века и предназначались для изучения эпидемиологии МБТ. Одной из первых работ в этой области было расследование вспышки туберкулезной инфекции в Нью-Йорке (США) [95]. До этого для обнаружения индивидуальных особенностей между клиническими изолятами микобактерий использовались классические методы, которые заключались в описании морфологии колоний, скорости роста, выявлению чувствительности к определенному спектру антибиотиков. Классические методы имели низкую чувствительность, что значительно сказывалось на возможности использования их при изучении и эпидемиологической оценке туберкулеза [102, 171].

В настоящее время технологии генотипирования и внутривидового дифференцирования микобактерий на уровне хромосомной ДНК приобретают широкое применение [5, 54, 177]. Это связано с накоплением данных о специфичности белков, нуклеиновых кислот среди возбудителей туберкулеза [84, 102]. Огромный вклад внесло открытие вставочных элементов, особенно IS6110, что позволило осуществить дифференциацию штаммов внутри вида с последующим изучением их полиморфизма [54, 177]. Основными методами, применяемыми для генотипирования МБТ, являются ПДРФ-IS6110 типирование, спוליготипирование и MIRU-VNTR типирование [129, 158, 176].

1.3.1.1. Генотипирование по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов, содержащих IS6110

В 1993 году J.D. van Embden et al. предложил метод генотипирования *M.tuberculosis* по IS6110 методом гибридизации по Саузерну. Метод основан на определении количества копий IS6110 *M.tuberculosis*. Этот генетический элемент имеется только у МБТ, включает около 1350 п.н., является членом IS3 семейства. При этом число копий IS6110 у разных штаммов может варьировать от 1 до 26 копий на геном.

Метод заключается в обработке рестриктазой PvuII геномной ДНК *M.tuberculosis*, в результате чего она разделяется на фрагменты, число и длина которых зависит от количества и локализации копий IS6110. Далее фрагменты ДНК разделяют электрофорезом в агарозном геле и переносят на мембрану, которую затем гибридизуют с мечеными пероксидазой ДНК-зондами, комплементарными IS6110 (гибридизация по Саузерну). В результате для каждого штамма получали индивидуальный набор фрагментов рестрикции. Метод типирования по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов, содержащих IS6110 (ПДРФ-IS6110) в связи с высокой дискриминирующей способностью ($D > 0,999$) является "золотым" стандартом генотипирования МБТ [176].

Недостатком метода является его сложность в исполнении, трудоемкость и продолжительность. Для проведения исследования требуется большое количество бактериальной массы. В случае, если в ДНК штамма содержится менее шести копий IS6110, разрешающая способность метода существенно снижается [69, 85, 89, 101, 115, 117, 119, 143].

1.3.1.2. Генотипирование микобактерий туберкулезного комплекса по локусу прямых повторов (сполиготипирование)

Сполиготипирование (от англ. Spacer oligonucleotide typing = spoligotyping) – метод типирования, основанный на определении

полиморфизма области "прямых повторов" (DR) ДНК, которая уникальна для микобактерий туберкулезного комплекса. Этот локус был впервые описан Hermans et al., который секвенировал этот регион у *Mycobacterium bovis* BCG [108]. Область прямых повторов состоит из повторяющихся последовательностей длиной 36 пар оснований, между которыми вставлены короткие уникальные последовательности ДНК (спейсоры), длиной 35 - 41 пар оснований каждый. Существует предположение, что область прямых повторов является примером системы CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), которая определяет устойчивость бактерий к некоторым фагам [109].

Для анализа штаммов в основном варианте сполиготипирования, обычно используются 43 уникальных участка, находящихся в области прямых повторов [117, 158]. Считается, что 37 из них являются характерными для *M.tuberculosis*, а еще 6 дополнительно характеризуют штамм *M.bovis* BCG.

Методика проведения сполиготипирования основана на амплификации DR-региона с использованием праймеров, гомологичных прямым повторам, и гибридизации амплифицированных фрагментов с иммобилизованными на мембране олигонуклеотидами, гомологичными уникальным последовательностям (спейсорам). При этом полиморфизм в регионе прямых повторов зависит от возникновения точечных мутаций, образования мутаций, связанных с элементом IS6110, межмолекулярного смещения цепей ДНК во время репликации, гомологичных рекомбинаций между повторяющимися элементами, приводящими к делециям прямых повторов [145, 183].

Для оценки сполиготипа микобактерий туберкулёзного комплекса существуют электронные международные базы данных: SITVIT/SpolDB4 (http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/bd_myco.html), MIRU-VNTRplus (<http://www.miru-vntrplus.org>), TB-Insight (<http://tbinsight.cs.rpi.edu>), которые включают данные для нескольких тысяч штаммов [75, 150, 185, 186].

Метод сполиготипирования основан на ПЦР, что делает его более простым в плане выполнения исследования по сравнению с ПДРФ-IS6110. Благодаря тому, что результаты сполиготипирования стандартизованы и поддаются оцифровке, можно легко проводить межлабораторное сравнение полученных результатов [67, 103]. Сполиготипирование, несмотря на его относительно низкую разрешающую способность, хорошо подходит для первоначального анализа популяционной структуры *M.tuberculosis* и определения основных генетических групп; для проспективных молекулярно-генетических исследований оно применимо лишь в сочетании с другими методами. Поскольку в формировании полиморфизма в области прямых повторов превалируют делеционные события, то в штаммах *M.tuberculosis*, относящихся к разным группам, может наблюдаться образование сходных сполигопаттернов [69, 174].

1.3.1.3. Генотипирование штаммов микобактерий туберкулезного комплекса методом MIRU-VNTR

MIRU-VNTR-типирование основано на определении числа tandemных повторов в независимых локусах, рассредоточенных по всей хромосоме МБТ, названных микобактериальными рассеянными повторяющимися единицами (MIRU) [163]. При проведении MIRU-VNTR-типирования в зависимости от принятой в конкретной лаборатории методики амплифицируется от 5 до 24 локусов и в зависимости от размера полученного продукта делается вывод о числе tandemных повторов в каждом локусе. Размер ампликона можно оценить как с использованием электрофореза [67, 116, 129], так и с применением автоматизированных анализаторов [137, 162]. На основании числа tandemных повторов в каждом из анализируемых локусов проводится кластеризация микобактериальных штаммов [154, 156, 157].

Основными преимуществами метода MIRU-VNTR являются то, что для проведения анализа не требуется большого количества ДНК, а

представленные в виде цифрового кода результаты могут быть легко сопоставлены между лабораториями. В качестве недостатков метода можно назвать отсутствие стандартизованного набора анализируемых локусов и условий проведения анализа [163].

1.3.2. Молекулярно-эпидемиологические особенности популяции штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих в РФ

На основании полиморфизма ДНК штаммы МБТ разделяются более чем на 20 групп и подгрупп [46, 75, 110]. Большое внимание уделяется штаммам МБТ пекинской (Beijing) группы. Считается, что штаммы группы Beijing обладают повышенной вирулентностью, часто характеризуются лекарственной устойчивостью, способны быстро размножаться в человеческих макрофагах [1, 36, 46, 64, 65, 86, 120, 124, 131, 172, 198]. МБТ этого кластера имеют высокий уровень трансмиссивности и большую вариабельность генов репликации, репарации и рекомбинации, что может обеспечивать их лучшую адаптацию к изменениям окружающей среды посредством механизмов селекции второго порядка [78, 136, 142, 181]. Высокая трансмиссивность данного генотипа показана, в частности, в популяционном исследовании МБТ в Западно-Капской провинции в Южной Африке, куда группа штаммов Beijing была занесена примерно 400 лет назад, и на данный момент времени составляет примерно треть от всех циркулирующих штаммов [72, 178].

Генотип Beijing включает две крупные филогенетические линии («древние» и «современные» штаммы), которые различаются по структуре локусов NTF, IS6110, IS1547 и Rv3135-PPE и особенностям развития лекарственной устойчивости. Мутации в *rpoB531*, *katG315* и *embB306*, приводящие к резистентности к рифампицину, изониазиду и этамбутолу, наиболее часто встречаются у штаммов генотипа Beijing в сравнении со штаммами других генотипов. [32].

Современная популяция *M.tuberculosis* генотипа Beijing в России характеризуется своей генетической неоднородностью и сформировалась

благодаря массовым миграциям населения. Впервые этот генотип был выявлен у штаммов, выделенных в 1992–1994 годах в Пекинском регионе Китая, что и объясняет его название [179]. Считается, что генотип Beijing возник на территории северного Китая более 2000 лет назад и проник в другие регионы мира из Юго-Восточной Азии [32].

Согласно другой гипотезе, распространение штаммов Beijing по территории России и других стран бывшего СССР в XX веке носило «взрывной» характер, первоначально распространившись среди русских строителей Китайско-Восточной железной дороги, а затем в лагерях ГУЛАГа и гражданском обществе СССР [50, 53].

Штаммы генотипа Beijing в России вносят существенный вклад в эпидемию туберкулеза (в том числе с МЛУ) [51, 65, 73].

Так при генотипировании МБТ в Саратовской области было выявлено, что на данной территории преимущественно циркулируют *M.tuberculosis* групп Beijing и Beijing-Like – 50%, которые обладали высокой степенью лекарственной устойчивости, что явилось сигналом для проведения мероприятий, направленных на предотвращение распространения МЛУ штаммов [35].

При изучении микобактерий, вызывающих остро прогрессирующий распространенный деструктивный туберкулез легких у больных на территории Томской области, было показано, что штаммы семейства Beijing составляли 27% от общей популяции возбудителя и в 19% проявляли множественную лекарственную устойчивость [12].

На территории Псковской области популяция возбудителя туберкулеза в 44,4% случаев была представлена штаммами генотипа Beijing, среди которых преобладали типы M2 и M1, обладающие множественной лекарственной устойчивостью (92,4 и 81,8%, соответственно) [13].

В Уральском регионе штаммы группы Beijing также занимали ведущее место (54,3 - 55,1%) и в большинстве случаев характеризовались МЛУ [57, 118].

Многие исследования показывают, что на территории постсоветского пространства также циркулируют в основном штаммы Beijing: в Республике Киргизстан – 71,5%, в Республике Казахстан – 85%, в Республике Беларусь – 43% [8, 14, 19, 20].

При этом есть предпосылки к высокому риску глобальной диссеминации штаммов группы Beijing в направлении Западной Европы и Северной Америки благодаря миграции населения [33]. Так, в исследовании Европейских ученых было показано, что 50% всех МЛУ штаммов МБТ представлены генотипом «Beijing», причем основным источником этих штаммов были иммигранты из стран бывшего СССР [92].

Также достаточно часто на территории РФ и странах постсоветского пространства встречаются МБТ генотипов LAM (от англ. Latin American and Mediterranean, латино-американско-средиземноморское семейство) и Haarlem. Частота встречаемости данных генетических семейств варьируют в зависимости от региона. Так, встречаемость МБТ группы LAM в Псковской области составляет 21,1%, в Уральском регионе – 12,9%, Республике Киргизстан – 8,7%, Республике Беларусь – 10,8% [8, 13, 20, 57, 118]. МБТ группы Haarlem в Саратовской области встречались в 27,5% случаев, в Псковской области – 11,1%, В Уральском регионе – 7,9%, Республике Киргизстан – Haarlem – 10,4% [13, 20, 35, 57, 118].

Отдельного упоминания заслуживает характерная для территории РФ группа штаммов МБТ Ural (сублиния генотипа Haarlem), которая была впервые описана при исследовании популяции штаммов МБТ в Уральском регионе в 2001-2002 гг. [75, 118]. Встречаемость штаммов этой группы в Уральском регионе составляет 11,8 – 15,2% [57, 118]. Позднее штаммы МБТ этой группы были выявлены и в других регионах страны, например, в Псковской области, составляя 5,6% от всех МБТ, циркулирующих в регионе [13].

Таким образом, согласно литературным данным, на территории РФ наиболее распространены штаммы группы Beijing, которые часто обладают МЛУ и характеризуются высокими адаптационными свойствами, в том числе

за счет угнетения иммунного ответа хозяина [100, 125, 179]. Согласно этому можно предположить, что данная группа МБТ может иметь большое значение в развитии заболевания у ВИЧ-позитивных пациентов. Однако, литературные данные в отношении характеристики штаммов, полученных от пациентов с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ очень скудны.

По данным ЮНЭЙДС ТБ остается основной причиной смерти среди людей, живущих с ВИЧ [18], а заболеваемость пациентов с ВИЧ резистентными формами ТБ характеризуется более высокими показателями смертности и более короткой продолжительностью жизни [81, 98, 127, 133, 184]. Обобщая представленную в литературном обзоре информацию, можно заключить, что ВИЧ-ассоциированный туберкулез имеет большое значение для здравоохранения РФ, а эпидемиологические показатели по сочетанной патологии ВИЧ/ТБ в Свердловской области являются наиболее неблагоприятными по стране. Особенности клинического течения туберкулеза у ВИЧ-инфицированных пациентов охарактеризованы достаточно полно, однако недостаточно внимания уделено характеристике биологических свойств МБТ у данной категории больных, что подчеркивает актуальность диссертационного исследования, посвященного изучению биологических свойств и эпидемиологической значимости возбудителя туберкулеза при сочетанной ВИЧ/ТБ - инфекции.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *M.tuberculosis*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ВИЧ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ И ВИЧ-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ (ПО СКОРОСТИ И МАССИВНОСТИ РОСТА)

При изучении скорости начала роста культур МБТ после инокуляции диагностического материала, выделенного до начала противотуберкулезной терапии, было показано, что видимый рост культуры на ППС регистрировался в срок от 14 до 82 дней (таблица 4). В обеих группах большинство штаммов демонстрировало видимый рост в срок от 3 до 8 недели (151/165, 91,52% штаммов группы I и 156/166, 93,98% штаммов группы II). По времени появления видимого роста на среде после инокуляции диагностического материала достоверного отличия между группами не выявлено.

Таблица 4 - Время начала роста культур МБТ после посева диагностического материала

Недели	Дни	Число культур			
		Группа I: ТБ + ВИЧ		Группа II: ТБ ВИЧ-отр.	
		по дням	по неделям	по дням	по неделям
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	1-7	-	-	-	-
2	8-13	-	2	-	-
	14	2		-	
3	15	1	13	2	25
	19	2		7	
	20	6		8	
	21	4		8	
4	22	10	51	19	52
	25	-		1	
	26	10		6	
	27	18		15	
	28	13		11	

Продолжение таблицы 4

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
5	29	12	36	6	37
	30	-		1	
	31	-		1	
	33	11		7	
	34	9		12	
	35	4		10	
6	36	7	22	5	13
	39	1			
	40	5		3	
	41	6		3	
	42	3		2	
7	43	3	20	7	16
	44	-		1	
	47	6		1	
	48	3		3	
	49	8		4	
8	50	2	9	4	13
	52	-		2	
	54	5		4	
	55	-		2	
	56	2		1	
9	57	2	7	1	6
	58	1		-	
	60	-		1	
	61	1		1	
	62	1		2	
	63	2		1	
10	64	-	3	2	3
	68	1		-	
	69	1		-	
	70	1		1	
11	71	-	-	1	1
12	82	2	2	-	-
Всего		165		166	

Оценка массивности бактериовыделения больных ТБ с различным ВИЧ-статусом представлена в таблице 5. Как видно из таблицы, приблизительно у половины больных в обеих группах наблюдалось скудное бактериовыделение (82/165, 49,70% и 86/165, 51,81%, соответственно по группам), чуть реже регистрировалось обильное бактериовыделение (52/165, 31,52% и 59/166, 35,54%, соответственно по группам). У остальных больных

бактериовыделение оценивалось как умеренное. Достоверных отличий между группами по массивности бактериовыделения выявлено не было.

Таблица 5 – Массивность бактериовыделения у больных ТБ с различным ВИЧ-статусом по данным культурального исследования

Группа	Число больных	Массивность бактериовыделения по данным культурального исследования		
		до 20 КОЕ Скудное	20-100 КОЕ Умеренное	> 100 КОЕ Обильное
I (ТБ + ВИЧ)	абс	82	31	52
	%	49,70	18,79	31,52
II (ТБ ВИЧ-отр.)	абс	86	21	59
	%	51,81	12,65	35,54
Всего	абс	168	52	111
	%	50,76	15,71	33,53
Р (I-II)		>0,05	>0,05	>0,05

Для оценки жизнеспособности культур были сопоставлены данные скорости и массивности роста (таблица 6). Показано, что в обеих группах преобладали МБТ со средним и высоким уровнем жизнеспособности (98/165, 59,39% - группа I и 103/166, 62,05% - группа II), достоверных отличий по этому параметру между группами получено не было.

Таблица 6 – Жизнеспособность культур МБТ на основании культурального исследования

Группа	Число штаммов	Жизнеспособность		
		Низкая	Средняя	Высокая
1 (ТБ + ВИЧ)	абс	67	58	40
	%	40,61	35,15	24,24
2 (ТБ ВИЧ-отр.)	абс	63	55	48
	%	37,95	33,13	28,92
Всего	абс	130	113	88
	%	39,27	34,14	26,59
Р (I-II)		>0,05	>0,05	>0,05

Таким образом, при анализе роста МБТ при посеве диагностического материала на среду Левенштейна-Йенсена не было получено достоверных отличий между группами по скорости и массивности роста культуры, а также по оцененной на основе этих параметров жизнеспособности штаммов.

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *M.tuberculosis* У ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ВИЧ/ТБ

Исследование фенотипической лекарственной чувствительности МБТ осуществляли с применением метода абсолютных концентраций согласно Приказа №109 МЗ РФ от 21.03.2003 г. [45]. Исследовали чувствительность к рифампицину (40мкг/мл), изониазиду (1 мкг/мл), стрептомицину (10 мкг/мл), этамбутолу (2 мкг/мл), офлоксацину (10 мкг/мл), канамицину (30 мкг/мл), протионамиду (30 мкг/мл).

При оценке первичной лекарственной чувствительности МБТ, выделенных от впервые выявленных больных ВИЧ/ТБ (группа I), в сравнении с контрольной группой ВИЧ-отрицательных больных туберкулезом (группа II) было показано, что 52/165 (32%) штаммов МБТ группы I и 84/166 (51%) штаммов МБТ группы II были чувствительны ко всем использованным при определении ЛЧ ПТП. Соответственно, 113/165 (68%) штаммов МБТ группы I и 82/166 (49%) штаммов МБТ группы II были устойчивы хотя бы к одному ПТП.

Таким образом, от больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ, достоверно реже выделяли чувствительные штаммы МБТ.

При анализе лекарственной устойчивости МБТ по каждому препарату было показано, что из 165 штаммов группы I 85 (51,52%) были устойчивы к рифампицину, 102 (61,82%) – к изониазиду, 77 (46,67%) – к стрептомицину, 25 (15,15%) – к этамбутолу, 12 (7,27%) – к офлоксацину и 14 (8,48%) – к канамицину. Из 166 штаммов группы II 54 (32,53%) были устойчивы к рифампицину, 76 (45,78%) – к изониазиду, 57 (34,34%) – к стрептомицину, 12 (7,23%) – к этамбутолу, 13 (7,83%) – к офлоксацину и 11 (6,63%) – к канамицину. В обеих группах не было выявлено ни одного штамма МБТ, устойчивого к протионамиду (таблица 7).

Таблица 7 – Фенотипическая устойчивость МБТ к основным ПТП 1 и 2 ряда

Препарат	Число устойчивых штаммов из				Р (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	0,030
этамбутол	25	15,15	12	7,23	0,035
офлоксацин	12	7,27	13	7,83	>0,05
канамицин	14	8,48	11	6,63	>0,05
протионамид	нет		нет		-

Из полученных результатов следует, что 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%, $p < 0,05$) (рисунок 2).

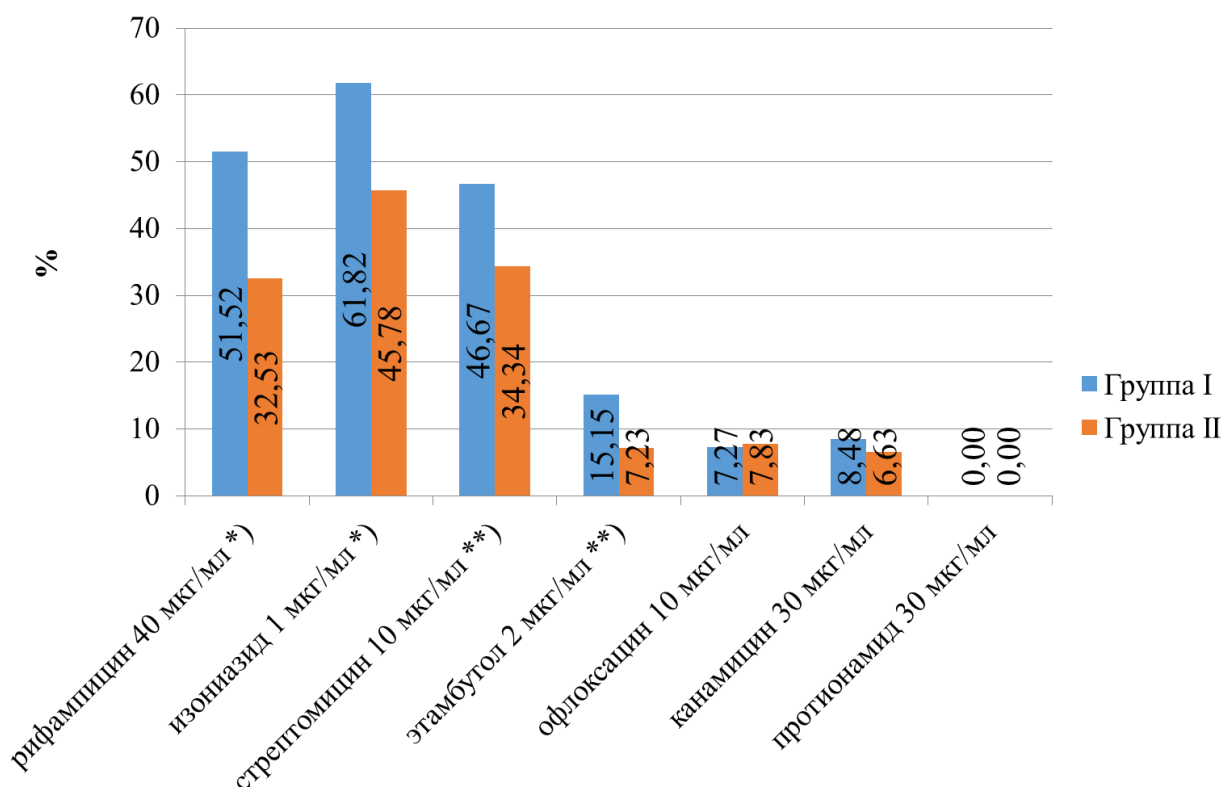


Рисунок 2 – Фенотипическая устойчивость МБТ двух групп по каждому препарату

Примечание:*) $p(I-II) < 0,01$

**) $p(I-II) < 0,05$

При анализе спектров резистентности изучаемых штаммов было показано, что 113 штаммов группы I и 82 штамма группы II были устойчивы к различным комбинациям ПТП 1 и 2 ряда, включавшим от 1 до 6 препаратов (таблица 8).

Как видно из таблицы 8, в группе I устойчивость к одному препарату была выявлена у 17/113 (15,04%) штаммов, 6 из которых были устойчивы к изониазиду и 8 – к стрептомицину. Реже среди моноустойчивых штаммов наблюдалась устойчивость к рифампицину (2/17) и офлоксацину (1/17).

31/113 (27,43%) штаммов группы I были устойчивы к двум препаратам, одним из которых во всех случаях был изониазид. Чаше встречалась одновременная устойчивость к HR (22/31), реже – к HS (9/31).

Устойчивость к трем препаратам была выявлена у 34/113 (30,09%) штаммов группы I и преимущественно была представлена сочетанием HRS (28/34), в единичных случаях наблюдалась одновременная устойчивость к HSE (2/34), HEKm (1/34) и HROfx (3/34).

Таблица 8 – 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)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
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
	HEKm	1	0,88	0	0,00	>0,05
	HRS*	28	24,78	16	19,51	>0,05
	HRKm*	0	0,00	1	1,22	>0,05
	HROfx*	3	2,65	0	0,00	>0,05
4	HEOfxKm	1	0,88	0	0,00	>0,05
	HRSE*	13	11,50	5	6,10	>0,05
	HRSKm*	5	4,42	3	3,66	>0,05
	HRSOfx*	3	2,65	8	9,76	>0,05

Продолжение таблицы 8

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
5	RSEOfxKm	0	0,00	1	1,22	>0,05
	HRSEKm*	5	4,42	2	2,44	>0,05
	HRSEOfx*	2	1,77	1	1,22	>0,05
	HRSEOfxKm**	1	0,88	1	1,22	>0,05
6	HRSEOfxKm**	1	0,88	2	2,44	>0,05

Примечание: * спектр резистентности соответствует МЛУ

** спектр резистентности соответствует ШЛУ

Устойчивость к четырем препаратам была выявлена у 22/113 (19,47%) штаммов МБТ группы I. Из них чаще всего наблюдалась одновременная устойчивость ко всем использованным для определения ЛЧ препаратам 1 ряда – HRSE (13/22). Одновременная устойчивость к HRS в комбинации с Km встречалась в 5/22 случаев, а в комбинации с Ofx – в 3/22 случаев. Один штамм был устойчив одновременно к HEOfxKm.

К пяти препаратам было устойчиво 8 штаммов группы I (8/113, 7,07%), причем все они имели одновременную устойчивость к HRS, которая в 5/8 случаях сочеталась с устойчивостью к EKm, в 2-х - с EOfx и одним - с OfxKm.

У одного штамма группы I была выявлена одновременная устойчивость к шести препаратам: HRSEOfxKm.

Среди резистентных МБТ группы II устойчивость к 1 препарату отмечалась у 14/82 (17,07%) штаммов. Наиболее часто это была моноустойчивость к изониазиду (9/14), реже – к стрептомицину (4/14), в одном случае – к рифампицину.

Как правило, наблюдалась устойчивость одновременно к двум препаратам, которая встречалась у 27/82 (32,93%) штаммов, в равном соотношении проставленная спектром HS (13/27) и HR (13/27) и, в одном случае, HKm.

Устойчивость одновременно к трем препаратам была выявлена у 18/82 (21,95%) штаммов и, в основном, была представлена сочетанием HRS (16/18). По одному разу встречалась устойчивость к HSE и HRKm.

К четырем препаратам было устойчиво 16/82 (19,51%) резистентных штаммов группы II. Во всех случаях наблюдалась одновременная устойчивость к HRS, которая у 5/16 штаммов сочеталась с E, у 3/16 – к Km, у 8/16 – к Ofx.

Устойчивость к пяти препаратам была выявлена у 5/82 (6,10%) резистентных штаммов группы II, которая в 4 случаях была представлена одновременной устойчивостью к HRS, в двух случаях сочетавшейся с устойчивостью к EKm, и, по одному разу к EOfx и OfxKm. Один из штаммов, устойчивых к пяти ПТП, имел спектр резистентности RSEOfxKm.

Два (2,44%) из резистентных штаммов группы II было устойчиво к 6-ти препаратам – HRSEOfxKm.

Таким образом, в группе I среди устойчивых штаммов более чем в половине случаев встречались МБТ, устойчивые к 2 или 3 ПТП (27,43% и 30,09%, соответственно), одним из которых всегда был изониазид, реже встречалась моноустойчивость (15,04%) и устойчивость к 4 ПТП (19,47%), устойчивость к 5 и 6 ПТП была наиболее редкой и регистрировалась, соответственно, у 8/113 (7,07%) и 1/113 (0,88%) штаммов (рисунок 3).

У резистентных штаммов МБТ группы II преобладала устойчивость к двум ПТП (27/82 (32,93%)). Устойчивость к трем ПТП встречалась несколько реже, чем в группе I, но это отличие не было достоверным (18/82 (21,95%)). Устойчивость к одному и четырем препаратам встречалась приблизительно с одинаковой частотой (14/82 (17,07%) и 16/82 (19,51%), соответственно). Штаммы с устойчивостью к 5-ти и 6-ти препаратам были так же редки, как и в группе I (5/82 (6,10%) и 2/82 (2,44%)) (рисунок 3).

В целом, по спектрам резистентности к ПТП достоверных отличий между группами не выявлено (таблица 8, рисунок 3).

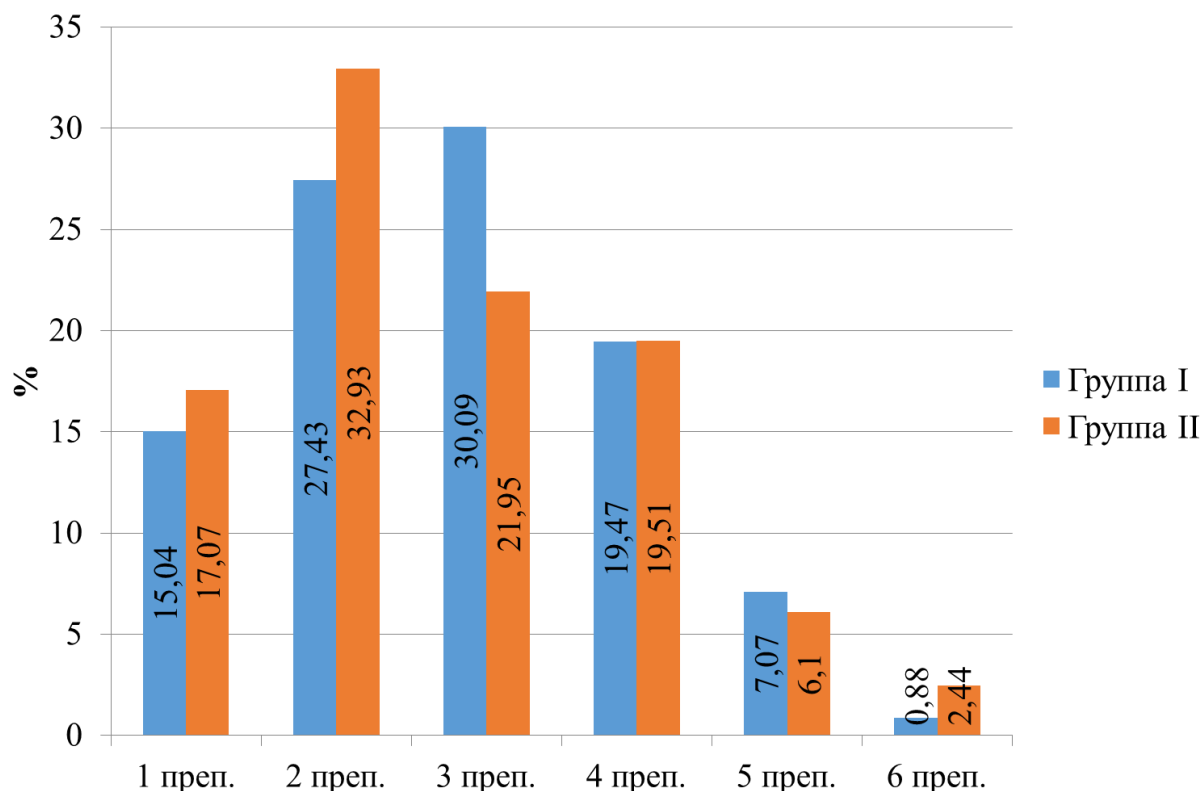


Рисунок 3 – Устойчивость к различному числу препаратов резистентных штаммов МБТ группы I (n=113) и группы II (n=83)

На основе определения фенотипической ЛЧ изучаемых штаммов МБТ, по характеру лекарственной чувствительности можно было выделить следующие группы: чувствительные штаммы, монорезистентные штаммы, полирезистентные штаммы (штаммы, устойчивые к одному или нескольким ПТП, но не одновременно к изониазиду и рифампицину) и штаммы с МЛУ (штаммы, устойчивые одновременно к изониазиду и рифампицину) (таблица 9).

Таблица 9 – Характер фенотипической лекарственной чувствительности МБТ

Характер лекарственной чувствительности	Число штаммов				Р (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	

Как было описано выше, в группе II число чувствительных штаммов было достоверно выше, чем в группе I.

Число монорезистентных штаммов в обеих группах составляло 17/165 (10,30%) и 14/166 (8,43%), соответственно по группам, и их встречаемость достоверно не отличалась между группами.

Приблизительно с такой же частотой в обеих группах встречались полирезистентные штаммы: 13/165 (7,88%) в группе I и 16/165 (9,64%) в группе II, спектр резистентности которых включал от 2 до 5 препаратов. В группе I 9/13 полирезистентных штаммов было устойчиво к 2 ПТП (во всех случаях HS), 3/13 – к трем ПТП (2 HSE и 1 HEKm) и один штамм – к четырем ПТП (HEOfxKm).

В группе II 14/16 полирезистентных штаммов было устойчиво к двум ПТП (HS – 13 штаммов и HKm – 1 штамм), один штамм был устойчив к трем ПТП (HSE) и один – к 5-ти ПТП (RSEOfxKm).

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%). Устойчивость только к HR среди штаммов с МЛУ группы I определялась у 22/83 (26,51%) штаммов, в комбинации только с ПТП 1 ряда – у 41/83 (49,39%) штаммов (из них 28 HR+S и 13 HR+SE), в комбинации с ПТП 2 ряда – у 3/83 (3,61%) штаммов (во всех случаях HR+Ofx), в комбинации с ПТП 1 и 2 ряда – у 17/83 (20,48%) штаммов (из них HR+2 ПТП – 8 штаммов, HR+3 ПТП – 8 штаммов и HR+4 ПТП – 1 штамм).

Среди МЛУ штаммов группы II устойчивость только к HR была выявлена у 13/52 (25,00%) штаммов, 21 (40,38%) МЛУ штамм был устойчив, помимо HR, к ПТП 1 ряда (16/21 – к S и 5/21 – к SE), один штамм (1,92%) был устойчив к HR в сочетании с ПТП 2 ряда (HR+Km) и 17/52 (32,69%) – к HR в сочетании с ПТП 1 и 2 ряда (11/17 штаммов – HR+2 ПТП, 4/17 – HR+3 ПТП и 2/17 – HR+4 ПТП).

Представлялось интересным оценить особенности структуры МЛУ у штаммов МБТ двух изучаемых групп. Для этого все штаммы с МЛУ были

определены как собственно МЛУ, т.е. устойчивые одновременно как минимум к изониазиду и рифампицину, но при этом в спектр резистентности не были включены препараты, являющиеся определяющими для ШЛУ – офлоксацин и канамицин. Штаммы, устойчивые помимо Н и R к одному из препаратов, определяющих ШЛУ, были выделены в группу пре-ШЛУ. К собственно ШЛУ МБТ были отнесены штаммы, одновременно устойчивые как минимум к изониазиду, рифампицину, канамицину и офлоксацину (таблица 10).

Таблица 10 - Структура фенотипической М/ШЛУ у МБТ двух изучаемых групп

МЛУ	Группа I (ТБ+ВИЧ)		Группа II (ТБ ВИЧ-отр)		Р (I-II)
	абс.	%	абс.	%	
только к HR или в комбинации с ПТП, кроме Km и Ofx	63	75,90	34	65,38	>0,05
в комбинации с Km (пре-ШЛУ (Km))	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 Km и Ofx (ШЛУ)	2	2,41	3	5,77	>0,05
Всего	83	100	52	100	>0,05

Как видно из таблицы 10, в обеих группах среди МБТ с МЛУ преобладали штаммы, устойчивые одновременно к изониазиду и рифампицину, в комбинации с другими препаратами, кроме офлоксацина и канамицина: 63/83 (75,90%) в группе I и 34/52 (65,38%) в группе II. Реже встречались штаммы с пре-ШЛУ – 18/83 (21,69%) в группе I и 15/52 (28,85%) в группе II. Штаммы с ШЛУ были наиболее редкими – 2/83 (2,41%) в группе I и 3/52 (5,77%) в группе II. Достоверных отличий по структуре МЛУ между штаммами МБТ двух групп выявлено не было.

Таким образом, при анализе фенотипической лекарственной резистентности методом абсолютных концентраций 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.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМ ПРЕПАРАТАМ *M.tuberculosis*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С СОЧЕТАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ВИЧ/ТБ

Молекулярно-генетические особенности устойчивости МБТ к ПТП изучали по спектру мутаций в генах МБТ, связанных с резистентностью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам. Для определения мутаций использовали наборы "ТБ-БИОЧИП-1" и "ТБ-БИОЧИП-2" (БИОЧИП-ИМБ, Россия). Определение спектра точечных мутаций осуществлялось согласно инструкции фирмы производителя биологических микрочипов.

4.1. Спектр мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, у штаммов *M.tuberculosis* группы I

При исследовании МБТ, выделенных от больных ТБ легких, ассоциированным с ВИЧ в стадии СПИД (группа I), было показано, что мутации в гене *rpoB* были выявлены у 87/165 (52,73%) МБТ, как правило в виде единичных ОНП (85/87, 97,7%), в двух случаях были выявлены сочетанные мутации, затрагивающие два кодона анализируемого региона гена. В целом, с учетом сочетанных мутаций, число мутантных сайтов *rpoB* в группе составило 89. Всего было выявлено 13 вариантов точечных мутаций, затрагивающих 5 кодонов *rpoB*: по одному варианту ОНП было выявлено в кодонах 511 (Leu→Arg) и 533 (Leu→Pro), два варианта – в кодоне 516 (Asp→Tyr и Asp→Val), три – в кодоне 531 (Ser→Cys, Ser→Leu, Ser→Trp); в 526 кодоне было выявлено 6 вариантов ОНП (His→Arg, His→Asn, His→Asp, His→Cys, His→Leu, His→Tyr) (таблица 11).

Как следует из таблицы 11, реже всего (менее, чем у 3% штаммов анализируемой выборки) встречались мутации в 511 и 533 кодонах *rpoB*, причем единственный случай мутации в 511 кодоне (Leu→Arg) встречался только в сочетании с мутацией в 516 кодоне (Asp→Tyr). Чаше

регистрировались мутации в кодонах 516 (5/87, 5,75%, включая один штамм, несущий данный мутантный вариант в сочетании с ОНП в других кодонах гена) и 526 (8/87, 9,20%, включая один штамм, несущий данный мутантный вариант в сочетании с ОНП в других кодонах гена). Наибольшее число мутаций в *groB* у штаммов МБТ группы I было выявлено в 531 кодоне (73/87, 83,91%). Из трех вариантов ОНП, выявленных в данном кодоне, доминирующей была мутация, ведущая к замене Ser→Leu, которая встречалась у 71/87 штаммов (81,61%) и составляла 97,26% от числа мутантных вариантов 531 кодона *groB*.

Таблица 11 – Мутации в гене *groB* у штаммов МБТ группы I

Кодон	Аминокислотная замена	Число мутантных сайтов (единичный ОНП/в сочетании с другим ОНП данного гена)	% штаммов МБТ с данным мутантным сайтом (из 87-ми)
511	Leu→Arg	1 (0/1)	1,15
516	Asp→Tyr	4 (3/1)	4,60
	Asp→Val	1 (1/0)	1,15
526	His→Arg	1 (1/0)	1,15
	His→Asn	3 (2/1)	3,45
	His→Asp	1 (1/0)	1,15
	His→Cys	1 (1/0)	1,15
	His→Leu	1 (1/0)	1,15
	His→Tyr	1 (1/0)	1,15
531	Ser→Cys	1 (1/0)	1,15
	Ser→Leu	71 (71/0)	81,61
	Ser→Trp	1 (1/0)	1,15
533	Leu→Pro	2 (1/1)	2,30

При анализе ОНП в генах, связанных с устойчивостью к изониазиду, было показано, что у 106/165 (64,24%) штаммов группы I были детектированы мутации в каком-либо одном из генов, определяющих устойчивость к изониазиду (таблица 12).

Как видно из таблицы 12, спектр мутаций, связанных с устойчивостью к изониазиду, был крайне ограниченным. Так, в гене *katG* регистрировалось только три варианта ОНП: два в кодоне 315, оба приводящие к замене Ser→Thr, и один, зарегистрированный только у одного штамма в виде сочетанной мутации, в 335 кодоне, приводящий к замене Ile→Val. В гене

inhA встречались два варианта нуклеотидных замен в 8-ой (Т→G) и 15-ой (С→T) позиции.

Таблица 12 – Мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, у штаммов МБТ группы I

Ген	Кодон / № нуклеотид позиции	Аминокислотные замены / нуклеотидные замены	Число мутантных сайтов (единичный ОНП/в сочетании с другим ОНП данного гена)	% штаммов МБТ с данным мутантным сайтом (из 106 генотипически устойчивых к изониазиду штаммов)
<i>katG</i>	315	Ser→Thr (1)	98 (97/1)	92,45
		Ser→Thr (2)	4 (4/0)	3,77
	335	Ile→Val	1 (0/1)	0,93
<i>inhA</i>	15	C→T	15 (15/0)	14,15
	8	T→G	1 (1/0)	0,93

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

Ser→Thr(2) соответствует замене AGC → ACA

В целом, с учетом сочетанных мутаций в двух генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, чаще всего у штаммов с генотипической устойчивостью к изониазиду (102/106, 96,23%) была выявлена мутация в 315 кодоне *katG*, ведущая к замене Ser→Thr, чаще вида AGC → ACC (98/102, 96,08%), чем AGC → ACA (4/102, 3,92%).

Мутации в гене *inhA* были выявлены у 16 генотипически устойчивых к изониазиду штаммов (15,09%), при этом чаще встречалась замена С→Т в 15 позиции (15/16), по сравнению с заменой Т→G в 8 позиции, которая встречалась только один раз в сочетании с мутацией в 315 кодоне *katG*.

Анализ мутаций в гене *gyrA*, связанных с устойчивостью к фторхинолонам, у МБТ группы I показал, что альтерации в изучаемом регионе гена были выявлены в 12/165 (7,27%) случаях, причем всегда в виде единичных ОНП. Мутации были детектированы в 2-х кодонах гена – 90-ом и 94-ом, причем в 90-ом регистрировался только один вариант ОНП, ведущий к замене Ala→Val, а в 94-ом кодоне *gyrA* было выявлено 3 варианта замены (Asp на Ala, Gly или Tyr). Чаще всего регистрировались мутации в 94 кодоне

(9/12), как правило, приводящие к замене в конечном продукте аспарагиновой кислоты на глицин (6/9) (таблица 13).

Таблица 13 – Мутации в гене *gyrA* у штаммов МБТ группы I

Кодон	Аминокислотная замена	Число мутантных сайтов
90	Ala→Val	3
94	Asp→Ala	1
	Asp→Gly	6
	Asp→Tyr	2

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, причем ему всегда сопутствовала мутация *katG* 315 (Ser→Thr), а в *rpoB* с наибольшей частотой регистрировались мутации в 531 кодоне (73/85, 85,88%), в основном приводящие к замене в конечном продукте серина на лейцин (71/73), реже регистрировались мутации в кодонах 516, 526, 533 (таблица 14).

Таблица 14 – Мутации, определяющие МЛУ-генотип, у МБТ группы I

Рифампицин		Изониазид				Число штаммов	
<i>rpoB</i>		<i>katG</i>		<i>inhA</i>			
кодон	замена	кодон	замена	позиция	замена	абс.	%
516	Asp→Tyr	315	Ser→Thr	-	-	2	2,35
516	Asp→Tyr	315	Ser→Thr	15	C→T	1	1,18
516	Asp→Val	315	Ser→Thr	15	C→T	1	1,18
526	His→Arg	315	Ser→Thr	-		1	1,18
526	His→Asn	315	Ser→Thr	-		2	2,35
526	His→Cys	315	Ser→Thr	-		1	1,18
526	His→Leu	315	Ser→Thr	15	C→T	1	1,18
531	Ser→Cys	315	Ser→Thr	15	C→T	1	1,18
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	-		64	75,29
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	15	C→T	5	5,88
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	8	T→G	1	1,18
531	Ser→Leu	315 335	Ser→Thr Ile→Val	-	-	1	1,18
531	Ser→Trp	315	Ser→Thr	-	-	1	1,18
533	Leu→Pro	315	Ser→Thr	-	-	1	1,18
511; 516	Leu→Arg; Asp→Tyr	315	Ser→Thr	-	-	1	1,18
526; 533	His→Asn; Leu→Pro	315	Ser→Thr	-	-	1	1,18
Всего штаммов с МЛУ-генотипом						85	100

На основании полученных результатов можно заключить, что у МБТ группы I к формированию МЛУ-генотипа в большинстве случаев приводило сочетание мутаций *rpoB* 531 (Ser→Leu) и *katG* 315 (Ser→Thr), которое встречалось у (71/85, 83,53%) штаммов МБТ с генотипической МЛУ. Этот доминирующий МЛУ-генотип мог быть дополнен мутациями в 335 кодоне *katG* (1/71) и нуклеотидными заменами в 8-ом или 15-ом положении гена *inhA* (6/71; *inhA* 15 – 5/6, *inhA* 8 – 1/6).

Штаммы, несущие в геноме мутации, определяющие устойчивость к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, встречались в 11/165, 6,67%случаях. У всех этих штаммов регистрировалась мутация в 315 кодоне *katG* Ser→Thr, соло или в сочетании с другими детерминантами устойчивости к изониазиду. У 10/11 всех этих штаммов выявлялись мутации в 531 кодоне *rpoB* Ser→Leu, у 1-го штамма – в 516 кодоне – Asp→Tyr. В *gyrA* чаще всего встречались мутации в 94 кодоне (8/11) (таблица 15).

Таблица 15 – Сочетания мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, у МБТ группы I

Рифампицин, <i>rpoB</i>		Изониазид				Фторхинолоны, <i>gyr A</i>		Число штаммов
		<i>katG</i>		<i>inhA</i>				
кодон	замена	кодон	замена	позиция	замена	кодон	замена	
516	Asp→Tyr	315	Ser→Thr	-	-	94	Asp→Ala	1
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	-	-	90	Ala→Val	3
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	-	-	94	Asp→Gly	3
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	-	-	94	Asp→Tyr	1
531	Ser→Leu	315 335	Ser→Thr Ile→Val	-	-	94	Asp→Gly	1
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	15	C→T	94	Asp→Gly	1
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	15	C→T	94	Asp→Tyr	1
Всего								11

Следовательно, при изучении спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, у МБТ группы I было показано, что среди штаммов с генотипической устойчивостью к рифампицину преобладали мутации в 531 кодоне *rpoB*, приводящие к замене Ser→Leu (81,61%), а среди штаммов, генотипически устойчивых к

изониазиду, преобладала мутация в 315 кодоне *katG* с заменой Ser→Thr (96,23%). Как следствие, сочетание этих мутаций в 83,53% случаев приводило к формированию МЛУ-генотипа. Мутации в *gyrA* встречались редко, только у 12 штаммов из группы, как правило, в сочетании с генотипической резистентностью к изониазиду и рифампицину, среди них преобладали мутации в 94 кодоне.

4.2. Спектр мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, у штаммов *M.tuberculosis* группы II

При изучении спектра мутаций МБТ группы II, выделенных от больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом, было показано, что мутации в гене *rpoB* были выявлены у 59/166 (35,54%) МБТ, и во всех случаях, кроме одного, были представлены единичными ОНП.

Всего было выявлено 10 вариантов мутаций в 6-ти кодонах *rpoB*: в кодонах 511, 512, 531 и 533 было выявлено по одному варианту ОНП, и по три варианта в кодонах 516 (Asp→Tyr, Asp→Val и Asp→Gly) и 526 (His→Asn, His→Cys и His→Tyr) (таблица 16). Чаще всего мутации локализовались в 531 кодоне *rpoB* (47/59, 79,66%), и были представлены вариантом, приводящим к замене Ser→Leu.

Таблица 16 - Мутации в гене *rpoB* у штаммов МБТ группы II

Кодон	Аминокислотная замена	Число мутантных сайтов (единичный ОНП/в сочетании с другим ОНП данного гена)	% штаммов МБТ с данным мутантным сайтом (из 59-ти)
511	Leu→Pro	2 (2/0)	3,39
512	Ser→Thr	1 (1/0)	1,69
516	Asp→Tyr	1 (1/0)	1,69
	Asp→Val	1 (1/0)	1,69
	Asp→Gly	1 (0/1)	1,69
526	His→Asn	4 (3/1)	6,78
	His→Cys	1 (1/0)	1,69
	His→Tyr	1 (1/0)	1,69
531	Ser→Leu	47 (47/0)	79,66
533	Leu→Pro	1 (1/0)	1,69

Изучение мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, у МБТ группы II показало, что у 80/166 (48,19%) штаммов были выявлены мутации хотя бы в одном из целевых генов. Чаще всего регистрировались мутации в *katG* – 75/80 (93,75%), включая штамм с двойной мутацией (в 315 и 335 кодонах гена). Мутации в *inhA* были выявлены у 15 штаммов, как правило в сочетании с мутацией в *katG* (11/15). У двух штаммов были выявлены мутации в *ahpC*, в одном случае единично, а в другом – в сочетании с мутацией в *katG*. Полный спектр мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, у МБТ группы II, представлен в таблице 17.

Таблица 17 – Мутации в генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, у штаммов МБТ группы II

Ген	Кодон / № нуклеотид позиции	Аминокислотные замены / нуклеотидные замены	Число мутантных сайтов (единичный ОНП/в сочетании с другим ОНП данного гена)	% штаммов МБТ с данным мутантным сайтом (из 80 генотипически устойчивых к изониазиду штаммов)
<i>katG</i>	315	Ser→Thr (1)	75 (74/1)	93,75
	335	Ile→Val	1 (0/1)	1,25
<i>inhA</i>	15	C→T	13 (13/0)	16,25
	8	T→G	2 (2/0)	2,50
<i>ahpC</i>	9	G→A	1 (1/0)	1,25
	10	C→T	1 (1/0)	1,25

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

Как видно из таблицы 17, в гене *katG* было выявлено два варианта ОНП: в 315 кодоне с заменой Ser→Thr (AGC → ACC), которая была наиболее распространенной среди генотипически устойчивых к изониазиду штаммов МБТ в группе II (75/80, 93,75%), и в 335 кодоне, Ile→Val, которая была выявлена только у одного штамма в сочетании с мутацией в 315 кодоне гена.

В гене *inhA* встречались два варианта нуклеотидных замен в 8-ой (T→G) и 15-ой (C→T) позиции, причем второй вариант встречался чаще (2

против 13, соответственно). Замена в 8-ой позиции *inhA* в обоих случаях сочеталась с мутациями в 315 кодоне *katG*, замена в 15-ой позиции в 4 случаях встречалась единично и в 9-ти случаях – в сочетании с мутацией в 315 кодоне *katG*.

При изучении генотипической резистентности к фторхинолонам у МБТ группы II было показано, что у 13/166 (7,83%) штаммов МБТ были выявлены значимые мутации в *gyrA*, представленные единичными ОНП, которые локализовались в 3 кодонах: 90-ом, 91-ом и 94-ом. Чаще регистрировались мутации в 94 кодоне (9/13), среди которых преобладала мутация ведущая к замене Asp→Gly (5/9) (таблица 18).

Таблица 18 – Мутации в гене *gyrA* у штаммов МБТ группы II

Кодон	Аминокислотная замена	Число мутантных сайтов
90	Ala→Val	3
91	Ser→Pro	1
94	Asp→Ala	1
	Asp→Gly	5
	Asp→Tyr	3

На основании полученных результатов для МБТ группы II было показано, что МЛУ-генотипом обладали 58/166 (34,94%) штаммов (таблица 19). Как видно из таблицы 19, во всех случаях, кроме одного, для штаммов с МЛУ-генотипом была характерна мутация *katG*315 Ser→Thr, следствием которой является устойчивость к изониазиду, часто в сочетании с заменой С→Т в 15 позиции *inhA* (10/58).

В гене *rpoB* доминировала мутация в 531 кодоне, приводящая к замене Ser→Leu (47/58, 81,03%). Также, у единичных штаммов, регистрировались мутации в 511, 512, 516, 526 и 533 кодонах *rpoB*.

Таким образом, у штаммов МБТ группы II формирование МЛУ-генотипа в большинстве случаев происходило за счет сочетания мутаций *rpoB* 531 (Ser->Leu) и *katG* 315 (Ser->Thr) – (47/58, 81,03%), которому в 5/47 случаях сопутствовала замена С→Т в 15 положении *inhA*, в двух случаях – Т→G в 8 положении *inhA* и в одном случае – С→Т в 10 положении *ahpC*. У

одного штамма с МЛУ-генотипом в гене *katG* была выявлена двойная мутация, затрагивающая 315 и 335 кодоны.

Таблица 19 – Мутации, определяющие МЛУ-генотип, у МБТ группы II

Рифампицин		Изониазид						Число штаммов	
<i>rpoB</i>		<i>katG</i>		<i>inhA</i>		<i>ahpC</i>			
кодон	замена	кодон	замена	позиция	замена	позиция	замена	абс.	%
511	Leu→Pro	315	Ser→Thr					1	1,72
512	Ser→Thr	-	-	15	C→T			1	1,72
516	Asp→Tyr	315	Ser→Thr					1	1,72
516	Asp→Val	315	Ser→Thr	15	C→T			1	1,72
526	His→Asn	315	Ser→Thr					2	3,45
526	His→Asn	315	Ser→Thr	15	C→T			1	1,72
526	His→Cys	315	Ser→Thr					1	1,72
526	His→Tyr	315	Ser→Thr	15	C→T			1	1,72
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr					38	65,52
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	15	C→T			5	8,62
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr	8	T→G			2	3,45
531	Ser→Leu	315; 335	Ser→Thr; Ile→Val					1	1,72
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr			10	C→T	1	1,72
533	Leu→Pro	315	Ser→Thr					1	1,72
516; 526	Asp→Gly; His→Asn	315	Ser→Thr	15	C→T			1	1,72
Всего штаммов с МЛУ-генотипом								58	100

Штаммы, несущие в геноме мутации, определяющие устойчивость к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам, встречались в 12/166, 7,23% случаев. Устойчивость к рифампицину у всех этих штаммов была обусловлена мутаций 531 кодоне *rpoB* Ser→Leu, к изониазиду – в 315 кодоне *katG* Ser→Thr, которая могла встречаться как единично (8/12), так и в сочетании с альтерациями в *inhA* (4/12). В *gyrA* чаще всего встречались мутации в 94 кодоне (8/12) (таблица 20).

Следовательно, анализ спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью к основным ПТП, у МБТ группы II, показал, что среди штаммов, генотипически устойчивых к рифампицину, чаще всего регистрировалась замена в 531 кодоне *rpoB*, приводящие к замене Ser→Leu (79,66%), среди штаммов, генотипически устойчивых к изониазиду - *katG* 315 (Ser→Thr) (93,75%). Сочетание этих мутаций в 81,03% случаев приводило к

формированию МЛУ-генотипа. Мутации в *gyrA* были редки и, как правило, ассоциированы с МЛУ-генотипом, преобладали мутации в 94 кодоне (9/13).

Таблица 20 – Сочетания мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, у МБТ группы II

Рифампицин		Изониазид				Фторхинолоны		Число штаммов
<i>rpoB</i>		<i>katG</i>		<i>inhA</i>		<i>gyr A</i>		
кодон	замена	кодон	замена	позиция	замена	кодон	замена	
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr(1)			90	Ala→Val	2
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr(1)			91	Ser→Pro	1
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr(1)			94	Asp→Gly	2
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr(1)			94	Asp→Tyr	3
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr(1)	15	C→T	90	Ala→Val	1
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr(1)	15	C→T	94	Asp→Gly	2
531	Ser→Leu	315	Ser→Thr(1)	8	T→G	94	Asp→Ala	1
Всего								12

4.3. Сравнительный анализ генотипической резистентности штаммов *M.tuberculosis* групп I и II

Сравнение результатов определения генотипической лекарственной устойчивости и спектра мутаций в генах, определяющих устойчивость к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам, у МБТ двух групп представлено в таблицах 21 и 22.

Таблица 21 – Число штаммов МБТ с мутациями в генах, детерминирующих устойчивость к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам

Генотипическая устойчивость	Число штаммов				Р (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

Таблица 22 – 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	-		
			His→Tyr	1	1,15	1	1,69	
		<i>rpoB</i> 531	Ser→Cys	1	1,15	-		
			Ser→Leu	71	81,61	47	79,66	
			Ser→Trp	1	1,15	-		
		<i>rpoB</i> 533	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	-	
			Asp→Tyr	2	-	3	-	
	Всего				12	-	13	-

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

Показано, что в группе I достоверно чаще ($p < 0,01$) выявлялись мутации в гене *rpoB*, ответственные за устойчивость к рифампицину (87/165, 52,73% - группа I против 59/166, 35,54% - группа II) (рисунок 4). Мутации затрагивали кодоны 511, 512, 516, 526, 531 и 533 и, как правило, имели единичный характер (85/87, 97,70% в группе I, 58/59, 98,31% в группе II), но в ряде случаев были выявлены мутации, затрагивающие два кодона в изучаемой области *rpoB* (два случая в группе I и один - в группе II).

Чаще всего выявлялись мутации в 531 кодоне гена *rpoB* (73/87, 83,91% - группа I, 47/59, 79,66% - группа II), причем, как правило, приводящие к замене серина на лейцин (71/73, 97,26% - группа I и все 47 штаммов с мутациями в 531 кодоне *rpoB* - группа II). В целом, в спектре мутаций в различных кодонах гена *rpoB* достоверных отличий по группам выявлено не было (рисунок 4).

Мутации, ответственные за устойчивость к изониазиду, у МБТ группы I выявлялись достоверно чаще ($p < 0,01$), чем в группе II (106/165, 64,24% - 1-ая группа против 80/166, 48,19% - 2-ая группа). Основной вклад в устойчивость к изониазиду вносили мутации в *katG*, которые достоверно чаще ($p < 0,01$) встречались у МБТ группы I (102/165, 61,82% против 75/166, 45,18%, соответственно по группам). Однако, при анализе спектра мутаций среди штаммов с генотипической устойчивостью к изониазиду различия между группами показано не было: 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% (рисунок 5).

Также не было показано достоверных отличий при анализе спектра мутаций среди штаммов с генотипической устойчивостью к изониазиду в гене *inhA*. Мутации в 15-ом положении *inhA* могли быть как единичными (4/106, 3,77% и 4/80, 5,00%, соответственно по группам), но чаще встречались в сочетании с мутацией в 315 кодоне *katG* (11/106, 10,38% и 9/80, 11,25%, соответственно по группам). Мутация в 8 положении *inhA* была зарегистрирована только в сочетании с мутацией в 315 кодоне *katG* в одном случае в группе I и в двух случаях только в группе II (рисунок 6).

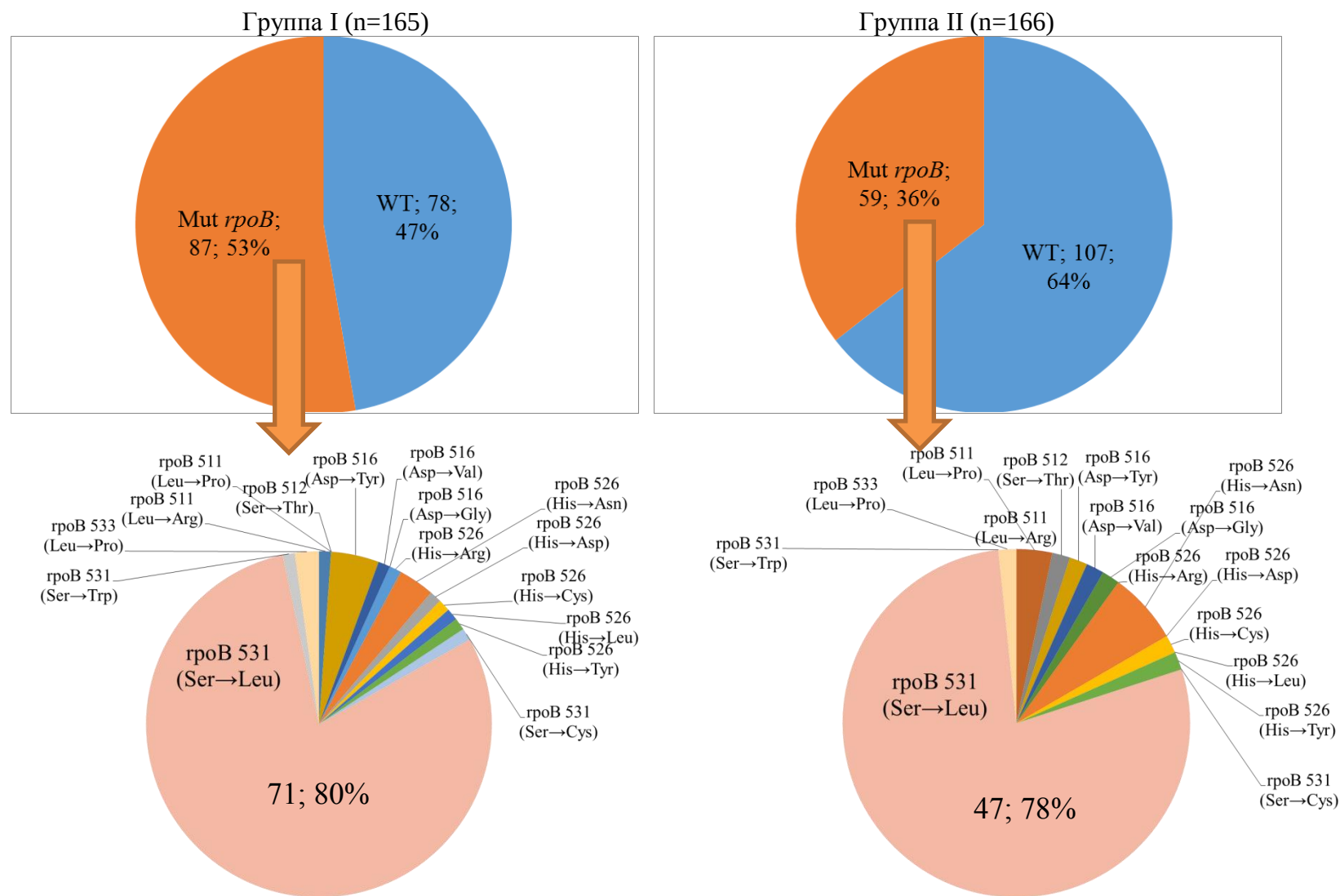
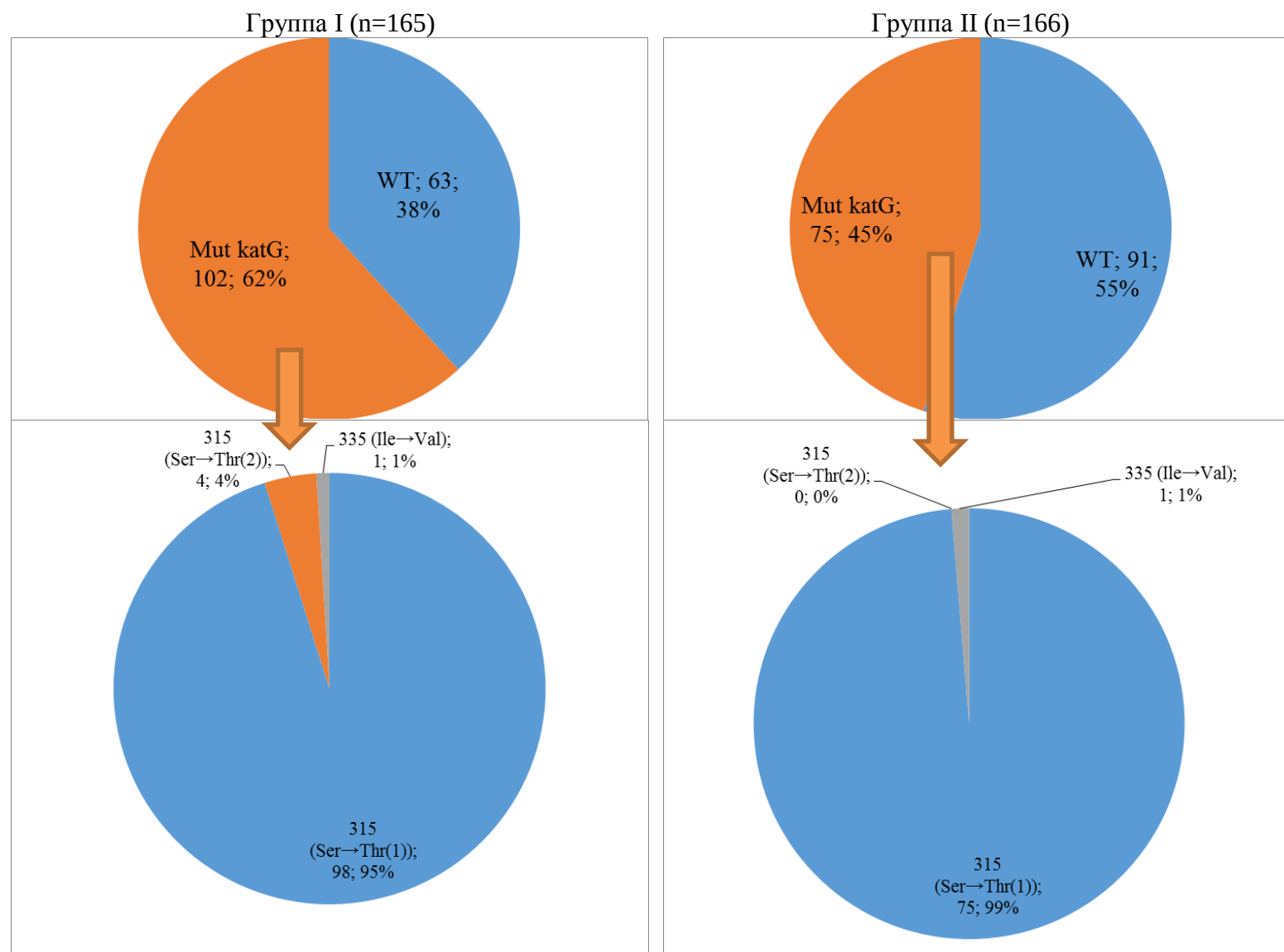


Рисунок 4 – Спектр мутаций в *rpoB*
 Примечание: Mut - наличие мутаций в гене, WT - ген дикого типа

Рисунок 5 – Спектр мутаций в *katG*

Примечание: Mut - наличие мутаций в гене, WT - ген дикого типа

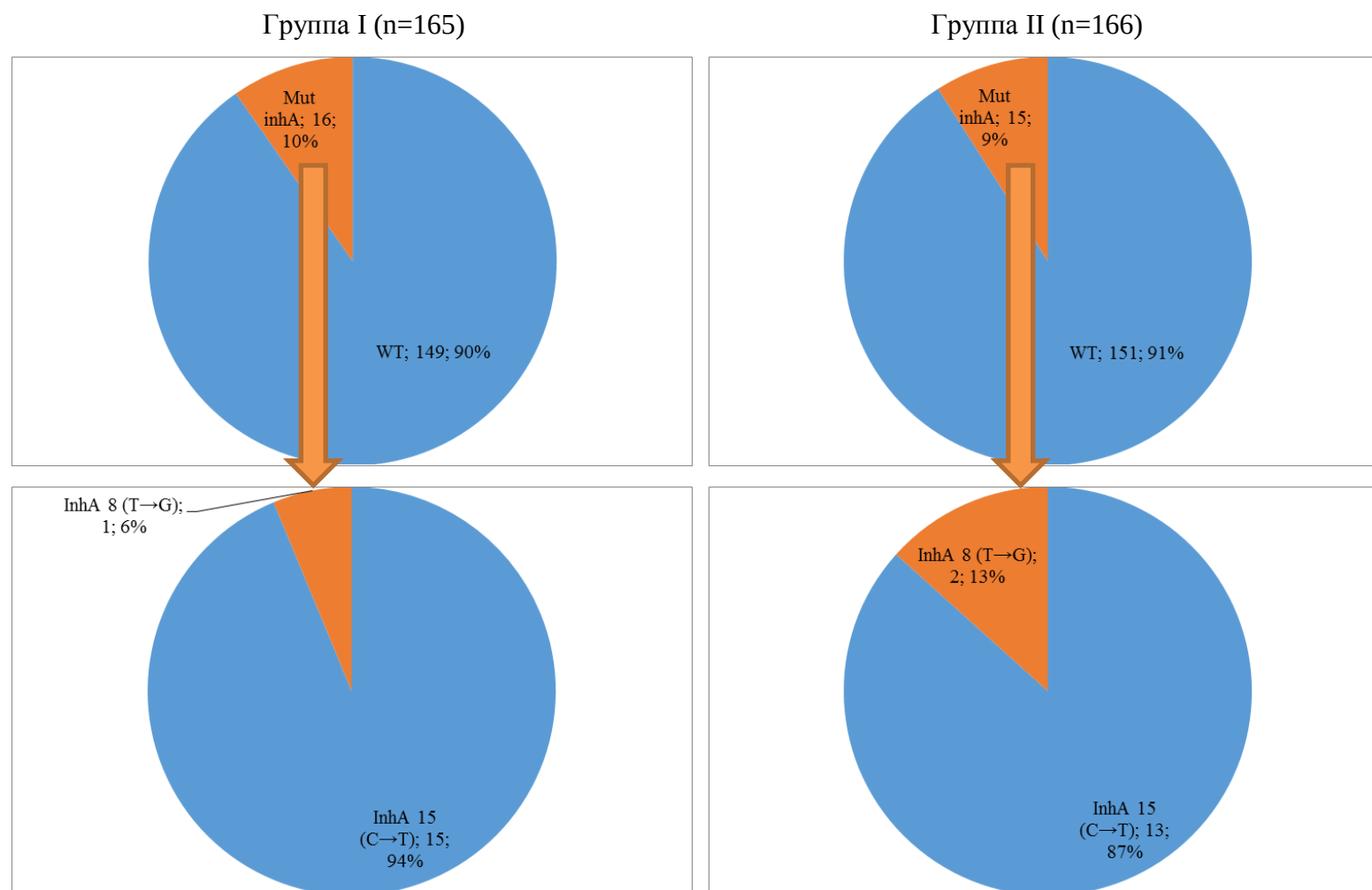


Рисунок 6 – Спектр мутаций в *inhA*

Примечание: Mut - наличие мутаций в гене, WT - ген дикого типа

Мутация в гене *ahpC* встретилаь только у МБТ группы II: в одном случае единично в 9-ом положении, в другом - в 10-ом положении в сочетании с мутацией в 315 кодоне *katG* (Ser→Thr).

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. Мутации регистрировались в 90, 91 и 94 кодонах гена. Чаще всего регистрировались мутации в 94 кодоне (9/12 и 9/13, соответственно по группам), как правило, приводящие к замене в конечном продукте аспарагиновой кислоты на глицин (6/9 и 5/9, соответственно).

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 ($p < 0,01$). Практически во всех случаях (кроме одного штамма из группы II) МЛУ-генотип включал мутацию в 315 кодоне *katG* (Ser→Thr). Причем эта мутация встречалась как единично (74/85, 87,06% - группа I и 44/58, 75,86% - группа II), так и в сочетании с мутациями в других генах, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, как правило в сочетании с мутацией в 15 кодоне *inhA* (9/11 - группа I и 9/13 - группа II).

В гене *rpoB*, у штаммов МБТ с МЛУ-генотипом чаще всего регистрировалась мутация в 531 кодоне (73/85, 85,88% - группа I и 47/58, 81,03% - группа II), в основном приводящая к замене в конечном продукте серина на лейцин (71/73 и 47/47, соответственно по группам), реже регистрировались мутации в кодонах 511, 512, 516, 526, 533.

В целом, самым частым МЛУ генотипом в обеих группах был *rpoB*531 Ser→Leu + *katG*315 Ser→Thr (64/85, 75,29% - группа I и 38/58, 65,52% - группа II).

Кроме того, в каждой группе приблизительно в равном соотношении (11/165, 6,67% и 12/166, 7,23%, соответственно по группам) встречались штаммы, несущие в геноме мутации, определяющие устойчивость к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам. У всех этих штаммов регистрировалась мутация в 315 кодоне *katG* Ser→Thr, единично или в сочетании с другими детерминантами устойчивости к изониазиду. Также у всех этих штаммов, кроме одного из группы I, выявлялись мутации в 531 кодоне *rpoB*. В *gyrA* чаще всего встречались мутации в 94 кодоне.

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.

ГЛАВА 5. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ШТАММОВ

M.tuberculosis

Генотипированию по полиморфизму локусов прямых повторов (сполиготипированию) было подвергнуто 308 штаммов МБТ (158 группы I и 150 группы II). Всего было выявлено 59 профилей гибридизации, 42 (71,19%) из которых встречались однократно, 17 – два и более раз, то есть представляли собой кластеры (таблица 23).

Как видно из таблицы 23, среди изученных штаммов 266/308 (86,36%) были сгруппированы в 17 кластеров (число штаммов в каждом кластере от 2 до 202). Среди них 7 кластеров встречались более чем в 1% случаев. Доминировали штаммы с профилем Δ 1-34, который был выявлен у 202 (65,58%) штаммов. Значительно реже встречались штаммы с профилем Δ (13, 29-31, 33-36) – 13 (4,22%) штаммов и Δ (15-24, 33-36) – 10 (3,25%) штаммов. У 6-ти штаммов (1,95%) был получен профиль Δ (8-9, 29-31, 33-36), у 5-ти (1,62%) – Δ (33-36) и по 4 штамма (1,30%) характеризовались профилями Δ (13-27, 33-36) и Δ (1-36).

Для штаммов МБТ группы I было идентифицировано 28 сполигопрофилей, а число кластеризованных штаммов составило 142/158 (89,87%) и распределялось по 12 кластерам. В группе II было выявлено 40 сполигопрофилей, число кластеризованных штаммов составило 124/150 (82,67%) и было распределено по 14 кластерам.

На основе анализа числа кластеризованных штаммов в каждой группе был рассчитан коэффициент активности трансмиссии (КАТ), который для штаммов группы I составил 82,28%, а для штаммов группы II – 73,33%.

Таблица 23 – Сполігопрофіли штаммов МБТ

Продолжение таблицы 23

[illegible]

Идентификация сполитгопрофилей была проведена согласно международной базе данных SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe), которая на момент проведения исследования содержала информацию о 58187 штаммах МБТ из 102 стран и о 7104 сполитгопрофилях, из которых 2774-ми присвоен международный вариант сполитготипов SIT (Spoligotype International Type). Остальные 4357 профилей встречались однократно и числились в базе как орфанные (уникальные) штаммы.

Согласно SITVITWEB среди исследованных штаммов 13 (4,22%) относились к орфанным, а остальные 295 (95,78%) штаммов были объединены в 46 SIT, из которых 7 SIT относились к категории U (unknown), т.е. не были отнесены ни к одной штаммовой линии, другие 39 SIT были классифицированы в 7 штаммовых линий: Beijing/Beijing-like, H, T, LAM, MANU, S, X (таблица 24).

Линии MANU, S и X были самыми малочисленными, каждая представлена одним штаммом; штаммы линий MANU и X были выделены от больных с сочетанной инфекцией ТБ и ВИЧ, S – от ВИЧ-негативного больного туберкулезом.

Также достаточно редко встречались штаммы МБТ, входящие в линию LAM, представленную одной сублинией (LAM9), включавшей три SIT. Причем, от ВИЧ-позитивных больных ТБ был выделен только один штамм этой сублинии, относящийся к SIT42. От ВИЧ-негативных больных ТБ было выделено 5 штаммов (по 2 штамма, относящихся к SIT42 и SIT150, и один - к SIT252).

Линии H и T были сопоставимы по числу штаммов: всего было выделено 30 штаммов линии H (9,74%) и 39 – линии T (12,66%), соответственно.

Таблица 24 - Принадлежность исследованных штаммов МБТ к SIT и штаммовым линиям

Линия	Сублиния	SIT	Сполигопрофиль	Число штаммов МБТ					
				Группа I (ТБ+ВИЧ)		Группа II (ТБ ВИЧ отр)		Всего	
				абс.	%	абс.	%	абс.	%
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Beijing/Beijing-like	Beijing	1	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□██████████	114	72,15	88	58,67	202	65,58
		190	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□██████□███	1	0,63	0	0,00	1	0,32
		265	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□██████████	2	1,27	1	0,67	3	0,97
	Beijing-like	269	□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□██████████	1	0,63	3	2,00	4	1,30
H	H1	47	████████████████████□□□□□□□□□□██████████	1	0,63	1	0,67	2	0,65
		400	██████□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□████	1	0,63	0	0,00	1	0,32
		531	██████□□□□□□□□□□□□□□□□□□□□██████████	2	1,27	0	0,00	2	0,65
	H3	50	████████████████████□□□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
		75	██████████████████□□□□□□□□□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
		3	□□□□□□□□□□□□□□□□██████████□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
	H4	35	██████████████□□□□□□□□□□□□□□██████████	7	4,43	6	4,00	13	4,22
		262	██████████□□□□□□□□□□□□□□██████████	3	1,90	3	2,00	6	1,95
		921	██□□□□██████□□□□□□□□□□□□□□██████████	1	0,63	0	0,00	1	0,32
		1269	██□□██████□□□□□□□□□□□□□□██████████	1	0,63	0	0,00	1	0,32
		2724	███████□□███□□□□□□□□□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
	T	T1	53	████████████████████□□□□□██████████	0	0,00	5	3,33	5
253			████████████████████□□□□██████████□□□□██████████	1	0,63	0	0,00	1	0,32
766			████████████████□□□□□□□□██████████□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
803			████████████████□□□□□□□□██████████□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
917			██████████□□□□□□□□□□██████████□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
495			██████████□□□□□□□□□□██████████□□□□██████████	1	0,63	0	0,00	1	0,32
156			██████████□□□□██████████□□□□██████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
1597			██████□□██	2	1,27	0	0,00	2	0,65
2285			████████████████□□████████████████████████████████	0	0,00	2	1,33	2	0,65
65			██□□□□□█████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
T2		118	██████████████████□□████████████████████████████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
T3		37	████████████████□□████████████████████████████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
		1547	████████████████□□████████████████████████████████	0	0,00	1	0,67	1	0,32
T4		40	██████████████████□████████████████████████████████	0	0,00	2	1,33	2	0,65

Продолжение таблицы 24

[illegible]

Линия Н включала в себя три сублинии (Н1, Н3 и Н4). Сублиния Н1 была представлена тремя SIT (SIT47, SIT400 и SIT531), каждый из которых включал 1-2 штамма. Всего в сублинию Н1 входило 5 штаммов (16,67% от всех штаммов линии Н). Четыре из них было выделено от ВИЧ-позитивных больных туберкулезом (по 1 штамму SIT47 и SIT400 и 2 штамма – SIT531).

В сублинию Н3 входило три штамма (10% от всех штаммов линии Н), принадлежащие к трем SIT: SIT 3, SIT50 и SIT75. Все эти штаммы были выделены от ВИЧ-негативных больных туберкулезом.

Большинство штаммов линии Н входило в сублинию Н4 (22/30, 73,3%) и было представлено пятью SIT. Чаще встречались штаммы, относящиеся к SIT35 (13 штаммов, 7 – из группы I и 6 – из группы II) и SIT262 (6 штаммов, по 3 из каждой группы). Важно отметить, что все штаммы сублинии Н4 несли делецию спейсоров в позициях 29-31 и 33-36, что позволило отнести эти штаммы к Уральской семье штаммов [75].

Линия Т включала 6 сублиний (Т1, Т2, Т3, Т4, Т5 и Т5_RUS1); сублинии Т2, Т3 и Т4 были представлены 1-2 штаммами. Чаще встречались штаммы сублиний Т5 (7 штаммов, 17,95% от всех штаммов линии Т), Т5_RUS1 (11 штаммов, 28,21% от всех штаммов линии Т) и Т1 (16 штаммов, 41,03% от всех штаммов линии Т).

Штаммы сублинии Т5_RUS1 приблизительно в равном соотношении встречались в двух группах: 5 штаммов в группе I и 6 – в группе II, причем, в основном эти штаммы относились к SIT254.

Штаммы сублинии Т5 чаще встречались в группе I, чем в группе II (5 штаммов группы I против 2 штамма группы II), а штаммы сублинии Т1, наоборот, чаще в группе II, чем в группе I (4 штамма группы I против 12 штаммов группы II). Следует отметить, что сублиния Т1 включала в себя наибольшее число SIT, девять из которых были представлены 1-2 штаммами (чаще одним), и один – SIT539, пятью штаммами, которые были выделены только от ВИЧ-негативных больных ТБ.

Наиболее многочисленной была линия Beijing/Beijing-like, которая включала 210 из 308 (68,18%) исследованных штаммов. 206 из них (98,10%) принадлежали к сублинии Beijing, которая была представлена тремя SIT (SIT1, SIT190 и SIT265). Доминирующим был SIT1, к которому относилось 202 штамма (65,58% от общего числа исследованных штаммов). Интересно отметить, что штаммы SIT1 достоверно чаще встречались в группе I, чем в группе II (114/158 (72,15%) против 88/150 (58,67%), $p < 0,05$).

В целом, к основным SIT, выделенным в нашем исследовании, можно было отнести семь, распространенность которых превышала 1% от всех выделенных нами штаммов. Три из них принадлежали к линии T: SIT53 (T1) (5/308, 1,62%), SIT254 (T5-RUS1) (10/308, 3,25%), SIT2540 (T5) (4/308, 1,30%). Два – к линии H сублинии H4-Ural: SIT35 (13/308, 4,22%) и SIT262 (6/308, 1,95%). Два SIT относились к линии Beijing/Beijing-like: SIT1 (Beijing) (202/308, 65,58%) и SIT269 (Beijing-like) (4/308, 1,30%).

Изучая профили гибридизации штаммов МБТ, отнесенных согласно SITVITWEB к одной штаммовой линии, видно, что они не обязательно связаны филогенетически, т.к. имеют достаточно большую вариативность внутри установленных сублиний (таблица 24), что особенно четко видно на примере линии T: штаммы SIT95, SIT766, SIT803, отнесенный в базе данных к сублинии T1, по структуре спוליгопрофиля больше похожи на сублинию T5_RUS1. То же самое справедливо и в отношении SIT 2540, отнесенного в базе данных к сублинии T5, но также по структуре профиля больше похожего на T5_RUS1. Ряд орфанных штаммов также имели сходство спוליгопрофилей с профилями, отнесенными к определенным сублиниям. Например, орфанный штамм Δ4-5, 13, 29-31, 33-36, и, возможно, штаммы Δ3, 8-9, 28-31, 33-36 и Δ1-19, 29-31, 33-36 могут быть связаны филогенетически с группой штаммов H4-Ural, а штамм Δ15-24, 31, 33-36 – с сублинией H3.

Поэтому, чтобы сгруппировать штаммы согласно их филогении, спוליгопрофили 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 различий внутри клонального комплекса по двум спейсорам (рисунки 7А и 7Б). Штаммы, не вошедшие в КК, по результатам построения минимального охватывающего дерева, были отнесены к разряду синглетонов.

Как видно из рисунков 7А и 7Б, всего было выделено семь КК. В КК1 вошло 14 SIT и один орфанный штамм. Не смотря на сходную структуру сполигопрофилей, по базе данных SITVITVEB они были отнесены к разным линиям и сублиниям: Т (сублинии Т1, Т2, Т3, Т4, Т5), Н (сублиния Н3) и Х (сублиния Х1).

КК2 был представлен 7-ю сполигопрофилями (6 SIT и один орфанный), которые, согласно SITVITVEB относились к линиям Т (сублинии Т1 и Т5_RUS1) и MANU (сублиния MANU2).

Рисунок 7А – Минимальное охватывающее дерево (www.miru-vntrplus.org).

Примечание: Максимальное отличие внутри клонального комплекса - два спейсора.

Цифры на линиях между узлами обозначают число делеционных событий.

Пунктирные линии - возможные филогенетические связи между штаммами.

Цифры внутри узлов схемы означают SIT сполігопрофіля.



Рисунок 7Б – Таблицы сполигопрофилей (к рис. 2А), входящих в клональные комплексы, и не вошедших в клональные комплексы штаммов – синглетонов (www.miru-vntrplus.org).

Примечание: СС – Клональный комплекс (Clonal Complex)

Максимальное отличие внутри клонального комплекса – два спейсора.

Цифрами в таблицах обозначены порядковые номера сполигопрофилей, присвоенные при внесении в программу.

В состав КК3 вошли штаммы 4-х SIT, относящиеся к сублинии H4-Ural, и 2 орфанных спוליгопрофиля. КК4 включал в себя штаммы Beijing и Beijing-like (4 SIT) и один спוליгопрофиль, SIT которого не был отнесен ни к одной штаммовой линии (U). В КК 5 вошли 3 SIT, отнесенные по базе данных SITVITVEB к сублинии H1 и один орфанный спוליгопрофиль. КК6 был представлен 3-мя SIT, относящимися к сублинии LAM9. КК7 включал два спוליгопрофиля – один орфанный, второй SIT255, не относящийся ни к одной штаммовой линии (U).

Информация о КК, выделенных в результате построения минимального охватывающего дерева, была соотнесена с дендрограммой спוליгопрофилей исследованных штаммов, построенной с помощью алгоритма UPGMA (рисунок 8).

Как видно из рисунка 8, дендрограмма разделялась на две главные ветви. Ветвь 1 включала в себя 7 спוליгопрофилей. Она дихотомически разветвлялась на ветви второго порядка: одним узлом были объединены штаммы, входившие в КК4 (Beijing/Beijing-like), вторым узлом – спוליгопрофили, определенные как синглетоны.

Остальные выявленные в исследовании спוליгопрофили располагались на главной ветви 2, которая, в свою очередь, давала начало двум ветвям второго порядка: на одной из них (2-1) располагался только один спוליгопрофиль (SIT46), не отнесенный ни к одной штаммовой линии (U), на второй (2-2) – остальные штаммы.

Ветвь второго порядка 2-2 разделялась на ветви третьего порядка 2-2-1 и 2-2-2. Ветвь 2-2-1 включала в себя штаммы, определенные при построении минимального охватывающего дерева в КК2. Сполигопрофиль SIT2540, определенный как синглетон, был включен нами в этот же КК на основании того, что был объединен со штаммами, включенными в КК2, в общий узел. Второй узел ветви третьего порядка 2-2-1 включал в себя два спוליгопрофиля-синглтона: орфанный профиль и SIT560 (U).

UPGMA-Tree, Spoligo: Categorical

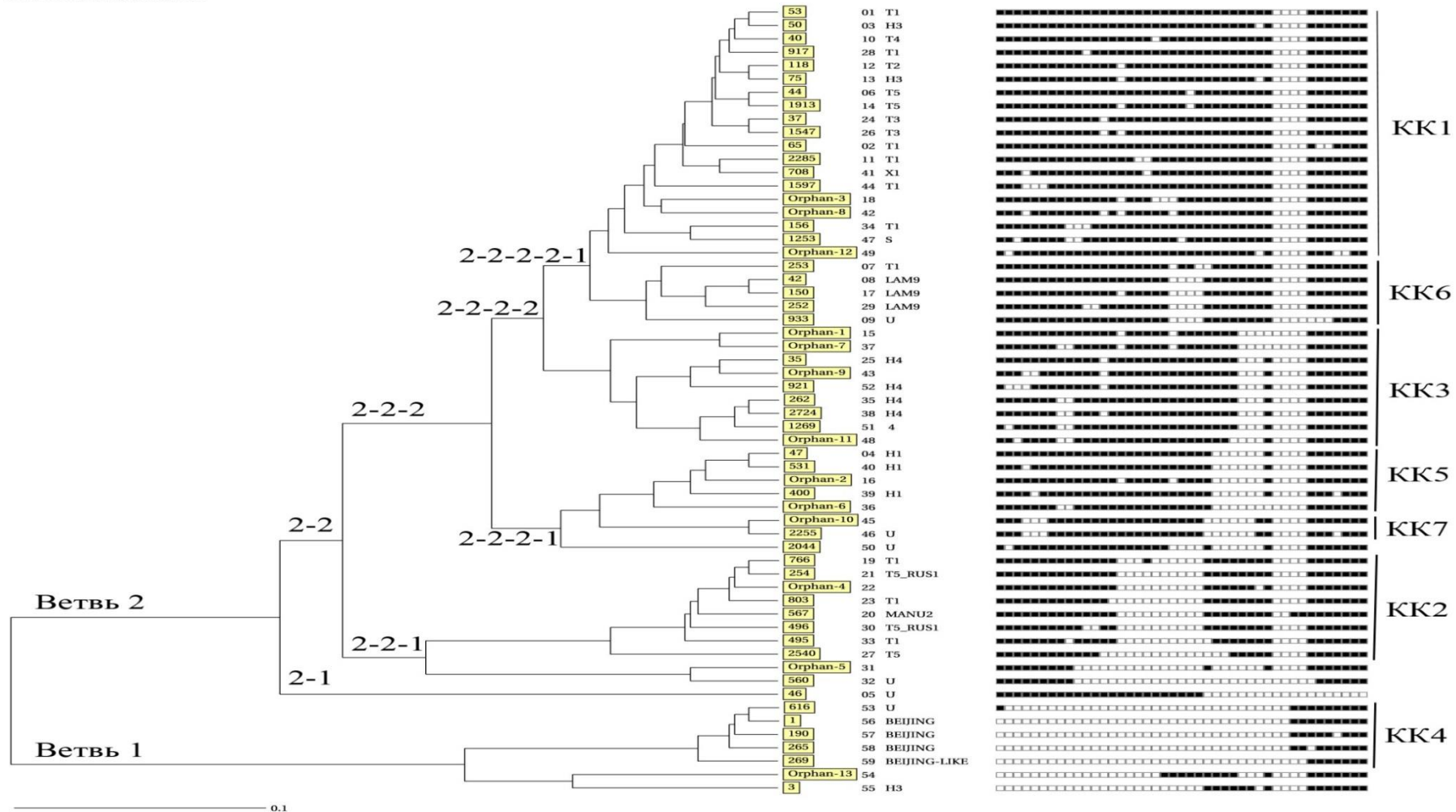


Рисунок 8 – Дендрограмма споллигопрофилей, построенная с использованием алгоритма UPGMA (www.miru-vntplus.org).

Примечание: В рамку заключен SIT споллигопрофиля.

1-й столбик цифр после рамки – порядковый номер споллигопрофиля при внесении в программу.

2-ой столбик – сублиния, определенная SITVITWEB.

Ветвь третьего порядка 2-2-2 разделялась на две ветви четвертого порядка: 2-2-2-1 и 2-2-2-2. Ветвь 2-2-2-1 включала штаммы КК7 и КК5. В КК5 нами также был включен один штамм с орфанным профилем, определенный как синглетон, т.к. был объединен в один узел со штаммами КК5. На ветви 5-го порядка, отходящей от ветви 2-2-2-1 обособленно располагался спוליгопрофиль SIT2044.

Ветвь 2-2-2-2 также дихотомически ветвилась. Один узел объединял штаммы КК3 и два профиля-синглтона, которые на этом основании также были отнесены к КК3. Другой узел давал начало ветви пятого порядка 2-2-2-2-1, которая давала начало ветвям шестого порядка, одна из которых содержала штаммы КК1 (к которому нами также были отнесены 4 профиля-синглтона), другая – штаммы КК6 (в который нами был включен один профиль-синглетон).

В результате было показано, что исследуемая популяция МБТ была представлена 7-ю клональными комплексами, 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 Т, 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 25).

Как следует из таблицы 25, 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 25 – 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 26 приведена сводная информация о распределении штаммов МБТ двух групп по основным КК, определенным с учетом построения минимального охватывающего дерева и дендрограммы по алгоритму UPGMA. В дальнейшем при анализе результатов в качестве групп сравнения будут использованы установленные нами КК.

Таблица 26 – 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 26, в группе I штаммов МБТ, выделенных от больных ТБ с ко-инфекцией ВИЧ в стадии СПИД, достоверно чаще, чем в группе сравнения, встречались штаммы, принадлежащие к КК4 (Beijing) - 118/158 (74,68%) против 93/150 (62,00%). Штаммы КК 1, 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). Штаммы других КК распределялись по группам с одинаковой частотой (рисунок 9).

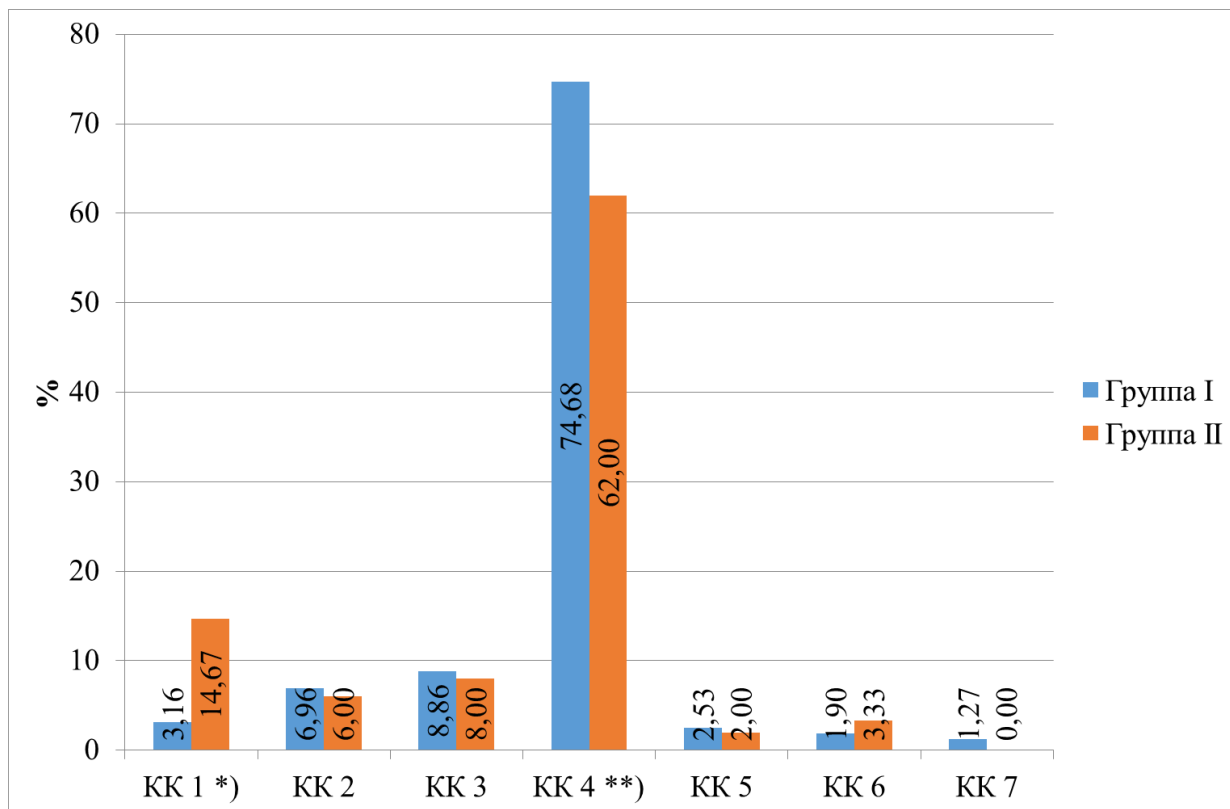


Рисунок 9 – Принадлежность к КК штаммов МБТ обеих групп

Примечание: *) $p(I-II) = 0,001$

***) $p(I-II) = 0,023$

При анализе дендрограмм, построенных с применением алгоритма UPGMA, штаммов двух исследованных групп, было показано, что штаммы МБТ группы I были более тесно сгруппированы филогенетически, чем штаммы группы II (рисунки 10 и 11). Так, штаммы, разделенные при анализе общей выборки штаммов на клональные комплексы КК1 и КК6, при построении дендрограммы штаммов группы I не были дифференцированы и объединялись общим узлом (узел 1-6 на схеме). Еще одной особенностью штаммов группы I по сравнению с группой II было то, что штаммы КК7 были представлены только в группе I.

Штаммы – синглетоны, 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).

Таким образом, изучение генетического полиморфизма штаммов МБТ, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД, показало, что эта группа штаммов была более кластеризована и характеризовалась более высокой активностью трансмиссии, чем штаммы МБТ, выделенные от больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом. Также было показано, что в состав группы I входило достоверно больше штаммов МБТ, относящихся к КК4 ($p < 0,05$), включавшему МБТ линии Beijing, и достоверно меньше штаммов КК1 ($p < 0,01$), включавших в основном штаммы линии T, содержащие минимальное число делеций в регионе DR.

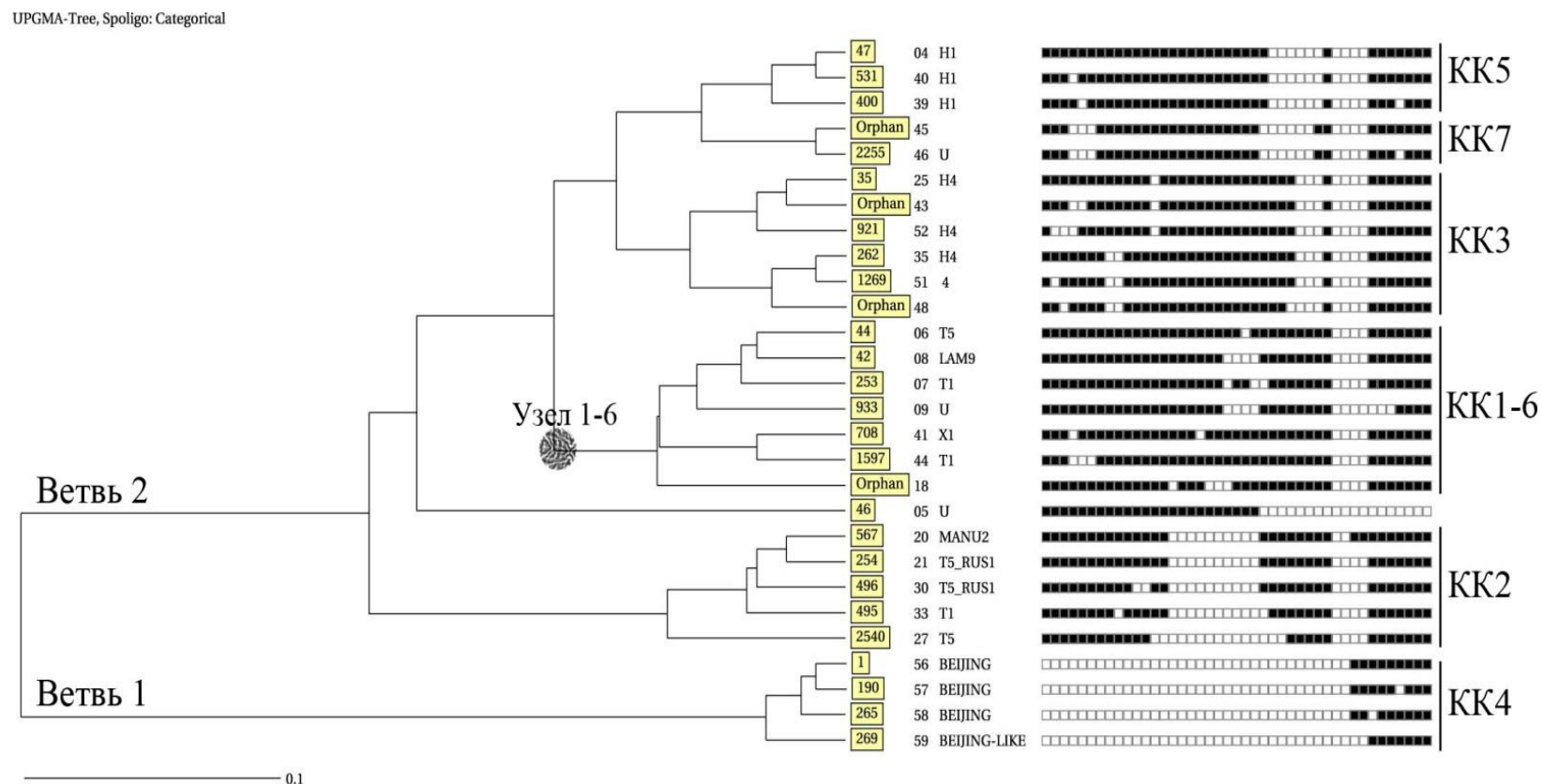


Рисунок 10 – Дендрограмма сполгопрофилей штаммов, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД (группа I), построенная с использованием алгоритма UPGMA (www.miru-vntrplus.org).

Примечание: В рамку заключен SIT сполгопрофиля.

1-й столбик цифр после рамки – порядковый номер спוליгопрофиля при внесении в программу.

2-ой столбик – сублиния, определенная SITVITWEB.

UPGMA-Tree, Spoligo: Categorical

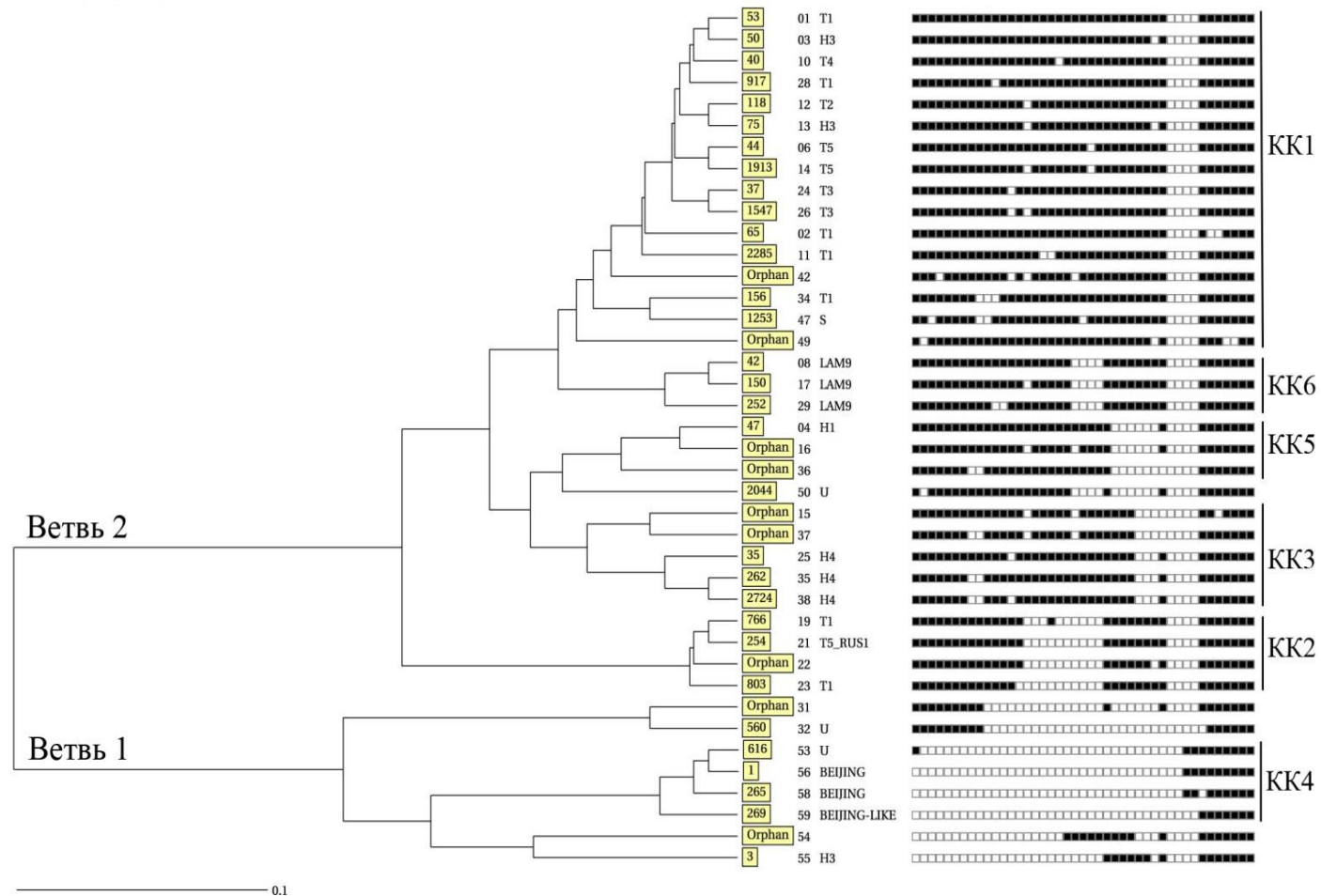


Рисунок 11 – Дендрограмма сполгопрофилей штаммов, выделенных от больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом (группа II), построенная с использованием алгоритма UPGMA (www.miru-vntrplus.org).

Примечание: В рамку заключен SIT сполгопрофиля.

1-й столбик цифр после рамки – порядковый номер сполгопрофиля при внесении в программу.

2-ой столбик – сублиния, определенная SITVITWEB.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С целью изучения биологических свойств и эпидемиологической значимости возбудителя туберкулеза при сочетанной ВИЧ/ТБ инфекции было исследовано 2 группы штаммов МБТ: в группу I вошли штаммы, выделенные от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД (n=165), в группу II – штаммы больных ТБ с отрицательным ВИЧ-статусом (n=166). Группы больных, послужившие источником штаммов МБТ, не отличались по половому составу, но в группе больных ВИЧ/ТБ, в отличие от ВИЧ-негативных, преобладали больные возрастной группы 25-44 года, относящиеся к наиболее социально активным слоям населения. Выявленные отличия по клиническим формам, заключающиеся в преобладании у больных ТБ, сочетанным с ВИЧ, распространенных процессов, согласуются с общепринятыми представлениями об особенностях течения ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц и обусловлены особенностями иммунного статуса пациентов.

Оценка массивности бактериовыделения, скорости роста и жизнеспособности выделенных МБТ не выявила отличий между группами: в обеих группах преобладали МБТ со средней и высокой жизнеспособностью (98/165, 59,39% - группа I и 103/166, 62,05% - группа II). Вопрос жизнеспособности МБТ, выделяемых от больных ТБ с ВИЧ-инфекцией, в настоящее время остается малоизученным. В единственной существующей работе, где была изучена жизнеспособность МБТ по массивности бактериовыделения и скорости роста, были получены отличающиеся от наших результаты: было показано, что у больных ТБ с ВИЧ-инфекцией регистрировалась большая массивность бактериовыделения и МБТ обладали большей жизнеспособностью [24]. Разница в полученных результатах, возможно, объясняется подбором групп больных для исследования: в работе Н.М.Корецкой с соавт. были отобраны ВИЧ-инфицированные лица с диссеминированным ТБ, в нашей работе в группе ВИЧ-инфицированных диссеминированный ТБ был выделен только у 20,61% больных. Следует

более подробно изучить эту биологическую особенность МБТ, выделенных от ВИЧ-позитивных лиц, на больных с разными клиническими формами ТБ из разных географических регионов.

При определении лекарственной чувствительности штаммов МБТ, выделенных от больных ТБ, ассоциированным с ВИЧ в стадии СПИД, и от ВИЧ-негативных больных фенотипическими и генотипическими методами были получены сходные результаты. Был показан высокий уровень лекарственной устойчивости в обеих группах, что соответствует общей эпидемиологической ситуации в регионе. Частота устойчивости к рифампицину и изониазиду у МБТ группы I была достоверно выше, чем в группе II. Также, культуральным методом определения ЛЧ было показано, что штаммы группы I достоверно чаще были устойчивы к стрептомицину и этамбутолу, однако характер МЛУ и спектр резистентности у штаммов обеих групп не отличался: в обеих группах преобладали собственно МЛУ-штаммы, пре-ШЛУ и ШЛУ встречалась реже. По спектру мутаций также не было выявлено отличий между группами: в обеих группах преобладали штаммы с мутациями *rpoB531 Ser→Leu* и *katG315 Ser→Thr*. Из литературы известно, что описанные мутации не оказывают негативного влияния на жизнеспособность МБТ [79, 141].

Анализ характера ЛУ показал, что среди штаммов МБТ, выделенных от ВИЧ-позитивных больных, достоверно чаще встречались штаммы с МЛУ (фенотипическая МЛУ: 50,30% в группе I против 31,33% в группе II, генотипическая МЛУ: 51,52% в группе I против 34,94% в группе II).

В целом, фенотипическими и генотипическими методами определения ЛЧ было показано, что среди штаммов, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных ТБ, меньше чувствительных штаммов, но больше штаммов с МЛУ, чем среди штаммов, выделенных от ВИЧ-негативных больных. Полученные данные согласуются с работами, считающими ВИЧ фактором риска для МЛУ [68, 98, 139, 159].

В нашем исследовании было выявлено мало штаммов МБТ с пре-ШЛУ и ШЛУ, что пока не позволяет делать какие-то выводы об особенностях распределения данного генотипа среди ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных больных ТБ. Однако, если справедливо утверждение, что ВИЧ является фактором риска ШЛУ [68, 98], можно предположить, что по мере лечения МЛУ-форм ТБ фторхинолонами в обозримом будущем возможно значительное увеличение числа случаев ШЛУ ТБ в группе инфицированных ВИЧ пациентов, по сравнению с группой ВИЧ-негативных больных ТБ.

В целом, результаты, полученные в данной работе, должны вызывать серьезные опасения, поскольку в регионе показана циркуляция МБТ с сочетанием мутаций, обеспечивающих фенотипическую лекарственную резистентность без ущерба для жизнеспособности и трансмиссивности. Начало формирования ШЛУ-генотипа МБТ, на фоне высокой распространенности сочетанной инфекции ТБ и ВИЧ в регионе, влечет за собой негативный сценарий развития ситуации по ТБ, т.к. в перспективе способно привести к накоплению клонов ШЛУ МБТ в популяции.

Кроме того, следует отметить, что сопоставление результатов определения ЛУ фенотипическими и генотипическими методами показало высокий процент совпадений результатов определения устойчивости обоими методами. Так, у штаммов с фенотипической устойчивостью к рифампицину и офлоксацину всегда были выявлены мутации в целевых генах. При определении устойчивости к изониазиду только в одном случае из 76 фенотипически устойчивых к изониазиду штаммов не было выявлено мутаций в анализируемых участках *katG*, *inhA* и *ahpC*, что может быть объяснено пределом чувствительности метода биочипов.

Также были несовпадения методов, заключающиеся в наличии мутаций в целевых генах с отсутствием их фенотипического проявления в виде устойчивости к препаратам (таблица 27). Следовательно, можно сделать вывод, что некоторые мутации в целевых генах не всегда приводят к развитию фенотипической ЛУ, поэтому при ранней коррекции химиотерапии

важно учитывать спектр мутаций и подтверждать "неоднозначные" мутации определением ЛЧ на средах. Наличие мутаций в целевых генах без развития фенотипической устойчивости может быть сигналом того, что в процессе терапии может развиться фенотипическая устойчивость за счет изменения генетического фона под давлением химиотерапии. Следовательно, при выявлении фенотипической чувствительности при наличии мутаций в целевых генах, больные нуждаются в более тщательном контроле лекарственной чувствительности в процессе лечения.

Таблица 27 - Примеры несовпадения определения ЛЧ на ППС и биочипах

Препарат	Мутация	Число штаммов (фенотипически чувств./ всего с данной мутацией)		
		Группа I	Группа II	Всего
Рифампицин	<i>rpoB</i> 511 (Leu→Pro)	нет	1/2	1/2
	<i>rpoB</i> 516 (Asp→Tyr)	2/3	1/1	3/4
	<i>rpoB</i> 526 (His→Asn)	0/2	3/3	3/5
Изониазид	<i>inhA</i> 15 (C→T)	4/4	4/4	8/8
	<i>ahpC</i> 9 (G→A)	нет	1/1	1/1

При проведении молекулярно-эпидемиологических исследований было показано, что штаммы МБТ, выделенные от больных с ТБ, сочетанным с ВИЧ, в стадии СПИД, отличается большая степень кластеризации, что может свидетельствовать о более интенсивной передаче штаммов МБТ в этой группе. Полученные нами результаты расходятся с результатами, полученными в исследовании популяции МБТ, выделенных от больных ТБ с ВИЧ-инфекцией в Harare (Zimbabwe), где ВИЧ не был признан фактором риска кластеризации штаммов, как отражения недавней передачи [94]. Вероятно, несовпадение объясняется особенностями социальных отношений между дезадаптированными группами населения (с высоким риском развития ВИЧ и ТБ) и основной популяцией, которые исторически сложились в конкретных странах и регионах. Высокая степень кластеризации

штаммов в группе МБТ, выделенных от ВИЧ-инфицированных больных, скорее свидетельствует в пользу теории развития ТБ у ВИЧ-инфицированных лиц вследствие суперинфицирования, а не эндогенной реактивации.

При идентификации полученных споллигопрофилей 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 [132].

Анализ географического распределения штаммов согласно международной базе данных генотипов SITVITWEB (Institut Pasteur de la Guadeloupe) показал, что 15 выделенных в нашем исследовании SIT относились к SIT, которые встречались более чем в 1% в различных регионах мира (таблица 28). В их число входили и 5 из 7-ми определенных нами основных споллиготипов. В целом, к категории широко распространенных в мировых регионах SIT относилось 257/308 (83,44%) исследованных штаммов.

Как видно из таблицы 28, представленные SIT можно было разделить на группы распространенных повсеместно, встречающихся преимущественно в Центральной и/или Северной Азии, характерных для Западной Азии и/или Восточной Европы и "не-Азиатские штаммы", которые наблюдались во всем мире, кроме большинства азиатских регионов.

Из 15-ти выявленных нами SIT, которые относились к категории широко распространенных в мире, два SIT, представленные каждый одним штаммом, были характерны для регионов, географически не связанных с Уралом: SIT3 (H3) – для Центральной Америки и SIT156 (T1) для Восточной Африки (Мадагаскар). В обоих случаях эти штаммы были выделены от ВИЧ-негативных больных туберкулезом.

К распространенным повсеместно штаммам относились: SIT42 (LAM9), SIT53 (T1) и SIT50 (H3), частота встречаемости которых в мире, в зависимости от региона, составляла от 1,3% до 14%. В нашем исследовании

штаммы этих SIT встречались достаточно редко: SIT42 (LAM9) – 3 штамма (0,97%), SIT53 (T1) – 5 штаммов (1,62%) и SIT50 (H3) – 1 штамм из группы II (0,32%).

В категорию штаммов, характерных для Западной Азии и/или Восточной Европы (частота встречаемости в регионах чуть выше 1%), вошли штаммы двух SIT, выявленных в нашем исследовании, SIT37(T3) и SIT46(U). К каждому из этих SIT относилось по одному штамму (0,32%) из группы II и группы I, соответственно.

В группу "не-Азиатских" штаммов, которые не встречались в большинстве азиатских регионов, но были распространены в других мировых регионах, входили 2 штамма (0,65%) SIT47(H1), распространенность которого в регионах мира составляла 1-6%. Известно, что большинство штаммов линии H имеют европейское происхождение, и, в случае встречаемости в других мировых регионах, могут отражать следы европейской колонизации [76, 93].

Группа штаммов, характерных для Центральной и/или Северной Азии, включала 7 SIT, 4 из которых относились к основным выявленным нами SIT: SIT1 (Beijing), SIT254 (T5_RUS1), SIT35 (H4) и SIT262 (H4), частота встречаемости которых была сходной с частотой встречаемости в целевых регионах. Другие три SIT из этой группы (SIT252 (LAM9), SIT65 (T1) и SIT118 (T2)) были представлены в нашем исследовании каждый одним штаммом, что было ниже встречаемости штаммов этих SIT в Центральной и/или Северной Азии, где они встречаются с частотой приблизительно 2-3%. SIT1 (Beijing), несмотря на то, что встречается во всем мире, был отнесен нами к "азиатским" штаммам, т.к. наибольшая частота встречаемости (42-69%) приходится на Азиатские регионы, в других регионах этот SIT встречается реже (2-19%).

Таблица 28 - Выявленные в исследовании SIT, встречаемость которых превышает 1% в регионах мира

Суб- линия	SIT	Частота встречаемости в исследовании, %			Встречаемость в мире, %																		
					Европа				Азия						Африка					Америка			Австралия
		Гр.1	Гр.2	Всего	Вост.	Сев.	Юж.	Зап.	Центр	Вост.	Сев.	Юж.	ЮВ	Зап.	Вост.	Средн.	Сев.	Юж.	Зап.	Сев.	Центр	Юж.	
T1	53 ^{*)}	0,00	3,33	1,62	8,68	4,49	10,59	8,67	3,64	2,83	6,5	3,8	2,55	11,54	8,38	3,58	9,67	6,73	10,87	6,16	13,74	7,21	8,27
	65	0,00	0,67	0,32	-	-	-	-	1,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	156	0,00	0,67	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,23	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	118	0,00	0,67	0,32	-	-	-	-	1,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	37	0,00	0,67	0,32	1,37	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	1,07
T5_RUS1	254 ^{*)}	2,53	4,00	3,25	-	-	-	-	1,82	-	4,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	47	0,63	0,67	0,65	7,48	1,05	3,9	3,48	-	-	-	-	-	1,27	-	5,97	1,91	-	2,34	1,77	2,54	1,64	-
H3	3	0,00	0,67	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,29	-	-
	50	0,00	0,67	0,32	13,67	1,29	6,11	6,05	-	3,49	-	-	-	2,95	1,28	7,46	9,55	1,37	2,75	4,36	3,05	4,7	2,67
H4	35 ^{*)}	4,43	4,00	4,22	-	-	-	-	5,45	-	1,75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	262 ^{*)}	1,90	2,00	1,95	-	-	-	-	5,45	-	2,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAM9	42	0,63	1,33	0,97	2,97	1,48	7,74	2,58	7,27	-	4,76	2	-	1,86	3,97	-	9,07	2,6	4,54	2,9	6,36	8,8	7,73
	252	0,00	0,67	0,32	-	-	-	-	-	-	3,11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Beijing	1 ^{*)}	72,15	58,67	65,58	2,01	4,1	2,21	2,58	69,09	60,57	45,44	12,35	41,93	8,81	3,8	-	3,82	19,35	2,48	14,15	-	-	12,27
U	46	0,63	0,00	0,32	1,77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: "-" – не встречается в регионе или встречается с частотой ниже 1%

*) – основные SIT, выявленные в исследовании

Сравнение выявленных нами SIT с SIT, распространенными в РФ, показало, что из 9-ти преобладающих в РФ SIT в нашем исследовании было выявлено 7, а SIT264 (T1) и SIT1134 (H4), характерные для Северо-Азиатского региона в целом (1,64% и 1,75%, соответственно), выявлены не были (таблица 29).

Таблица 29 – SIT штаммов МБТ, распространенность которых в РФ превышает 1% (по данным SITVITWEB)

Сублиния	SIT	Встречаемость в РФ по данным SITVITWEB (% от 1241 штаммов)	Выявлено в исследовании (%)		
			Группа I	Группа II	Всего
T1	53	6,50	-	3,33	1,62
	264	1,65	Не выявлен		
T5_RUS1	254	4,85	2,53	4,00	3,25
H4-Ural	35	1,75	4,43	4,00	4,22
	262	2,43	1,90	2,00	1,95
	1134	1,75	Не выявлен		
LAM9	42	4,76	0,63	1,33	0,97
	252	3,11	-	0,67	0,32
Beijing	1	45,44	72,15	58,67	65,58

Как видно из таблицы, два SIT – 254 (T5_RUS1) и 262 (H4-Ural), характерные для Центральной и Северной Азии, в нашем исследовании встречались с частотой, сходной в целом по РФ. Встречаемость двух SIT – 1 (Beijing) и 35 (H4) превышала среднюю по РФ (65,58% против 45,44% в РФ и 4,22% против 1,75% в РФ, соответственно). Еще три SIT: SIT42 (LAM9), SIT53 (T1) и SIT252 (LAM9), по данным нашего исследования, встречались существенно реже, чем в целом по РФ.

Таким образом, популяция МБТ Уральского региона, располагающегося географически на стыке Европы и Азии, включала в себя как Европейские, так и Азиатские популяции штаммов, а также штаммы, распространенные повсеместно. Однако, преобладали штаммы, характерные для Центральной и/или Северной Азии, а "Европейские" штаммы встречались реже.

Определение основных клональных комплексов штаммов МБТ и особенностей их распределения в группах штаммов, выделенных от больных ТБ,

сочетанным с ВИЧ в стадии СПИД, и ВИЧ-негативных больных, показало, что 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 Т 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 - синглетоны, 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).

Отдельного упоминания заслуживает факт выявления штаммов, входящих в КК7, только в группе МБТ, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ. Этот КК интересен тем, что в его состав входят два штамма, один из которых был отнесен в базе данных SITVITWEB к орфанным, а другой, хоть и имел SIT, но не принадлежал ни к одной известной штаммовой линии, т.е. штаммы этого КК достаточно редки, мало трансмиссивны и обособлены от общей популяции. Наличие такого клонального комплекса, состоящего из двух штаммов, спוליгопрофили которых отличаются на один спейсор, в группе МБТ, выделенных от больных ТБ, сочетанным с ВИЧ, вероятно, отражает возможность передачи малотрансмиссивных клонов именно среди этой категории больных вследствие особенности их иммунного статуса.

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 (таблица 30): 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%), $p < 0,01$. Полученные результаты согласуются с общепринятым мнением о преобладании ЛУ клонов группе штаммов Beijing [73,100].

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.

Таблица 30 - Характер лекарственной чувствительности у МБТ основных филогенетических линий

Филогенетическая линия		Чувствительные			Монорезистентные			Полирезистентные			МЛУ			Суммарно		
		1 гр.	2 гр.	всего	1 гр.	2 гр.	всего	1 гр.	2 гр.	всего	1 гр.	2 гр.	всего	1 гр.	2 гр.	всего
Ветвь 1	КК4	27 (22,88%)	31 (33,33%)	58 (27,49%)	13 (11,02%)	8 (8,60%)	21 (9,95%)	11 (9,32%)	12 (12,90%)	23 (10,90%)	67 (56,78%)	42 (45,16%)	109 (51,66%)	118 (100%)	93 (100%)	211 (100%)
	Синглетоны	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
Ветвь 2	КК1	5	20	25 (92,59%)	-	2	2 (7,41%)	-	-	-	-	-	-	5	22	27 (100%)
	КК2	3	7	10 (50,00%)	-	-	0 0,00	-	1	1 (5,00%)	8	1	9 (45,00%)	11	9	20 (100%)
	КК3	8	7	15 (57,69%)	3	1	4 (15,38%)	1	1	2 (7,69%)	2	3	5 (19,23%)	14	12	26 (100%)
	КК5	4	2	6	-			-	1	1	-			4	3	7
	КК6	2	2	4	-	2	2	-	-	-	1	1	2	3	5	8
	КК7	-			1	-	1	1	-	1	-			2	-	2
	Синглетоны	1	3	4	-			-			-	1	1	1	4	5
Ветвь 1		27 (22,88%)	33 (34,74%)	60 (28,17%)	13 (11,02%)	8 (8,42%)	21 (9,86%)	11 (9,32%)	12 (12,63%)	23 (10,80%)	67 (56,78%)	42 (44,21%)	109 (51,17%)	118 (100%)	95 (100%)	213 (100%)
Ветвь 2		23 (57,50%)	41 (74,55%)	64 (67,37%)	4 (10,00%)	5 (9,09%)	9 (9,47%)	2 (5,00%)	3 (5,45%)	5 (5,26%)	11 (27,50%)	6 (10,91%)	17 (17,89%)	40 (100%)	55 (100%)	95 (100%)

Зависимости клинических форм ТБ от филогенетической принадлежности возбудителя ни для одной из исследуемых групп штаммов показано не было (таблица 31).

Таблица 31 - Клинические формы ТБ в зависимости от филогенетической линии МБТ

Группа I (ТБ+ВИЧ)				
	Ветвь 1		Ветвь 2	
	абс	%	абс	%
Инф.туб	43	36,44	13	34,21
Дисс.туб	23	19,49	7	18,42
Генер.туб	12	10,17	6	15,79
Очаг.туб	4	3,39	1	2,63
ТВГЛУ	30	25,42	9	23,68
Милиарный туб	1	0,85	0	0,00
Туб.плеврит	5	4,24	2	5,26
Всего	118	100	38	100
Группа II (ТБ ВИЧ-отр.)				
	Ветвь 1		Ветвь 2	
	абс	%	абс	%
Инф.туб	86	93,48	53	92,98
Другие формы	6	6,52	4	7,02
Всего	92	100	57	100

Следовательно, 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 *rpoB*531 Ser→Leu и *katG*315 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

КК - клональный комплекс - группа штаммов, наиболее тесно связанная филогенетически

КОЕ - колониеобразующие единицы

ЛЧ - лекарственная чувствительность

ЛУ - лекарственная устойчивость

МГМ - молекулярно-генетические методы

МЛУ - множественная лекарственная устойчивость

ОНП - однонуклеотидный полиморфизм

п.н. - пара нуклеотидов

ПДРФ IS6110 - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, содержащих вставочную последовательность 6110

ППС - плотные питательные среды

ПТП – противотуберкулезный препарат

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СПИД - синдром приобретенного иммунодефицита

ТВГЛУ - туберкулез внутригрудных лимфоузлов

ШЛУ - широкая лекарственная устойчивость

Ala - аланин

Arg - аргинин

Asn - аспарагин

Asp - аспартат

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

MIRU – Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - микобактериальные вставочные повторяющиеся единицы

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

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats - переменное число tandemных повторов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреевская, С.Н. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis* W кластера: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 /Андреевская Софья Николаевна. - М., 2008. - 28 с.
2. Антонова, О.В. Выявление мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к устойчивости к фторхинолонам, методом гибридизации на биологических микрочипах / О.В. Антонова, Д.А. Грядунов, С.А. Лапа, А.В. Кузьмин, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, Е.Ю. Носова, О.И. Скотникова, Л.Н. Черноусова, А.М. Мороз, А.С. Заседателев, В.М. Михайлович // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2008. - Т. 145(1). - С. 115-120.
3. Асанов, Б.М. ВИЧ-инфекция и туберкулез в Ульяновской области / Б.М. Асанов, Л.Г. Пантелеева, В.А. Дубровина // Проблемы туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. - 2009. - №7. - С. 5-7.
4. Бабаева, И.Ю. Диссеминированный туберкулёз лёгких у больных ВИЧ-инфекцией / И.Ю. Бабаева, О.В. Демихова, А.В. Кравченко; под ред. В.В. Ерохина. М.: НЬЮ ТЕРРА, 2010. - 164 с.
5. Баранов, А.А. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерий туберкулеза / А.А. Баранов, А.О. Марьяндышев // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008. - № 4. - С. 3-7.
6. Блум, Б. Р. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль /под. ред. Б.Р. Блум. М.: Медицина, 2002. - 678 с.
7. Валиев, Р.Ш. Клинико-иммунологические особенности течения туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией / Р.Ш. Валиев, И.М. Хаертынова, О.М. Романенко, Р.В. Хамзина, Н.Р. Валиев // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2005. - № 10. - С. 31–34.
8. Василенко, Н.В. Сполиготипирование лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Беларуси / Н.В.

Василенко, А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, Е.В. Лимещенко, В.М. Семенов, О.В. Нарвская // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2006. - №4. – С. 70-74.

9. Васильев, А.В. Лечение больных с лекарственной устойчивостью возбудителя / А.В. Васильев // Сб. пособий для врачей СПб. НИИ фтизиопульмонологии. – СПб., 2000. – 22 с.

10. Васильева, И.А. Эффективность двухэтапной краткосрочной химиотерапии туберкулеза легких: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.26 / Васильева Ирина Анатольевна - М., 1997. – 25 с.

11. Владимиров, К.Б. Лекарственная устойчивость микобактерий у больных туберкулезом и ВИЧ-инфекцией в пенитенциарных учреждениях Санкт-Петербурга / К.Б.Владимиров, Е.В.Зайцева, Г.Ю.Марфина, А.К.Иванов // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2014. - Т. 6. - № 2. - С. 110-117.

12. Воронкова, О.В. Генотипическая характеристика *M. tuberculosis* - возбудителей остро прогрессирующего деструктивного туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, И.О. Наследникова, О.В. Филинюк, В.А. Серебрякова, Ю.В. Колобовникова // Бюллетень сибирской медицины. - 2011. - № 1. - С. 12-18.

13. Вязовая, А.А. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Псковской области / А.А. Вязовая, И.В.Мокроусов, Т.Ф. Оттен, Б.И. Вишневский, О.В. Нарвская // Туберкулез и болезни легких. - 2012. - № 6. - С. 35-39.

14. Дымова, М.А. Выявление генетического разнообразия *Mycobacterium tuberculosis* на территории стран СНГ: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.03 / Дымова Майя Александровна. – Новосибирск, 2011. – 23 с.

15. Загдын, З.М. Поздно выявленный туберкулез среди больных, инфицированных и не инфицированных ВИЧ, в Ленинградской области и

причины их смерти / З.М. Загдын, А.Ю. Ковеленов, В.Н. Шабалин, Р. Хаймер // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2010. - Т. 2. - № 1. - С. 70-77.

16. Зайцева, Е.В. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией в пенитенциарной системе Санкт-Петербурга и Ленинградской области / Е.В. Зайцева, К.Б. Владимиров, А.К. Иванов // Туберкулез и болезни легких. - 2010. - № 9. - С. 25-28.

17. Зимина, В.Н. Эпидемиология, течение и особенности лечения туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией / В.Н. Зимина, А.В. Кравченко, И.Б. Викторова // Медицина в Кузбассе. - 2011. - т. 10. - № 3. - С. 6-13.

18. Информационный бюллетень 2014. Объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС). - Режим доступа: <http://www.unaids.org/ru/resources/campaigns/2014/2014gapreport/factsheet>

19. Исабекова, Т.М. MIRU-VNTR типирование мультирезистентных штаммов, циркулирующих на территории Республики Казахстан / Т.М. Исабекова // Материалы Первого студенческого форума «Биотехнология XXI века» 12-14 апреля 2010 года. - Астана, 2010. - С. 12-13.

20. Исакова, Ж.Т. Генотипирование штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих в местах лишения свободы Кыргызской республики / Ж.Т. Исакова, И.В. Мокроусов, В. Вылчева, Н.А. Совхозова, А.А. Алдашев, Н.Т. Растоги // Туберкулез и болезни легких. - 2010. - № 9. - С. 39-44.

21. Карачунский, М.А. Туберкулез в наши дни / М.А. Карачунский // РМЖ. - 2001. - № 21. - С. 951-953.

22. Кожушко, М.Ю. Клинические особенности туберкулеза у ВИЧ-инфицированных / М.Ю. Кожушко, И.В. Евстигнеев // Therapia. - 2010. - № 9 (50). - С. 11-17.

23. Коломиец, В.М. Проблемы ВИЧ-инфекции для специализированной противотуберкулезной службы в условиях отдельного региона / В.М. Коломиец,

Ю.И. Шахова, С.Н. Локтионов // Проблемы туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. - 2009. - № 7. - С. 5-7.

24. Корецкая, Н.М. Биологические свойства микобактерий у ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных лиц с диссеминированным туберкулезом легких / Н.М. Корецкая, И.А. Большакова // Сибирское медицинское обозрение. - 2012. - Т. 79. - № 4. - С. 62-66.

25. Лисневич, Н.Н. Туберкулез у больных ВИЧ -инфекцией в Калужской области / Н.Н. Лисневич // Проблемы туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. - 2009. - № 7. - С. 4.

26. Литвинов, В.И. Лабораторная диагностика туберкулеза / В.И. Литвинов, А.М. Мороз // М.: МНПЦБТ, 2001. - 175 с.

27. Методы математического анализа эпидемиологической ситуации по туберкулезу. Пособие для врачей. - СПб., 1998. - 24 с.

28. Мишин, В.Ю. Казеозная пневмония: современные аспекты патогенеза, клиники и лечения / В.Ю. Мишин // IV (XIV) съезд научно-медицинской ассоциации фтизиатров: тез. докл. - Йошкар-Ола, 1999. – С. 71.

29. Мишин, В.Ю. Туберкулез при ВИЧ-инфекции / В.Ю. Мишин, М.А. Карачунский // Медицинская газета. - 2003. - №15 (935). - С. 8-9.

30. Мишин, В.Ю. Химиотерапия больных с лекарственной устойчивостью *M.tuberculosis* к основным и резервным препаратам / В.Ю. Мишин, А.Н. Наумова, О.Г. Комиссарова // Туберкулез сегодня: Материалы 7-го Российского съезда фтизиатров. - М.: Бином, 2003. - 257 с.

31. Мишин, В.Ю. Лекарственно-устойчивый туберкулез легких: учебное пособие для врачей / В.Ю. Мишин - М.: МГМСУ, 2005. - 142 с.

32. Мокроусов, И.В. Генетическое разнообразие и эволюция *Mycobacterium tuberculosis*: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.07 / Мокроусов Игорь Владиславович - СПб., 2009. - 41 с.

33. Мокроусов, И.В. «Успешный» российский клон *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148: возникновение и текущее распространение / И.В. Мокроусов // Сборник тезисов III национального конгресса ассоциации фтизиатров. – 2014. – С. 57-58.
34. Молекулярно-генетическая диагностика туберкулёза методом ПЦР в реальном времени. Технология «АМПЛИТУБ». Режим доступа: <http://syntol.ru/upload/iblock/668/668cfb7845b8f32a223124ad74a3a780.pdf>
35. Морозова, Т.И. Молекулярно-генетический анализ штаммов *M.tuberculosis* в Саратовской области / Т.И. Морозова, Т.Ю. Салина, А.Н. Данилов // сборник тезисов III национального конгресса ассоциации фтизиатров. – 2014. – С. 67.
36. Нарвская, О.В. Геномный полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis* и его роль в эпидемическом процессе: автореф. дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07 / Нарвская Ольга Викторовна - СПб., 2005. - 30 с.
37. Нечаева, О.Б. Ситуация по туберкулезу и работе противотуберкулезной службы Российской Федерации в 2013 году. Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза. Режим доступа: http://www.mednet.ru/images/stories/files/CMT/Tb_rf_2013_2.pdf.
38. Нечаева, О.Б. Ситуация по туберкулезу в Уральском федеральном округе в 2013 году. Режим доступа: http://www.mednet.ru/images/stories/files/CMT/tb_2013_ural.pdf.
39. Нечаева, О.Б. Ситуация по туберкулезу и работе противотуберкулезной службы Российской Федерации в 2014 году. Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза. Режим доступа: <http://www.mednet.ru/images/stories/files/CMT/2014tb.pdf>;
40. Нечаева, О.Б. Ситуация по туберкулезу в России в 2015 году. Федеральный Центр мониторинга противодействия распространению туберкулеза. Режим доступа: <http://mednet.ru/ru/czentr-monitoringa-tuberkuleza/o-czentre.html>

41. Нечаева, О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в Российской Федерации (основные тенденции). Съезд фтизиатров России «Актуальные вопросы противотуберкулезной помощи в Российской Федерации». X съезд Российского общества фтизиатров. Воронеж. 2015. Режим доступа: http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/epid_situaciya_sezd_ftiziatrov.pdf
42. Подгаева, В.А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу и деятельность противотуберкулезной службы на Урале в 2012 году / В.А. Подгаева; под ред. С.Н. Скорнякова. - Екатеринбург, 2013. - 412 с.
43. Подгаева, В.А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу и деятельность противотуберкулезной службы на Урале в 2014 году / В.А. Подгаева; под ред. С.Н. Скорнякова. - Екатеринбург, 2015. - 425 с.
44. Покровский, В.В. Почему ВИЧ/СПИД в России вновь на подъеме? / В.В. Покровский // ШАГИ профессионал. - 2007. - № 3. - С. 29-32.
45. Приказ Минздрава РФ от 21.03.2003 № 109 "О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации" - М., 2003. - 347 с.
46. Прозоров, А.А. Микобактерии туберкулезного комплекса: геномика, молекулярная эпидемиология, пути эволюции / А.А. Прозоров, В.Н. Даниленко // Успехи соврем. биологии. - 2011. - Т. 13. - № 3. - С. 227–243.
47. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов; под ред. Д.В. Ребрикова // М.: Бином. Лаборатория знаний, 2013. - 223 с.
48. Руководство по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду на биологических микрочипах "ТБ-БИОЧИП-1". Режим доступа: <http://www.biochip-imb.ru/attachments/article/24/ТБ-БИОЧИП-1%20Руководство%20пользователя.pdf>

49. Руководство по применению набора реагентов для выявления микобактерий туберкулезного комплекса и определения их лекарственной чувствительности к фторхинолонам на биологических микрочипах "ТБ-БИОЧИП-2". Режим доступа: <http://www.biochip-imb.ru/attachments/article/3/ТБ-БИОЧИП-2%20Руководство%20пользователя.pdf>
50. Савилов, Е.Д. Эпидемиология туберкулеза на Евро-Азиатском континенте: оценка глобального движения штаммов генотипа «Пекин» / Е.Д. Савилов, В.В. Синьков, О.Б. Огарков. – Иркутск: РИО ГБОУ ДПО ИГМАПО, 2013. – 120 с.
51. Савилов, Е.Д. Пекинский генотип *M. tuberculosis* / Е.Д.Савилов, В.В. Синьков, О.Б. Огарков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 4. – С. 50–53.
52. Самойлова, А.Г. Эффективность комплексного лечения больных МЛУ/ШЛУ туберкулезом / А.Г. Самойлова, Т.Р. Багдасарян, Е.Е. Ларионова, И.В. Сороковиков, Л.Н. Черноусова, И.А. Васильева // Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Туберкулез с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя: ситуация, проблемы и пути решения». М., 2014. Режим доступа: http://roftb.ru/netcat_files/doks/7Samoilova.pdf
53. Синьков, В. В Реконструкция эпидемической истории «пекинского» генотипа *Mycobacterium tuberculosis* в России и странах бывшего СССР по результатам сполиготипирования / В. В. Синьков, Е. Д. Савилов, О. Б. Огарков // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2011. – № 3. – С. 25-29.
54. Скотникова, О.И. Молекулярно-биологические методы во фтизиатрии / О.И. Скотникова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2005. - № 8. - С. 5 - 10.
55. Справка "ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2014 г." Федеральный центр СПИД. Режим доступа: <http://www.hivrussia.ru/files/spravkaHIV2014.pdf>

56. Стерликов, С.А. Результаты лечения пациентов с туберкулёзом / С.А. Стерликов, В.В. Тестов // Съезд фтизиатров России «Актуальные вопросы противотуберкулезной помощи в Российской Федерации». X съезд Российского общества фтизиатров. - Воронеж, 2015. Режим доступа: http://mednet.ru/images/stories/files/CMT/rez_lecheniya.pdf
57. Умпелева, Т.В. Молекулярно-генетическая характеристика клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом в Уральском Федеральном округе Российской Федерации: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Умпелева Татьяна Валерьевна. - Екатеринбург, 2014. - 27 с.
58. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя / И.А. Васильева, В.А. Аксенова, А.Э. Эргешов, А.О. Марьяндышев, А.Г. Самойлова, Т.Р. Багдасарян, О.Г. Комиссарова, О.В. Ловачева, А.В. Перфильев, Н.Л. Карпина, С.И. Каюкова, В.А. Стаханов, С.Н. Скорняков, Г.С. Баласанянц, Т.И. Морозова, Р.Ш. Валиев, Н.Е. Казимирова, Б.Я. Казенный, Н.И. Клевно, Л.А. Барышникова, В.А. Пузанов, С.А. Попов. - Тверь: Триада, 2014. - 72 с.
59. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза / Л.Н. Черноусова, Э.В. Севастьянова, Е.Е. Ларионова, Т.Г. Смирнова, С.Н. Андреевская, С.А. Попов, В.Ю. Журавлев, Пузанов В.А., А.О. Марьяндышев, Д.В. Вахрушева, М.А. Кравченко, С.Г. Сафонова, И.А. Васильева, А.Э. Эргешов. - Тверь: Триада, 2015. - 46 с.
60. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза у ВИЧ-инфицированных / И.А. Васильева, В.А. Аксенова, В.В. Покровский, А.Э. Эргешов, А.О. Марьяндышев, В.Н. Зимина, О.Г. Юрин, А.В. Кравченко, А.М. Пантелеев, И.Б. Викторова, А.Г. Самойлова, З.М. Загдын, Т.Р. Багдасарян, О.Г. Комиссарова, З.Х. Корнилова, Н.Л. Карпина, С.И. Каюкова, В.А.

Стаханов, С.Н. Скорняков, Т.И. Морозова, Р.Ш. Валиев, Н.Е. Казимирова, Н.И. Клевно, Л.А. Барышникова, В.А. Пузанов. - М., 2014.- 38 с.

61. Фролова О.П. Туберкулез у больных ВИЧ-инфекцией: клинико-морфологические и эпидемиологические аспекты / О.П. Фролова // Проблемы туберкулеза. - 2002. - №6. - С.30-33.

62. Фтизиатрия: национальное руководство / Под. ред. М.И. Перельмана. М.: ГЭОТАР МЕДИА, 2007. - 506 с.

63. Хазова, Е.Ю. Сложности диагностики и лечения больных ВИЧ-ассоциированным туберкулезом / Е.Ю. Хазова, Н.А. Иванова // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. - 2014. - Т 4. - № 5. - С. 813.

64. Черноусова, Л.Н. Биологические свойства штаммов *M. tuberculosis* кластера W / Л.Н. Черноусова, С.Н. Андреевская, Т.Г. Смирнова, З.С. Земскова, Е.Е. Ларионова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008. - № 10. -С. 45-50.

65. Черноусова, Л.Н. Преобладание штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области / Л.Н. Черноусова, В.И. Голышевская, С.И. Кузнецов, С.М. Захарова, А.С. Мелентьев, И.М. Федорин, В.В. Николаевский, М. Радди, Я.М. Балабанова, Ф. Дробневский, В.В. Ерохин // Проблемы туберкулеза и болезней легких - 2006. - № 2. - С. 31-37.

66. Alangaden, G.J. Mechanism of resistance to amikacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* / G.J. Alangaden, B.N. Kreiswirth, A. Aouad, M. Khetarpal, F.R. Igno, S.L. Moghazeh, E.K. Manavathu, S.A. Lerner // Antimicrob Agents Chemother. - 1998. - Vol. 42. - P. 1295– 1297.

67. Ali, A. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Central Asian Strain I using mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping / A. Ali, Z. Hasan, M. Tanveer, A.R Siddiqui, S. Ghebremichael, G. Kallenius, R. Hasan // BMC Microbiol. - 2007. - Vol. 7. - e76.

68. Andrews, J.R. Predictors of multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis in a high HIV prevalence community / J.R. Andrews, N.S. Shah, D. Weissman, A.P. Moll, G. Friedland, N. R. Gandhi // PLoS One. - 2010. - Vol. 5(12). - e15735.
69. Asgharzadeh, M. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East Azerbaijan Province of Iran / M. Asgharzadeh, K. Shahbadian, J. Majidi, A.M. Aghazadeh, C. Amini, A.R. Jahantabi // Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. - 2006. - Vol. 101. - P. - 517-521.
70. Banerjee, A. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* / A. Banerjee, E. Dubnau, A. Quemard, V. Balasubramanian, K.S. Um, T. Wilson, D. Collins, G. de Lisle, W.R. Jacobs Jr. // Science. - 1994. - Vol. 263. - P. 227–230.
71. Baulard, A. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria / A. Baulard, J. Betts, J. Engohang-Ndong, S. Quan, R.A. McAdam, P.J. Brennan, C. Loch, G.S. Besra // J. Biol. Chem. - 2000. - Vol. 275. - P. 28326–28331.
72. Bifani, P. J. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family / P.J. Bifani, B.B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M.L. Lutfey, S.L. Moghazeh, W. Eisner, T.M. Daniel, M.H. Kaplan, J.T. Crawford, J.M. Musser, B.N. Kreiswirth // JAMA. - 1996. - T. 275. - № 6. - C. 452-457.
73. Bifani, P.J. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W–Beijing family strains / P.J. Bifani, B. Mathema, N.E. Kurepina, B.N. Kreiswirth // Trends Microbiol. - 2002. - Vol. 10. - P. 45–52.
74. Bodmer, T. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA polymerase influence *in vitro* activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / T. Bodmer, G. Zurcher, P. Imboden, A. Telenti // J. Antimicrob. Chemother. - 1995. - Vol. 35. - P. 345–348.

75. Brudey, K. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology / K. Brudey, J.R. Driscoll, L. Rigouts, W.M. Prodinger, A. Gori, S.A. Al-Hajj, C. Allix, L. Aristimuño, J. Arora, V. Baumanis, L. Binder, P. Cafrune, A. Cataldi, S. Cheong, R. Diel, C. Ellermeier, J.T. Evans, M. Fauville-Dufaux, S. Ferdinand, D. Garcia de Viedma, C. Garzelli, L. Gazzola, H.M. Gomes, M.C. Gutierrez, P.M. Hawkey, P.D. van Helden, G.V. Kadival, B.N. Kreiswirth, K. Kremer, M. Kubin, S.P. Kulkarni, B. Liens, T. Lillebaek, H.M. Ly, C. Martin, Ch. Martin, I. Mokrousov, O. Narvskaja, Y.F. Ngeow, L. Naumann, S. Niemann, I. Parwati, Z. Rahim, V. Rasolofo-Razanamparany, T. Rasolonalana, M.L. Rossetti, S. Rüsch-Gerdes, A. Sajduda, S. Samper, I.G. Shemyakin, U.B. Singh, A. Somoskovi, R.A. Skuce, D. van Soolingen, E.M. Streicher, P.N. Suffys, E. Tortoli, T. Tracevska, V. Vincent, T.C. Victor, R.M. Warren, S.F. Yap, K. Zaman, F. Portaels, N. Rastogi, C. Sola // BMC Microbiol. – 2006. - Vol. 6. - e23.
76. Brudey, K. Long-term population-based genotyping study of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in the French departments of the Americas / K. Brudey, I. Filliol, S. Ferdinand, V. Guernier, P. Duval, B. Maubert, C. Sola, N. Rastogi // J. Clin. Microbiol. - 2006. - Vol. 44. - P. 183-191.
77. Bwanga, F. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis / F. Bwanga, S. Hoffner, M. Haile, M.L. Joloba // BMC Infect. Dis. - 2009. - Vol. 9. - e67.
78. Caminero, J.A. Epidemiological evidence of the spread of a *Mycobacterium tuberculosis* strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island / J.A. Caminero, M.J. Pena, M.I. Campos-Herrero, J.C. Rodriguez, I. Garcia, P. Cabrera, C. Lafoz, S. Samper, H. Takiff, O. Afonso, J.M. Pavon, M.J. Torres, D. vanSoolingen, D.A. Enarson, C. Martin // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2001. - Vol. 164. - P. 1165–1170.
79. Casali, N. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population / N. Casali, V. Nikolayevskyy, Y. Balabanova, S.R. Harris, O. Ignatyeva, I.

Kontsevaya, J. Corander, J. Bryant, J. Parkhill, S. Nejentsev, R.D. Horstmann, T.Brown, F.Drobniowski // Nat. Genet. - 2014. - Vol. 46(3). - P. 279-286.

80. Cecchini, D. Tuberculous meningitis in HIV-infected patients: drug susceptibility and clinical outcome / D. Cecchini, J. Ambrosioni, C. Brezzo // AIDS. - 2007. - № 21. - P. 373-374.

81. Chakraborty, N. Drug susceptibility profile of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from HIV infected and uninfected pulmonary tuberculosis patients in eastern India / N. Chakraborty, C. De, S. Bhattacharyya, A. Mukherjee, S. Santra, D. Banerjee, R.N. Sarkar, S.K. Guha // Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. - 2010. - Vol. 104 (3). - P. 195–201.

82. Cheng, S.J. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada / S.J. Cheng, L. Thibert, T. Sanchez, L. Heifets, Y. Zhang // Antimicrob. Agents Chemother. - 2000. - Vol. 44. - P. 528–532.

83. Chernyaeva, E. Molecular genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains spread in different patient groups in St. Petersburg, Russia / E. Chernyaeva, P. Dobrynin, N. Pestova, N. Matveeva, V. Zhemkov, A. Kozlov // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 2012. - Vol. 31(8). - P. 1753-1757.

84. Cole, S.T. Deciphering the biology of *M.tuberculosis* from the complete genome sequence / S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell // Nature. - 1998. - Vol. 393. - P. 537–544.

85. Cowan, L. S. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial

interspersed repetitive units / L.S. Cowan, L. Mosher, L. Diem, J.P. Massey, J.T. Crawford // J. Clin. Microbiol. – 2002. - Vol. 40. – P. 1592–1602.

86. Cox, H.S. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia / H.S. Cox, T. Kubica, D. Doshetov, Y. Kebede, S. Rüsch-Gerdess, S. Niemann // Respir. Res. - 2005. - Vol. 6. - P. 134.

87. Daley, C.L. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms / C.L. Daley, P.M. Small, G.F. Schecter, G.K. Schoolnik, R.A. McAdam, W.R. Jacobs Jr, P.C. Hopewell // N. Engl. J. Med. - 1992. - Vol. 326. - P. 231-235.

88. Daley, C. L. The typically «atypical» radiographic presentation of tuberculosis in advanced HIV disease / C. L. Daley // Tuber. Lung. Dis. - 1995. - № 76. - P. 475 - 476.

89. Das, S. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, south India / S. Das, C.N. Paramasivan, D.B. Lowrie, R. Prabhakar, P.R. Narayanan // Tuber. Lung. Dis. - 1995. - Vol 76. - P. 550–554.

90. Davies, J. Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics / J. Davies, L. Gorini, B. Davis // Mol. Pharmacol. - 1965. - Vol. 1. - P. 93–106.

91. DeBarber, A., Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // A. DeBarber, K. Mdluli, M. Bosman, L.G. Bekker, C.E. Barry 3rd. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2000. - Vol. 97. - P. 9677–9682.

92. Devaux, I. Clusters of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cases, Europe / I. Devaux, K. Kremer, H. Heersma, D. Van Soolingen // Emerg. Infect. Dis. - 2009. - Vol. 15(7). - P. 1052-1060.

93. Duchene, V. Phylogenetic reconstruction of the *Mycobacterium tuberculosis* complex within four settings of the Caribbean region: tree comparative analysis and

first appraisal on their phylogeography / V. Duchene, S. Ferdinand, I. Filliol, J.F. Guégan, N. Rastogi, C. Sola // *Infect. Gen. Evol.* - 2004. - Vol. 4. - P. 5-14.

94. Easterbrook, P.J. High rates of clustering of strains causing tuberculosis in Harare, Zimbabwe: a molecular epidemiological study / P.J. Easterbrook, A. Gibson, S. Murad, D. Lamprecht, N. Ives, A. Ferguson, O. Lowe, P. Mason, A. Ndudzo, A. Taziwa, R. Makombe, L. Mbengeranwa, C. Sola, N. Rastogi, F. Drobniewski // *J. Clin. Microbiol.* - 2004. - Vol. 42(10). - P. 4536-4544.

95. Edlin, B. R. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome / B. R. Edlin, J. I. Tokars, M. H. Grieco, J.T. Crawford, J. Williams, E.M. Sordillo, K.R. Ong, J.O. Kilburn, S.W. Dooley, K.G. Castro, W.R. Jarvis, S.D. Holmberg // *N. Engl. J. Med.* - 1992. - Vol. 326 (23). - P. 1514-1521.

96. Farnia, P. The recent-transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping / P. Farnia, M.R. Masjedi, M. Varahram, M. Mirsaeidi, M. Ahmadi, M. Khazampour, P. Tabarsi, P. Baghei, M. Marjane, M. Bahadori, A.Z. Zarifi, A.A. Velayati // *BMC Infectious Diseases.* - 2008. - Vol. 8. - e109.

97. Finken, M. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot / M. Finken, P. Kirschner, A. Meier, A. Wrede, E. C. Bottger // *Mol. Microbiol.* - 1993. - Vol. 9. - P. 1239–1246.

98. Gandhi, N.R. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa / N.R. Gandhi, A. Moll, A.W. Sturm, R. Pawinski, T. Covender, U. Laloo, K. Zeller, J. Andrews, G. Friedland // *Lancet.* - 2006. - Vol. 368. - P. 1575-1580.

99. Gillespie, S.H. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective / S.H. Gillespie // *Antimicrob. Agents. Chemother.* - 2002. - Vol. 46(2). - P. 267–274.

100. Glynn, J.R. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review / Glynn J.R., Whiteley J., Bifani P.J., K. Kremer, D. van Soolingen. // *Emerg. Infect. Dis.* - 2002. - Vol. 8. - P. 843-849.
101. Gomez, J.E. IS6110 fingerprinting of sensitive and resistant strains (1991-1992) of *Mycobacterium tuberculosis* in Colombia/ J.E. Gomez, C.I. Leon, M. Inirida // *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* - 2002. - Vol. 97. - P. 1005-1008.
102. Gordon, S.V. Genomics of *Mycobacterium bovis* / S.V. Gordon, K. Eiglmeier, T. Garnier, R. Brosch; J. Parkhill; B. Barrell; S.T. Cole; R.G. Hewinson // *Tuberculosis (Edinb).* - 2001. - Vol. 81(1-2). - P.157-163.
103. Gutierrez, M.C. Predominance of ancestral lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in India / M.C. Gutierrez, N. Ahmed, E. Willery, S. Narayanan, S.E. Hasnain, D.S. Chauhan, V.M. Katoch, V. Vincent, C. Locht, P. Supply // *Emerg. Infect. Dis.* - 2006. - Vol. 12. - P. 1367-1374.
104. Hazbon, M.H. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / M.H. Hazbon, M. Brimacombe, M. Bobadilla del Valle, M. Cavatore, M.I. Guerrero, M. Varma-Basil, H. Billman-Jacobe, C. Lavender, J. Fyfe, L. García-García, C.I. León, M. Bose, F. Chaves, M. Murray, K.D. Eisenach, J. Sifuentes-Osornio, M.D. Cave, A.P. de León, D. Alland // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2006. - Vol. 50. - P. 2640–2649.
105. Heifets, L. Clinical mycobacteriology laboratory / L. Heifets, E. Desmond // In: S. Cole, K. Eisenach, D. McMurray, W. Jacobs Jr. (Eds.). *Tuberculosis and the tubercle bacillus*. Washington DC, USA: ASM Press, 2005. - P. 49–70.
106. Heym, B. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / B. Heym, P.M. Alzari, N. Honore, S.T. Cole // *Mol. Microbiol.* - 1995. - Vol. 15. - P. 235–245.
107. Heym, B. Effects of overexpression of the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* / B. Heym, E.

Stavropoulos, N. Honore, P. Domenech, B. Saint-Joanis, T.M. Wilson, D.M. Collins, M.J. Colston, S.T. Cole // *Infect. Immun.* - 1997. - Vol. 65. - P. 1395–1401.

108. Hermans, P.W.M. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains / P.W.M. Hermans, D. van Soolingen, E.M. Bik, P.E. de Haas, J.W. Dale, J.D. van Embden // *Infection and Immunity.* - 1991. - Vol. 59. - P. 2695-2705.

109. Heidelberg, J. F. Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the Co-Evolution of host and viral genomes / J.F. Heidelberg, W.C. Nelson, T. Schoenfeld, D. Bhaya // *PLoS ONE.* - 2009. - Vol.4 (1) - e4169.

110. Homolka, S. High resolution discrimination of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex strains based on single nucleotide polymorphisms / S. Homolka, M. Projahn, S. Feuerriegel, T. Ubben, R. Diel, U. Nübel, S. Niemann // *PLoS ONE.* - 2012. - Vol. 7 (7). - e39855.

111. Honore, N. Streptomycin resistance in mycobacteria / N. Honore, S.T. Cole // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1994. - Vol. 38. - P. 238–242.

112. Hopewell, P.C. Tuberculosis and human immunodeficiency virus infection / P.C. Hopewell, R.E. Chaisson // In: Reichman LB, Hershfield ES (Eds.). *Tuberculosis: a comprehensive international approach.* New York: Marcel Dekker, 2000. - P. 525-547.

113. Johansen, S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs / S. Johansen, C. Maus, B. Plikaytis, S. Douthwaite // *Mol. Cell.* - 2006. - Vol. 23. - P. 173–182.

114. Jones, B.E. Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infections / B.E. Jones, S.M. Young, D. Antoniskis, P.T. Davidson, F. Kramer, P.F. Barnes // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1993. - № 148. - P. 1292–1297.

115. Joseph, B.V. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kerala, India using IS6110-RFLP, spoligotyping and MIRU-VNTRs / B.V. Joseph, S. Soman, I. Radhakrishnan, V. Hill, D. Dhanasooraj, R.A. Kumar, N. Rastogi, S. Mundayoor // Infect. Genet. Evol. - 2013. - Vol. 16. - P. 157-164.
116. Kam, K.M. Optimization of variable number tandem repeat typing set for differentiating *Mycobacterium tuberculosis* strains in the Beijing family / K.M. Kam, C.W. Yip, L.W. Tse, K.L. Leung, K.L. Wong, W.M. Ko, W.S. Wong // FEMS Microbiol. Letters. - 2006. - Vol. 256. - P. 258-265.
117. Kamerbeek, J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology / J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. Van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, J. van Embden // J. Clin. Microbiol. - 1997. - Vol. 35. - P.907-914.
118. Kovalev, S.Y. Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping / S.Y. Kovalev, E.Y. Kamaev, M.A. Kravchenko, N.E. Kurepina, S.N. Skorniakov // Tuberc. Lung Dis. - 2005. - Vol. 9 (7). - P. 746-752.
119. Kremer, K. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility/ K. Kremer, D. van Soolingen, R. Frothingham, W.H. Haas, P.W. Hermans, C. Martín, P. Palittapongarnpim, B.B. Plikaytis, L.W. Riley, M.A. Yakus, J.M. Musser, J.D. van Embden // J. Clin. Microbiol. - 1999. - Vol. 37. - № 8. - P. 2607-2618.
120. Kruuner, A. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia / A. Kruuner, S.E. Hoffner, H. Sillastu, M. Danilovits, K. Levina, S. B. Svenson, S. Ghebremichael, T. Koivula, G. Kallenius // J. Clin. Microbiol. - 2001. - Vol. 39. - P. 3339-3345.

121. Kwara, A. Manifestations and outcome of extra-pulmonary tuberculosis: impact of human immunodeficiency virus co-infection / A. Kwara, S. Roahen-Harrison, E. Prystowsky, P. Kissinger, R. Adams, J. Mathison, N.E. Hyslop // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 2005. - № 9. - P. 485-493.
122. Lemaitre, N. Characterization of new mutations in pyrazinamideresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA / N. Lemaitre, W. Sougakoff, C. Truffot-Pernot, V. Jarlier // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 1999. - Vol. 43. - P. 1761–1763.
123. Lienhardt, C. Estimation of the impact of the human immunodeficiency virus infection on tuberculosis: tuberculosis risks revised? / C.Lienhardt, L.C. Rodriques // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 1997. - Vol. 1(3). - P. 196—204.
124. Lopez, B. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes / B. Lopez, D. Aguilar, H. Orozco, M. Burger, C. Espitia, V. Ritacco, L. Barrera, K. Kremer, R. Hernandez-Pando, K. Huygen, D. van Soolingen // *Clin. Exp. Immunol.* - 2003. - Vol. 133. - P. 30-37.
125. Manca, C. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta / C. Manca, L. Tsenova, A. Bergtold, S. Freeman, M. Tovey, J.M. Musser, C.E. Barry 3rd, V.H. Freedman, G. Kaplan // *PNAS.* - 2001. -Vol. 98 (10). - P. 5752-5757.
126. Matrat, S. Functional analysis of DNA gyrase mutant enzymes carrying mutations at position 88 in the A subunit found in clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones / S. Matrat, N. Veziris, C. Mayer, V. Jarlier, C. Truffot-Pernot, J. Camuset, E. Bouvet, E. Cambau, A. Aubry // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2006. - Vol. 50 (12). - P. 4170–4173.
127. Matteelli, A. Multidrug and extensively drugresistant TB in persons living with HIV / A. Matteelli, M.D. Richardson, G. Sotgiu, R. Centis, G.B. Migliori // *Exp. Rev. Respir. Med.* - 2009. - Vol. 3 (3). - P. 245–254.

128. Maus, C.E. Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / C.E. Maus, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick // Antimicrob. Agents. Chemother. - 2005. - Vol. - 49. - P. 571–577.
129. Mazars, E. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology / E. Mazars, S. Lesjean, A.L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Locht, P. Supply // PNAS. - 2001. - Vol. 98. - P.1901–1906.
130. Mitchison, D.A. The action of anti-tuberculosis drugs in short course chemotherapy / D.A. Mitchison // Tubercle. - 1985. - Vol. 66. - P. 219–225.
131. Mokrousov, I. Russian “Successful” clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening / I. Mokrousov // J. Clin. Microbiol. - 2012. - Vol. 50 (11). - P. 3757–3759.
132. Mokrousov, I. Molecular structure of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia and its interaction with neighboring countries / I. Mokrousov // Int. J. Mycobacteriol. - 2015. - Vol. 1. - P. 56-57.
133. Monedero, I. MDR-/XDR-TB management: what it was, current standards and what is ahead / I. Monedero, J.A.Caminero // Exp. Rev. Respir. Med. - 2009. - Vol. 3 (2). - P. 133-145.
134. Murray, J. Human immunodeficiency virus and the outcome of treatment for new and recurrent pulmonary tuberculosis in African patients / J. Murray, P. Sonnenberg, S.C. Shearer, P. Godfrey-Faussett // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 1999. - Vol. 159 (3). - P. 733-740
135. Nair, J. The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drugresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* / J. Nair, D.A. Rouse, G.H. Bai, S.L. Morris // Mol. Microbiol. - 1993. - Vol. 10. - P. 521-527.
136. Narvskaya, O. Nosocomial outbreak of multidrug resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strain in St. Petersburg, Russia / O.

Narvskaya, T. Otten, E.Limeschenko, N. Sapozhnikova, O. Graschenkova, L. Steklova, A. Nikonova, M.L. Filipenko, I. Mokrousov, B. Vyshnevskiy // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - 2002. - Vol. 21. - P. 596-602.

137. Oelemann, M.C. Assessment of an optimized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing system combined with spoligotyping for population-based molecular epidemiology studies of tuberculosis / M.C. Oelemann, R. Diel, V.Vatin, W. Haas, S. Rüsche-Gerdes, C. Locht, S. Niemann, P. Supply // J. Clin. Microbiol. - 2007. - Vol. 45. - p.691-697.

138. Page, K.R. Tuberculosis-HIV coinfection: epidemiology, clinical aspects, and interventions / K.R. Page, R. Chaisson, P. Godfrey-Faussett // In: M.Raviglione (Ed), Reichman and Hershfield's Tuberculosis. New York: Informa healthcare, 2006. - P. 371-416.

139. Parolina, L. Risk factor associated with multidrug-resistant tuberculosis in rural area of Saratov region, Russia / L. Parolina, T. Morozova // Int. J. Tubercul. Lung Dis. - 2009. - Vol. 13(12). - P.128

140. Pranger, A. Fluoroquinolones, the cornerstone of treatment of drug-resistant tuberculosis: a pharmacokinetic and pharmacodynamic approach / A. Pranger, J. Alffenaar, R. Aarnoutse // Curr. Pharm. Des. - 2011. - Vol. 17(27). - P. 2900-2930.

141. Pym, A.S. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans / A.S. Pym, B. Saint-Joanis, S.T. Cole // Infect. Immun. - 2002. - Vol. 70. - P. 4955-4960.

142. Rad, M.E. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family / M.E. Rad, P. Bifani, C. Martin, K. Kremer, S. Samper, J. Rauzier, B. Kreiswirth, J. Blazquez, M. Jouan, D. van Soolingen, B. Gicquel // Emerg. Infect. Dis. - 2003. - Vol. 9. - P. 838-845.

143. Roza-Anaya, J.C. Molecular tools for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping / J.C. Roza-Anaya, W. Ribón // Rev. salud pública. - 2010. - Vol. 12(3). - P 510-521.

144. Rozwarski, D.A. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis* / D.A. Rozwarski, G.A. Grant, D.H. Barton, W.R. Jacobs Jr., J.C. Sacchettini // Science. - 1998. - Vol. 279. - P. 98-102.
145. Sampson, S.L. IS6110-mediated deletion polymorphism in the direct repeat region of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / S.L. Sampson, R.M. Warren, M. Richardson, T.C. Victor, A.M. Jordaan, G.D. van der Spuy, P.D. van Helden // J. Bacteriol. - 2003. - Vol. 185. - P.2856-2866.
146. Scholten, J.N. Effectiveness of isoniazid treatment for latent tuberculosis infection among human immunodeficiency virus (HIV)-infected and HIV-negative injection drug users in methadone programs / J.N. Scholten, C.R. Driver, S.S. Munsiff // Clin. Infect. Dis. - 2003. - Vol. 37. - P. 1686-1692.
147. Scorpio, A. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the anti-tuberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus / A. Scorpio, Y. Zhang // Nat. Med. - 1996. - Vol. 2. - P. 662-667.
148. Scorpio, A. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / A. Scorpio, P. Lindholm-Levy, L. Heifets, R. Gilman, S. Siddiqi, M. Cynamon, Y. Zhang // Antimicrob. Agents Chemother. - 1997. - Vol. 41. - P. 540-543.
149. Selwyn, P.A. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection / P.A. Selwyn, D. Hartel, V.A. Lewis, E.E. Schoenbaum, S.H. Vermund, R.S. Klein, A.T. Walker, G.H. Friedland // N. Engl. J. Med. - 1989. - Vol. 320. - P. 545-550.
150. Shabbeer, A. TB-Lineage: an online tool for classification and analysis of strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex / A. Shabbeer, L. S. Cowan, C. Ozcaglar, N. Rastogi, S.L. Vandenberg, B. Yener, K.P. Bennett // Infect. Genet. Evol. - 2012. - Vol. 12(4). - P. 789-797.
151. Sheen, P. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru and exploration of phylogenetic associations with drug resistance / P. Sheen, D. Couvin, L.

Grandjean, M. Zimic, M. Dominguez, G. Luna, R.H. Gilman, N. Rastogi, D.A. Moore // PLoS One. - 2013. - Vol. 8(6) - e65873.

152. Sherman, D.R. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria / D.R. Sherman, P.J. Sabo, M.J. Hickey, T.M. Arain, G.G. Mahairas, Y. Yuan, C.E. Barry 3rd, C.K. Stover // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1995. - Vol. 92. - P. 6625- 6629.

153. Siddiqi, S.H. MGIT Procedure Manual for BACTEC MGIT 960 TB System / S.H.Siddiqi, S.Rusch-Gerdes. - 2006. - 89 p.

154. Skuce, R. A. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets / R.A. Skuce, T.P. McCorry, J.F. McCarroll, S.M. Roring, A.N. Scott, D. Brittain, S.L. Hughes, R.G. Hewinson, S.D. Neill // Microbiology. - 2002. - Vol. 148. - P. 519-528.

155. Small, P. M. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco / P.M. Small, , P.C. Hopewell, S.P. Singh, A. Paz, J. Parsonnet, D.C. Ruston, G.F. Schecter, C.L. Daley, G.K. Schoolnik // N. Engl. J. Med. - 1994. - Vol. 330. - P. 1703–1709.

156. Smittipat, N. Identification of possible loci of variable number of tandem repeats in *Mycobacterium tuberculosis* / N. Smittipat, P. Palittapongarnpim // Tubercul. Lung Dis. - 2000. - Vol. 80. - P. 69-74.

157. Smittipat, N. Polymorphism of Variable-Number Tandem Repeats at multiple loci in *Mycobacterium tuberculosis* / N. Smittipat, P. Billamas, M. Palittapongarnpim, A. Thong-On, M.M. Temu, P. Thanakijcharoen, O. Karnkawinpong, P. Palittapongarnpim // J. Clin. Microbiol. - 2005. - Vol. 43. - P. 5034–5043.

158. Sola, C Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis / C.Sola, L. Horgen, J. Maïsetti, A. Devallois, K.S. Goh, N. Rastogi // J. Clin. Microbiol. - 1998. - Vol. 36(4) - P. 1122-1124.

159. Sotgiu, G. Social determinants of MDR-TB in Europe: a multi-centre TBNET study / G. Sotgiu, A. Sorete-Arbore, K. Kliiman // Eur. Respir. J. - 2009. - Vol.34 (53). - P. 4446.
160. Sreevatsan, S. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination / S.Sreevatsan, X. Pan, K.E. Stockbauer, N.D. Connell, B.N. Kreiswirth, T.S. Whittam, J.M. Musser // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1997. - Vol. 94 (18). - P. 9869-9874.
161. Sun, Z. Comparison of *gyrA* gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates / Z. Sun, J. Zhang, X. Zhang, S. Wang, Y. Zhang, C. Li // Int. J. Antimicrob. Agents. - 2008. - Vol. 31. - P. 115-121.
162. Supply, P. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units / P. Supply, S. Lesjean, E. Savine, K. Kremer, D. van Soolinger, C. Locht // J. Clin. Microbiol. - 2001. - Vol. 39. - P. 3563-3571.
163. Supply, P. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Supply, C. Allix, S. Lesjean, M. Cardoso-Oelemann, S. Rusch-Gerdes, E. Willery, E. Savine, P. de Haas, H. van Deutekom, S. Roring, P. Bifani, N. Kurepina, B. Kreiswirth, C. Sola, N. Rastogi, V. Vatin, M.C. Gutierrez, M. Fauville, S. Niemann, R. Skuce, K. Kremer, C. Locht, D.van Soolingen // J. Clin. Microbiol. - 2006. - Vol. 44. - P. 4498-4510.
164. Suzuki, Y. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene / Y. Suzuki, C. Katsukawa, A. Tamaru, C. Abe, M. Makino, Y. Mizuguchi, H. Taniguchi // J. Clin. Microbiol. - 1998. - Vol. 36. - P. 1220-1225.
165. Tagliani, E. Diagnostic performance of the new version (v2.0) of GenoType MTBDRsl assay for detection of resistance to fluoroquinolones and second-line

injectable drugs: a multicenter study / E. Tagliani, A.M. Cabibbe, P. Miotto, E. Borroni, J.C. Toro, M. Mansjö, S. Hoffner, D. Hillemann, A. Zalutskaya, A. Skrahina, D.M. Cirillo // J. Clin. Microbiol. - 2015. - Vol. 53(9). - P. 2961-2969.

166. Takayama, K. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis* / K. Takayama, J.O. Kilburn // J. Antimicrob. Agents Chemother. - 1989. - Vol. 33. - P. 1493-1499.

167. Takiff, H. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations / H. Takiff, L. Salazar, C. Guerrero, W. Philipp, W. M. Huang, B. Kreiswirth, S. T. Cole, W. R. Jacobs Jr., A. Telenti // Antimicrob. Agents Chemother. - 1994. - Vol. 38 (4). - P. 773-780.

168. Tarshis, M.S. Lack of significant in vitro sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide on three different solid media / M.S. Tarshis, W.A. Weed Jr. // Am. Rev. Tuberc. - 1953. - Vol. 67. - P. 391-395.

169. Telenti, A. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* / A. Telenti, P. Imboden, F. Marchesi, D. Lowrie, S. Cole, M. J. Colston, L. Matter, K. Schopfer, T. Bodmer // Lancet. - 1993. - Vol. 341. - P. 647-650.

170. Telenti, A. The *emb* operon, a unique gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol / A. Telenti, W.J. Philipp, S. Sreevatsan C. Bernasconi, K. E. Stockbauer, B. Wieles, J. M. Musser, W. R. Jacobs, Jr. // Nature Med. - 1997. - Vol. 3. - P. 567-570.

171. Török, M.E/ Rapid whole-genome sequencing for investigation of a suspected tuberculosis outbreak / M.E. Török, S. Reuter, J. Bryant, C.U. Köser, S.V. Stinchcombe, B. Nazareth, M.J. Ellington, S.D. Bentley, G.P. Smith, J. Parkhill, S.J. Peacock // J. Clin. Microbiol. - 2013. - Vol. 51(2). - P. 611-614.

172. Tounghousova, O. Spread of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia / O. Tounghousova, P. Sandven, A. Mariandyshev, N. Nizovtseva, G. Bjune, D.A. Caugant // J. Clin. Microbiol. - 2002. - Vol. 40. - P. 1930-1937.

173. Traore, H. Low-cost rapid detection of rifampicin resistant tuberculosis using bacteriophage in Kampala, Uganda / H. Traore, S. Ogwang, K. Mallard, M.L. Joloba, F. Mumbowa, K. Narayan, S. Kayes, E.C. Jones-Lopez, P.G. Smith, J.J. Ellner, R.D. Mugerwa, K.D. Eisenach, R. McNerney // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* - 2007. - Vol. 6. - e1.
174. Vadwai, V. Evaluation of 24-locus MIRU-VNTR in extra pulmonary specimens: study from a tertiary centre in Mumbai / V. Vadwai, A. Shetty, P. Supply, C. Rodrigues // *Tuberculosis (Edinb).* - 2012. - Vol. 92 (3). - P. 264-272.
175. van Deun, A. Evaluation of tuberculosis control by periodic or routine susceptibility testing in previously treated cases / A. van Deun, A. Salim, L. Rigouts, M. Rahman, K. Fissette, F. Portaels // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* - 2001. - Vol. 5 (4). - P. 329-338.
176. van Embden, J. D. A. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standard methodology / J.D.A. van Embden, M.D. Cave, J.T. Crawford, W.J. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick, P.M. Small // *J. Clin. Microbiol.* - 1993. - Vol. 31. - P. 406-409.
177. van Embden, J.D.A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility / J D.A. van Embden , K. Kremer , D. van Soolingen, R. Frothingham, W.H. Haas, P.W. Hermans, C. Martín, P. Palittapongarnpim, B.B. Plikaytis, L.W. Riley, M.A. Yakrus, J.M. Musser // *J. Clin. Microbiol.* - 1993. - Vol. 37 (8). - P. 2607-2618.
178. van Helden, P. D. Strain families of *Mycobacterium tuberculosis* / P.D. van Helden, R.M. Warren, T.C. Victor, G. van der Spuy, M. Richardson, E. Hoal-van Helden // *Trends Microbiol.* - 2002. - Vol. 10 (4). - P. 167-168.
179. van Soolingen, D. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia / D. van Soolingen, L. Qian, P.E.W. de Haas, J.T.

Douglas, H. Traore, F. Portaels, Z. Quing, D. Enkhasaikan, P. Nymadawa, J.D.A. van Embden // J. Clin. Microbiol. - 1995. - V. 33 (12). - P. 3234-3238.

180. Varelzdis, B.P. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations / B.P. Varelzdis, J. Grosset, I. de Kantor, J. Crofton, A. Laszlo, M. Felten, M.C. Raviglione, A. Kochi // Tubercle Lung Dis. - 1994. - Vol. 75. - P. 1-7.

181. Vultos, T. Evolution and diversity of clonal bacteria: the paradigm of *Mycobacterium tuberculosis* / T. Vultos, O. Mestre, J. Rauzier, M. Golec, N. Rastogi, V. Rasolofo, T. Tonjum, C. Sola, I. Matic, B. Gicquel // PLoS One. - 2008. - Vol. 3. - e1538.

182. Wang, J. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure / J. Wang, L. Lee, H. Lai, S.K. Wang, I.S. Jan, C.J. Yu, P.R. Hsueh, P.C. Yang // J. Antimicrob. Chemother. - 2007. - Vol. 59(5). - P. 860-865.

183. Warren, R.M. Microevolution of the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for interpretation of spoligotyping data / R.M. Warren, E.M. Streicher, S.L. Sampson, G. D. van der Spuy, M. Richardson, D. Nguyen, M.A. Behr, T.C. Victor, P.D. van Helden // J.Clin. Microbiol. - 2002. - Vol. 40. - P.4457–4465.

184. Wells, C.D. HIV infection and multidrug-resistant tuberculosis: the perfect storm / C.D. Wells, J.P. Cegielski, L.J. Nelson, K.F. Laserson, T.H. Holtz, A. Finlay, K.G. Castro, K. Weyer // J. Infect. Dis. - 2007. - Vol. 196. - P. 86-107.

185. Weniger, T. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria / T. Weniger, J. Krawczyk, P. Supply, S. Niemann, D. Harmsen // Nucleic Acids Res. - 2010. - Vol. 38. - W326-331.

186. Weniger, T. Online tools for polyphasic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping data: now and next / T. Weniger, J. Krawczyk, P. Supply, D. Harmsen, S. Niemann // Infect. Genet. Evol. - 2012. - Vol. 12(4). - P. 748-754.

187. Williams, D.L. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / D.L. Williams, L. Spring, L. Collins, L.P. Miller , L.B. Heifets , P.R. Gangadharam , T.P. Gillis // Antimicrob. Agents Chemother. - 1998. - Vol. 42. - P. 1853–1857.
188. World Health Organization: Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/CDS/2003.320. - Geneva, 2003. - 73 p.
189. World Health Organization: Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB/2006. - Geneva, 2006. - 361 p.
190. World Health Organization: The use of liquid medium for culture and DST. URL: http://www.who.int/tb/laboratory/policy_liquid_medium_for_culture_dst/en/
191. World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2002-2007. WHO/HTM/TB/2008.394 - Geneva, 2008. - 142 p.
192. World Health Organization: Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB). Expert group report. - Geneva, 2008. - 47 p.
193. World Health Organization: Management of tuberculosis and HIV coinfection : Clinical Protocol for the WHO European Region (2013 revision). Geneva, 2013. - 52 p.
194. World Health Organization: The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Expert group meeting report. Geneva, 2013. - 52 p.
195. World Health Organization: Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. Policy update. Geneva, 2013. - 97 p.
196. World Health Organization: Global tuberculosis report 2015. WHO/HTM/TB/2015.22. - Geneva, 2015. - 204 p.

197. World Health Organization: Implementing tuberculosis diagnostics. Policy framework. WHO/HTM/TB/2015.11. - Geneva, 2015. - 47 p.
198. Zhang, M. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages / M. Zhang, J. Cong, Z. Yang, B. Samten, P.F. Barnes // J. Infect. Dis. - 1999. - Vol. 179. - P. 1213-1217.
199. Zhang, Y. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Zhang, B. Heym, B. Allen, D. Young, S. Cole // Nature. - 1992. - Vol. 358. - P. 591-593.
200. Zhang, Y., Genetics of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / Y. Zhang, A. Telenti // In: G. Hatfull, W.R. Jacobs (Eds), Molecular genetics of mycobacteria. Washington DC, USA: ASM Press, 2000. - P. 235–254.
201. Zang, Y. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / Y.Zang, W.W. Yew // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. - 2009. - Vol. 13(11). - P. 1320-1330.