

**Институт Биохимии и Биотехнологии  
им. С.Дурмишидзе**

**Наталья Шубладзе**

**Молекулярное типирование региональных штаммов  
Mycobacterium tuberculosis  
и оптимизация культуральной диагностики  
туберкулеза в Грузии.**

**Диссертация, представленная на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Специальность - 03.00.07-Микробиология**

**Научные руководители - Доктор медицинских наук Константин Апридонидзе**

**Доктор медицинских наук Серго Вашакидзе**

**Тбилиси - 2006**

## **Оглавление**

**Введение.**

**Цель и задачи.**

### **Раздел I. Обзор литературы**

**Глава 1. Эпидемиология туберкулеза в мире и в Грузии.**

**Глава 2. Традиционные методы типирования микобактерий туберкулеза.**

**Глава 3. Применение молекулярно-биологических методов в эпидемиологии туберкулеза.**

**Глава 4. Молекулярное типирование штаммов микобактерии туберкулеза (ДНК фингерпринтинг).**

**Глава 5. Бактериоскопия, культуральная диагностика, питательные среды.**

**Глава 6. Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к химиотерапевтическим препаратам первого ряда.**

**Глава 7. Молекулярно-генетические методы диагностики МБТ.**

### **Раздел II. Собственные исследования**

**Глава 1. Материалы и методы исследования.**

**1.1 Молекулярное типирование (ДНК фингерпринтинг) штаммов *Mycobacterium tuberculosis*.**

**1.2 Посев клинического материала на питательные среды.**

**1.3 Идентификация выделенных микобактериальных культур.**

**1.4 Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к**

**противотуберкулезным препаратам первого ряда.**

**Глава 2. Результаты собственных исследований**

**2.1 Молекулярное типирование региональных штаммов *M.tuberculosis* в Грузии.**

**2.2 Оптимизация культуральной диагностики туберкулеза в Грузии.**

**2.3 Резистентность *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам первого ряда в Грузии за 2001-2004 гг.**

**Глава 3. Обсуждение результатов.**

**Глава 4. Выводы.**

**Глава 5. Список литературы.**

## Введение

Актуальность темы. Туберкулез является главной причиной смертности, связанной с единичным инфекционным агентом в мировом масштабе. По оценке Всемирной Организации здравоохранения (ВОЗ) общее количество случаев туберкулеза в мире повысился с 7.5 миллионов в 1990 до 10.2 миллионов в 2000 году [126]. Грузия относится к ряду стран с высоким уровнем распространения ТБ, что подтверждается данными Национального Центра Туберкулеза и Легочных Заболеваний (132/100 000 –новые случаи). Важной проблемой сегодня является сам возбудитель заболевания - это повышенная способность к выживанию в среде обитания и все увеличивающееся число устойчивых к противотуберкулезным препаратам первого ряда (стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу) форм, в том числе одновременно к нескольким (поли- и мультирезистентных), особенно у впервые заболевших [33,38] . Микробиологические исследования играют в современных условиях важнейшую роль в выявлении, диагностике и дифференциальной диагностике туберкулеза, выборе лечения, оценке его эффективности и коррекции, а также в определении путей трансмиссии возбудителя.

Особенности природы заболевания туберкулезом, в частности длительность инкубационного периода, множественная лекарственная устойчивость (MDR) и отсутствие надежных методов доказательства идентичности штаммов затрудняют не только лечение, но и эпидемиологические исследования в очагах. До последнего времени определение передачи клонов МБТ от индивидуума к индивидууму было трудно-, если вообще не невыполнимой задачей, фаготипированием или определением какого-либо особенного профиля резистентности можно было идентифицировать лишь субгруппы штаммов [102]. Только с недавних пор, с развитием молекулярных методов, основанных на распознавании последовательностей ДНК и их перегруппировок, стало возможным осуществить молекулярное (генное) типирование ДНК отдельных штаммов *M.tuberculosis* [107,76]. В эпидемиологии туберкулеза в Грузии сегодня используются методы, базирующиеся на сборе вербальной информации от пациентов, медицинских картах и сравнении профилей резистентности выделенных штаммов. При этом не существует надежных доказательств того, что данный профиль резистентности подтверждает или отрицает связь инфицированного с предполагаемым источником. Последние достижения молекулярной

биологии в сочетании с успехами в области молекулярной генетики микобактерий позволили разработать метод геномной дактилоскопии (фингерпринтинга), позволяющий дифференцировать штаммы на основе выявления различий в количестве копий и локализации на хромосоме бактерий элементов инсерционных последовательностей, в частности IS6110 [117]. Эта последовательность является стабильной для микобактерий туберкулеза, встречается в геноме в определенном количестве повторов, уникальном для каждого клона и поэтому была выбрана в качестве надежного показателя для дифференциации штаммов [115,116]

«Золотым стандартом» диагностики туберкулеза ВОЗ признает выделение культуры *M.tuberculosis* от пациента [59]. В Грузии традиционной средой для выделения микобактерии является твердая яичная среда Левенштейн-Йенсена. К ее достоинствам относится простота приготовления, дешевизна, низкий уровень контаминации, долгота хранения. Вместе с тем, культуральное исследование клинических изолятов на содержание микобактерий туберкулеза всегда было проблематичным с точки зрения скорости проведения анализа. Получение культуры на среде Левенштейн-Йенсена длится от 3 до 8 недель и это является одним из главных недостатков этой среды. После выделения культуры еще минимум три недели требуется для определения лекарственной устойчивости выделенного штамма. Вместе с тем в разных странах мира для выделения культуры *M.tuberculosis* успешно используют в рутинной работе бактериологических лабораторий такие среды, как агар Миддлбрук 7H10, а также пробирки MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tubes), содержащие бульон Миддлбрук 7H9 с флуоресцентным маркером. Эти среды значительно сокращают время культурального исследования [3, 87, 14], кроме того они просты в приготовлении и использовании и имеют продолжительный срок хранения (до 6 месяцев).

#### **Цель и задачи исследования**

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилось проведение молекулярного типирования региональных штаммов *M.tuberculosis*, а также оптимизация культуральной диагностики туберкулеза в Грузии.

Для достижения поставленной цели мы выдвинули следующие задачи:

- Провести молекулярное типирование региональных штаммов *M.tuberculosis* и изучить особенности их генотипов.
- Изучить профили резистентности *M.tuberculosis*.

-Установить взаимосвязь между профилем резистентности и генотипом штаммов *M.tuberculosis*.

- Изучить перспективы применения данных молекулярного типирования в эпидемиологических исследованиях туберкулеза в качестве трассерного маркера.

- Определить уровень и структуру типов резистентности *M.tuberculosis* при первичных и вторичных случаях заболевания туберкулезом в Грузии.

- Внедрить и оценить эффективность новых питательных сред для культуральной диагностики туберкулеза в Грузии.

Научная новизна работы. За период с 2001 по 2004 год впервые в Грузии была проведена работа в направлении молекулярной эпидемиологии – выделение чистых культур микобактерий туберкулеза, экстракция бактериальных ДНК и проведение анализа полиморфизма длин элементов рестрикции (RFLP, молекулярное типирование). Полученные профили гибридизации могут использоваться для микробиологического мониторинга биологических характеристик возбудителя и его топографии в Грузии, поиска источников инфекции и слежения за путями ее распространения. Авторадиографии показали большое генетическое разнообразие штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Грузии, показали связь между профилями резистентности и профилями гибридизации, было установлено количество копий инсерционного элемента *IS6110*, характерное для региональных штаммов *M.tuberculosis*. В целом данные молекулярного типирования вносят вклад в эпидемиологию туберкулеза в Грузии.

В проведенном исследовании впервые в Грузии для лабораторной диагностики туберкулеза были использованы среды агар Миддлбрук 7Н10 и Пробирки MGIT(с модифицированным бульоном Миддлбрук 7Н9). Они позволили сократить сроки исследования в несколько раз, так, что в конечном итоге, на выделение культуры и получение результатов лекарственной устойчивости может уйти до 1-1.5 недель. Была изучена резистентность региональных штаммов *M.tuberculosis* и проанализирована при помощи компьютерной программы Epi-Info, 6 version.

Практическая ценность. Молекулярное типирование штаммов *M.tuberculosis* окажет большую помощь в проведении эпидемиологических исследований и планировании стратегии контроля туберкулеза в Грузии. Результаты исследования дают обоснование для внедрения в практику лабораторной диагностики агаровой среды Миддлбрук 7Н10 и

пробирок MGIT как для выделения культуры микобактерий туберкулеза, так и для постановки теста на лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам.

## **Раздел I. Обзор литературы.**

### **Глава 1. Эпидемиология туберкулеза в мире и в Грузии**

Туберкулез (ТБ) является главной причиной смертности, связанной с единичным инфекционным заболеванием в мировом масштабе. Известно, что приблизительно 1,7 миллиардов людей были инфицированы *M. tuberculosis* до 1990г, большинство из них живут в развивающихся странах. По оценке Всемирной Организации здравоохранения (ВОЗ) общее количество случаев туберкулеза в мире повысился с 7.5 миллионов в 1990 до 10.2 миллионов в 2000 году [126]. Основные эпидемиологические показатели этого заболевания в странах Западной Европы, в США и Канаде с 90-х годов начали повышаться. Согласно данным ВОЗ в 2003 году было выявлено 8,8 млн новых больных туберкулезом (140/100 000 человек населения), из которых 3,9 миллиона (62/100 000) имели положительный мазок и 674 000 (11/100 000) были инфицированы вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Распространенность составила 15,4 млн случаев (245/100 000), включающих 6,9 млн случаев положительного мазка (109/100 000). В 2003 году от туберкулеза умерли по оценкам 1,7 млн человек (28/100 000), в том числе ВИЧ-коинфицированные лица (229 000) [20,126]. Такое увеличение частично связано с ростом численности населения в развивающихся странах и, частично, с распространением ВИЧ инфекции. Количество людей умерших от туберкулеза ежегодно существенно превышает число случаев смерти, обусловленной каким-либо другим единичным патогенным микроорганизмом. Туберкулёз, поражая преимущественно взрослых людей в самом продуктивном периоде жизни, влечёт за собой колоссальные экономические издержки.

*В развивающихся странах.* Уровень смертности в Европе и США снизился от 300 (на 1850г) до 1-2 на 100 000, тогда как в развивающихся странах этот спад намного меньше: от 100 до 50 на 100 000 [83]. Из-за менее эффективного применения химиотерапии и резкого возрастания количества населения, число случаев смертности от ТБ за год достигло 2,7 миллионов, и не намечается никакой тенденции к его снижению отсутствие

репрезентативных статистических данных по многим странам смазывает картину, однако можно с уверенностью сказать, что наибольшее количество случаев относится к Азии, тогда как наивысшая заболеваемость отмечена в Суб-Сахаральном регионе Африки [51]. Анализ эпидемиологических тенденций указывает на то, что во всем мире показатель

Figure 1. TB Cases in the Republic of Georgian Georgia

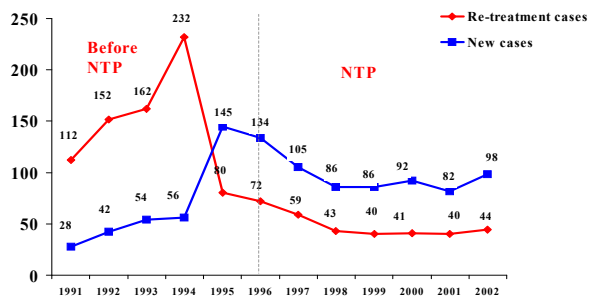


Рис. 1. Случаи туберкулеза в Грузии, 1991-2002гг. Красная кривая-леченные случаи, синяя –нелеченные (новые) случаи.

заболеваемости туберкулезом продолжает возрастать, однако распространенность и показатели смертности сокращаются. Возможность сокращения бремени туберкулеза в достаточной мере, позволяющей достичь к 2015 году Цели тысячелетия в области развития, зависит от быстроты реализации программ ДOTS разнообразными провайдерами медико-санитарной помощи и от того, насколько эффективно их удастся приспособить к решению

Figure 2. Primary Drug Resistance in Civilians

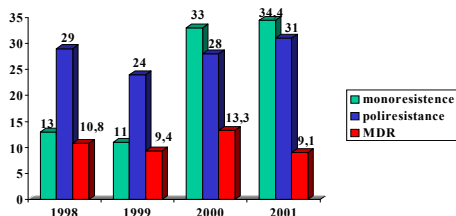


Рис.2.Первичная резистентность в Грузии, 1998-2001гг, гражданское население

проблем в виде ВИЧ-коинфекции (особенно в Африке) и резистентности к лекарственным препаратам (особенно в Восточной Европе). На масштабы проблемы ТБ влияет много факторов, но наиглавнейшие из них – это: 1. Стадия эпидемии внутри конкретной страны; 2. Эффективность туберкулезной программы; и



### 3. Уровень ВИЧ-инфицированности.

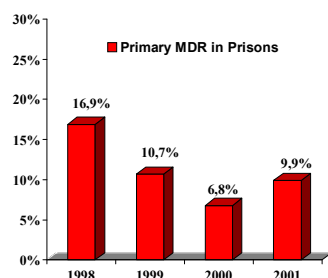
Во многих индустриализированных странах эпидемия ТБ достигла своей вершины еще в 18 веке, тогда как во многих развивающихся странах это произошло намного позднее. Стадия эпидемии отражается возраст-специфичной заболеваемостью и смертностью, и во многих развивающихся странах ТБ – это болезнь молодых взрослых. Правильно проводимая химиотерапия может резко снизить случаи ТБ в обществе, но, из-за недостаточного мониторинга программ лечения во многих странах, даже спасая многие жизни, не все случаи ТБ излечиваются и остаются инфекционными еще долгое время. Другое серьезное последствие неправильного лечения – это развитие лекарственной устойчивости: во многих развивающихся странах первичная ЛУ отмечается в 25% случаев, тогда как вторичная иногда доходит до 75% [51]. Также в развивающихся странах часто встречается ВИЧ-инфекция, она широко распространена в Африке и быстро распространяется в Азии. ВИЧ-инфекция оказывает на ТБ катастрофический эффект, вознося его на пик эпидемии [29, 97]. *В Грузии.* Грузия относится к ряду стран с высоким уровнем распространения ТБ, что подтверждается данными Национального Центра Туберкулеза и Легочных Заболеваний (132/100 000 –новые случаи).

В 1995 году была основана Национальная Программа по Борьбе с Туберкулезом, в рамках которой была разработана стратегия борьбы с этим заболеванием в Грузии и внедрение DOTS (Direct Observed Therapy Short course), короткого курса терапии под наблюдением согласно рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения. Была разработана система дефиниций и отчетные формы. Администрация НТП провела эпидемиологическое исследование по стране, однако, уровень заболеваемости ТБ, несмотря на все принятые меры, снижается очень медленно. (см. Рис. 1) Микробиологическую диагностику туберкулеза стали приводить в соответствие с международными стандартами.

По неопубликованным данным 2002 года было зарегистрировано 6304 случая ТБ, из них 4971-легочной формы и 1331-внелегочной. Анализ проводимого лечения показал, что успешным оно было в 66% мазок-положительных новых случаев. Такой низкий процент свидетельствует о повышенном уровне мультирезистентного ТБ. На рис. 2 и 3 показаны уровни резистентности ТБ среди гражданского населения (Рис.2) и в тюрьмах (Рис.3).

Распространенность туберкулезной инфекции и клинические проявления ее разнообразны. Поэтому понимание эпидемиологии туберкулеза особенно важно, поскольку является

Figure 3. Multi-Drug Resistance in Prisoners



основой для разработки мер профилактики, диагностики, лечения, разработки программ борьбы с туберкулезом для органов здравоохранения. [97]

Рис.3 Мультирезистентность среди заключенных, 1998-2001гг

## Глава 2. Традиционные методы типирования микобактерий туберкулеза

Члены комплекса *M. tuberculosis* дифференцируются по биохимическим признакам и чувствительности к антибиотикам [24]. Классические биохимические тесты, ДНК-ДНК гибридизация, анализ рестрикционной эндонуклеазы [7,56], и секвенирование ДНК [43,44] подтверждают очень тесную связь между организмами. Хотя многие авторы признают членов комплекса *M. tuberculosis* вариантами одного вида, их эпидемиология различается и важность *M. tuberculosis* как патогена заставила признать его за отдельный вид. До появления молекулярных методов самым распространенным способом для дифференциации штаммов ТБ-комплекса и *M. tuberculosis* было фаготипирование [8, 27]. Хотя этот метод трудоемок, а его потенциал невелик из-за ограниченного количества типов микобактериофагов, была показана его практическая польза для типирования штаммов *M. tuberculosis* из различных географических регионов [62], для типирования культур *M. tuberculosis* из вспышек [105], для детекции лабораторных кросс-контаминаций [61] и подтверждения трансмиссии ТБ в церкви [36]. Можно типировать изоляты *M. tuberculosis* тестированием лекарственной устойчивости, но, из-за ограниченного количества моделей резистентности, этот метод может представлять интерес для отслеживания распространения штаммов необычного профиля резистентности. Докладывалось и об альтернативных методах типирования изолятов *M. tuberculosis*, но у каждого из них есть определенные ограничения. Типирование электрофорезом клеточных белков продемонстрировало информативное и изолят-специфичное образование колец [74], но репликаты штаммов не всегда группировались, более того, метод страдает недостатком репродуцибельности и требует электрофореза в полиакриламидном геле. Серотипирование не дает дифференциации между штаммами *M. tuberculosis* [50] и, хотя и наблюдались некоторые биохимические различия [56], проблема состоит в репродуцибельности и ограниченном количестве вариантов штаммов.

### Глава 3. Применение молекулярно-биологических методов в эпидемиологии туберкулеза.

До последнего времени определение передачи клонов МБТ от индивидуума к индивидууму было трудно-, если вообще не невыполнимой задачей, фаготипированием или определением какого-либо особенного профиля резистентности можно было идентифицировать лишь субгруппы штаммов. Только с недавних пор, с развитием молекулярных методов, основанных на распознавании последовательностей ДНК и их перегруппировок, стало возможным осуществить молекулярное (генное) типирование ДНК отдельных штаммов МБТ. Так, на стыке эпидемиологии и молекулярной биологии возникла *молекулярная эпидемиология (МЭ)* [107] - изучение распространения и детерминант возникновения заболевания в человеческих сообществах с использованием методов молекулярной биологии. Эпидемиологические исследования, включающие молекулярное типирование ДНК изолятов МБТ, используются для получения новой информации о распространении микобактерий туберкулеза во время вспышек и мини-эпидемий, для анализа динамики трансмиссии туберкулеза, для различения экзогенной реинфекции от эндогенной реактивации. Кроме того, МЭ используется для определения источника лабораторной контаминации, определения риск-факторов для передачи ТБ в обществе, отслеживания географического распределения и распространения клонов МБТ [66].

Рассмотрим подробнее способы применения молекулярно-биологических методов в эпидемиологии туберкулеза. Идентификации вспышек и анализа динамики трансмиссии ТБ. Вспышки обычно характеризуются передачей возбудителя от определенного источника. По определению все изоляты вспышки должны принадлежать к единому клону [45]. «Неклональность» исключает изолят из определенной цепочки трансмиссии. В идеале, типирование штаммов дает ясную и объективную базу для идентификации штамма, вызвавшего вспышку и отличия его от эпидемиологически несвязанных штаммов. В ареале с высоким уровнем распространенности ТБ в Барселоне (Испания) (163 случая ТБ /100 000) было получено 61,5% соответствия между IS6110-типированием и традиционным трассированием контактов [76]. Исследования молекулярной эпидемиологии показывают, что эпидемиологическое трассирование с использованием типирования ДНК может сослужить хорошую службу в регуляции стратегий в регионах с низким уровнем ТБ, где высока будет

его прогностическая ценность. Стандартизированная процедура генотипирования и существование обширной коллекции профилей гибридизации штаммов МБТ позволяет оценить трансмиссию МБТ между географическими регионами. Экзогенная инфекция или эндогенная реактивация. ТБ, проявляющийся через много лет после первичной инфекции, может являться результатом как реактивации латентной инфекции, так и недавней экзогенной инфекции [79]. Сегодня возможно характеризовать генотип МБТ с помощью молекулярного типирования и показать, вызвано ли данное заболевание тем же самым штаммом, что и предыдущее у того же самого пациента, либо другим. Small с соавт. [101] провели трассирование экзогенной реинфекции мультирезистентным штаммом ТБ у ВИЧ-инфицированных пациентов с помощью IS6110-типирования. Сходные наблюдения были проведены во время исследования в Нью-Йорке в 1984-1992гг [2, 64] и в Сан-Франциско в 1991-1992гг [103]. Таким образом, МЭ, использующая методы ДНК-типирования, может определить соотношение случаев нового инфицирования и реактивации старой инфекции.

Лабораторная контаминация. Очень важно бывает определить, является ли выделение группы культур из изолятов свидетельством истинной вспышки ТБ в определенном месте, или же это-псевдо-вспышка, результат ложно-положительных культуральных анализов в лаборатории. ДНК-типирование является очень достоверным способом для идентификации ложноположительных культур [104]. Изоляты должны быть исследованы методом молекулярного типирования и сравнены с изолятами, полученными в тот же период традиционным путем. Исследования на лабораторную кросс-контаминацию успешно проводились в ряде лабораторий США [24, 63].

Лабораторная инфекция. Работники лабораторий относятся к группе повышенного риска в плане инфицирования, чем население. Как минимум два случая инфицирования в результате работы в лаборатории были доказаны с помощью молекулярного типирования. В первом исследовании было показано, что лаборант был инфицирован референс-штаммом "Erdman", с которым он работал [70]. Второе исследование выявило инфицирование лаборанта клиническим изолятом *M. tuberculosis* во время приготовления суспензии, когда он оцарапал руку о край вытяжного шкафа [86]. Исследования подобного рода позволяют усовершенствовать технику безопасности в лаборатории.

Выявление одновременной инфекции более чем одним штаммом *M. tuberculosis* методом ДНК-типирования. Последние сообщения свидетельствуют о возможности одновременного инфицирования пациента более чем одним штаммом МБТ. Это определение

проводилось фаготипированием еще в 70-е годы [ 27 ], но по ряду причин результаты были нерепрезентативны. С помощью генетического типирования в начале 90-х стало возможным точно определить специфические штаммы МБТ, выделенные от пациентов. Несколько исследователей сообщали об одновременной инфекции двумя и более штаммами МТБ, определенными при помощи ДНК-типирования [114]. ВИЧ-инфицированные пациенты показали наличие парных изолятов, ДНК которых не имели ничего общего, что доказывает инфекцию множественными штаммами. Такого рода инфекция была обнаружена у пациента, от которого были выделены полностью чувствительный и мультирезистентный штаммы с абсолютно разными профилями гибридизации. [106]. Риск факторы и тенденции трансмиссии. Молекулярное типирование в комбинации с традиционными методами эпидемиологии могут быть использованы для идентификации риск-факторов, связанных с новой трансмиссией. Случаями считались пациенты с кластерными профилями гибридизации, а контролями-пациенты с уникальными профилями гибридизации. Риск факторы, связанные с недавней инфекцией, специфичны для конкретного сообщества, прочие же обычны для ТБ пациентов географического региона. Географическое распределение и диссеминация туберкулеза. Между географической локацией и количеством копий в профиле гибридизации может существовать связь. В одном из ранних исследований с помощью IS-типирования, было показано, что штаммы МБТ из центральной Африки, где ТБ высокоэндемичен, более связаны между собой, нежели штаммы из Нидерландов, где уровень трансмиссии низок и большинство случаев ТБ связано с реактивацией латентной инфекции [16, 118]. Некоторые штаммы, идентифицированные во время вспышек, были объединены в большие, широко распространенные кластеры, что свидетельствует об их повышенной трансмиссивности. Самый распространенный пример диссеминации специфического клона *M. tuberculosis* – это мультирезистентные штаммы Beijing/W (Пекин/W) [46]. Эти штаммы были выявлены во многих (в том числе смертных) случаях ТБ среди пациентов и медработников в нозокомиальных вспышках в Нью-Йорке в 1990 году [10]. Позднее этот штамм был выявлен и в других регионах США. В конце 90-х штамм W был признан членом семейства генотипа Beijing (Пекин). Исследование, проведенное в Пекине (Китай) показали, что 85% изолятов являлись штаммами, имеющими 66% сходства по профилям гибридизации IS6110. Позднее большой процент штаммов «Пекинского семейства» был выявлен в России и в Эстонии [46]. Трансмиссия резистентных штаммов. Не существует доказательств

пониженного риска инфекции среди лиц, контактирующих с пациентами с резистентными видами легочного ТБ [11]. Пока никем не доказано, что резистентные штаммы распространяются быстрее. Это было показано и математическим моделированием относительной трансмиссии резистентных и чувствительных штаммов [38]. Исследования, касающиеся снижения бактериальной трансмиссивности, главным образом относятся к штаммам, резистентным к изониазиду [4]. Изониазид является ключевым компонентом курса лечения ТБ. Специфические мутации и делеции внутри *KatG*-гена изониазид-резистентных штаммов МБТ были связаны со снижением их патогенности. Наиболее часто встречающаяся мутация *KatG*-гена с заменой серина на треонин (S 315T) связана с клинически значимым уровнем изониазид-резистентности. Таким образом секвенирование генома и молекулярная эпидемиология раскрывают генотипические и фенотипические связи [76,100]. Полная последовательность генома МБТ дает нам огромное количество информации, расширяющее возможности исследования в области молекулярной эпидемиологии и генома микобактерий. Существует ряд методов молекулярного типирования, позволяющих идентифицировать отдельные штаммы или клональные группы по фенотипическим особенностям для изучения генетического обоснования этих особенностей. Штаммы исследуются на специфические различия в корреляции с бактериальными фенотипами, такими как тканевой тропизм, вирулентность, трансмиссивность, патогенез, антигенность, резистентность к антимикробным агентам и иммуногенность [12,34,131]. При понимании специфического полиморфизма, делеций или других изменений в генотипе штаммов можно выявить казалось бы случайные связи. Последующие исследования могут быть сконцентрированы на фенотипических характеристиках, генной экспрессии и генотип-фенотип корреляции у штаммов МБТ. Методы МЭ будут продолжать играть важную роль в идентификации подходящих мер здравоохранения и оценке их эффективности [97,11]. Хотя нельзя не заметить, что большинство этих исследований проводятся в индустриальных странах, где в общем-то заболеваемость туберкулезом низка [103]. Наблюдается насущная необходимость провести дополнительные исследования в различных географических регионах с высоким уровнем заболеваемости ТБ [95,99]. Необходимо лучшее понимание эпидемиологии ТБ, не использование молекулярной эпидемиологии просто как способа молекулярного типирования, а поиск путей использования этого способа для ответа на важнейшие вопросы здравоохранения [81,75, 76].

#### Глава 4. Молекулярное типирование микобактерий туберкулеза (ДНК фингерпринтинг).

При дифференциации бактериальных штаммов часто используются как мишени повторяющиеся элементы и инсерционные последовательности. Некоторые из этих элементов были охарактеризованы для ТБ-комплекса и признаны мобильными генетическими элементами [91,31]. Первые сообщения о дифференциации штаммов комплекса *M. tuberculosis* и отдельных штаммов с использованием технологий, основанных на нуклеиновых кислотах, базировались на штаммоспецифических различиях и частоте отдельных последовательностей в хромосомной ДНК, которую выделяли с помощью специфичных рестрикционных энзимов и последующем анализе полученных образцов после разделения фрагментов ДНК на агарозном геле [22, 23, 84].

Таблица 1 суммирует повторяющиеся последовательности членов ТБ-комплекса и некоторых других видов микобактерий. Для использования повторяющихся последовательностей в эпидемиологических исследованиях, положение последовательности в бактериальном геноме должно быть достаточно стабильным, но при этом должен присутствовать полиморфизм между различными штаммами. Первой была охарактеризована повторяющаяся последовательность ДНК, могущая быть использованной в эпидемиологии в геноме бактериального семейства IS3 [71]. Эта последовательность была обнаружена анализом Southern blotting [41], она показывает гомологию с плазмидой, изолированной из *M. fortuitum* [130] и, в зависимости от организма, из которого она была выделена, называется IS6110 или IS986 (*M. tuberculosis*) или IS987 (*M.bovis* BCG) [28, 39, 54, 115,116]. Это - последовательность длиной в 1 361 пар нуклеотидов обнаруживается исключительно у членов ТБ-комплекса с возможной разницей в несколько нуклеотидов. Последовательность окружена повторами в 28 базовых пар и имеет две открытые рамки считывания (ORF), показывающие гомологию с генами, кодирующими предположительно транспозазы других элементов семейства IS3, и которые являются типичными признаками мобильных элементов. Хотя транспозиция IS6110 у *M. tuberculosis* еще не была экспериментально

продемонстрирована, мобильность IS986 наблюдалась у *M. smegmatis* [42]. Количество копий IS6110 в геноме штаммоспецифично; у большинства штаммов *M. tuberculosis* геном содержит от 8 до 15 копий в различных позициях, хотя докладывалось и о штаммах, имеющих всего одну копию. Очевидно, что положение IS6110 в некоторых штаммах BCG и однокопийных штаммах *M. tuberculosis* достаточно стабильно и находится внутри так называемой «региона горячей точки интеграции»; мультикопийные штаммы почти всегда несут IS6110 внутри этого сайта, а очень малое количество штаммов либо не содержат копий IS6110 в данном положении, либо содержат две [55]. Эта «горячая точка» характеризуется также присутствием фактически идентичных прямых повторов (Direct Repeats, DR), перемежающихся разделительной ДНК, спейсерами, которые в свою очередь могут служить эпидемиологическими маркерами.

Коллинз и Стефенс (1991) [23] идентифицировали инсерционную последовательность IS1081 в 1 324 базовых пар, типичную для ТБ-комплекса и с гомологией к IS 256 у *Staphylococcus aureus*. Сходная с IS6110, IS1081 окружена 15-бп инвертированными повторами и имеет ORF с гомологией к предполагаемой транспозазе. Однако, ее мобильность ни разу не была продемонстрирована и низкая транспозиционная активность проявляется в очень ограниченном уровне полиморфизма [120,118]. Также номер копий IS1081 ниже, чем IS6110, что ограничивает ее использование в эпидемиологических исследованиях для дифференциации *M. bovis*-BCG от других членов ТБ-комплекса [118].

В геноме членов ТБ-комплекса были идентифицированы еще некоторые повторяющиеся последовательности. «Горячая точка» интеграции IS6110 содержит переменное количество прямых повторов в 36 бп, разделенных неповторяемыми спейсерными последовательностями в 35-41 бп. И количество DR (от 10 до 50 копий), и присутствие определенного спейсера меняется от штамма к штамму, давая возможность использовать их в различных методах фингерпринтинга [119]. Типирование штаммов на базе вариаций в кластере DR было проведено анализом Southern [94,95], а также на основе вариаций внутри кластера DR было разработано два различных ПЦР-базированных метода [5,6].

***Использование инсерционной последовательности IS6110 как маркера для типирования M. tuberculosis: стандартизированный протокол.*** Даже до секвенирования и полной характеристики ценность IS6110 для эпидемиологических исследований была очевидна после



того, как различные штаммы *M. tuberculosis* дали разные картины RFLP после гибридизации с клонированными фрагментами, содержащими вставную последовательность [41, 130], это наблюдение было впоследствии подтверждено многими другими группами исследователей.

Таблица 1. Повторяющиеся последовательности ДНК у *M. tuberculosis*.

Repeated sequence	Host range	Copy number	Polymorphism
IS6110 (IS986, IS 987)	<i>M. tuberculosis</i>	0 - 20	Yes
	<i>M. africanum</i>	0 - 20	Yes
	<i>M. bovis</i>	1 - 20	Yes
	<i>M. bovis</i> -BCG	1 - 2	No
IS1081	<i>M. tuberculosis</i>	5 - 6	Small
	<i>M. africanum</i>	5 - 6	Small
	<i>M. bovis</i>	5 - 6	Small
	<i>M. bovis</i> -BCG	5 - 6	Small
DR cluster	<i>M. tuberculosis</i>	1	Yes
	<i>M. africanum</i>	1	Yes
	<i>M. bovis</i>	1	Yes
	<i>M. bovis</i> -BCG	1	No
MPTR <sup>b</sup>	Tuberculosis complex	+/- 80	Small
PGRS <sup>c</sup>	Tuberculosis complex	26 - 30	Yes

<sup>a</sup>: modified from Poulet et al. 1995b; <sup>b</sup>: also described in *M. kansasii* and *M. goodii*; <sup>c</sup>: also described in *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. gastri* and *M. szulgai*.

Первоначальные исследования стабильности, полиморфизма и числа копий IS6110 продемонстрировали важную эпидемиологическую ценность этой системы. Hermans et al. [54] показали, что пассаж штаммов *M. tuberculosis in vivo* на морских свинках в течение двух месяцев не изменил конфигурации ДНК паразита и та же группа продемонстрировала, что ни долговременный пассаж в культуре макрофагов, ни селекция лекарственной резистентности *in vitro* или *in vivo* не давали изменений в характере RFLP [118]. Однако, оба доклада показали, что IS6110 достаточно мобильна для дифференциации эпидемиологически несвязанных штаммов. Также изоляция отдельных культур от одного и того же индивидуума за период от одного до нескольких лет продуцировали те же конфигурации ДНК [118, 81, 48], а профиль RFLP штаммов, изолированных от пациентов до и после развития резистентности *in vivo* [92] также оставался неизменным. Некоторые исследования показали присутствие от 5 до 15 копий на геном у штаммов из Африки и Европы, но количество копий может быть связано с географическим происхождением, что подтверждено самым высоким содержанием копий у изолятов из Гонконга [30]. Van Soolingen et al. (1993) сообщали, что многие штаммы с Дальнего Востока содержат единственный элемент IS6110, как случилось с 30% штаммов из Индии, в другом исследовании 40% изолятов из Мадраса содержали всего одну копию, или не содержали ни одной [30, 106]. Среди 41 штамма от пациентов вьетнамского происхождения у 5 штаммов была одна копия IS6110, а четыре изолята не содержали ее вовсе

[129]. Некоторые штаммы из Малайзии, Танзании и Омана также содержали одну копию [42]. Интересно, что многие из низкокопийных изолятов, полученных в Танзании [127] и Дании [128] были выделены от пациентов азиатского происхождения. В большинстве случаев, когда присутствует одна копия IS6110, она локализована на 1,5 Кбп фрагменте *PvuII* и в этом случае многие эпидемиологически несвязанные штаммы *M. tuberculosis* дают одинаковую конфигурацию RFLP. Также наблюдалось, что некоторые эпидемиологически несвязанные штаммы *M. tuberculosis*, содержащие две копии IS6110 на фрагментах *PvuII* с идентичными размерами могут быть различены при помощи других методов типирования, что подтверждает предположение о целесообразности использования дополнительных методов типирования при работе со штаммами с низким содержанием копий IS6110 [118]. В 1994г. был разработан стандартизированный протокол метода типирования IS6110 и в настоящее время он считается «золотым стандартом» молекулярного типирования МБТ [102].

**Зонд.** IS- зонд микобактерии приготовлен мечением пероксидазой 245 бп-фрагмента, полученного амплификацией при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) (117). Для амплификации 245 бп фрагмента очищенной хромосомной ДНК *M. bovis* были использованы олигонуклеотиды INS-1 (5'-CGTGAGGGCA TCGAGGTGGC) и INS-2 (5'-GCGTAGGCGTCGGTGA CAAA). [54]

**IS6110.** Физическая карта последовательности IS6110 (Рис.4) показывает, что внутри 1.355-бп элемента могут прикрепляться несколько рестрикционных энзимов. Для получения рестрикционных фрагментов разной длины были успешно использованы *BamHI*, *SstII*, *PstI*, *BstEII*, *BssHII*, и *PvuII*. [18, 29, 42, 118, 130].

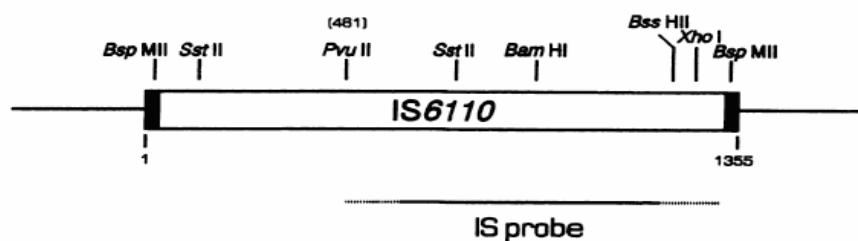
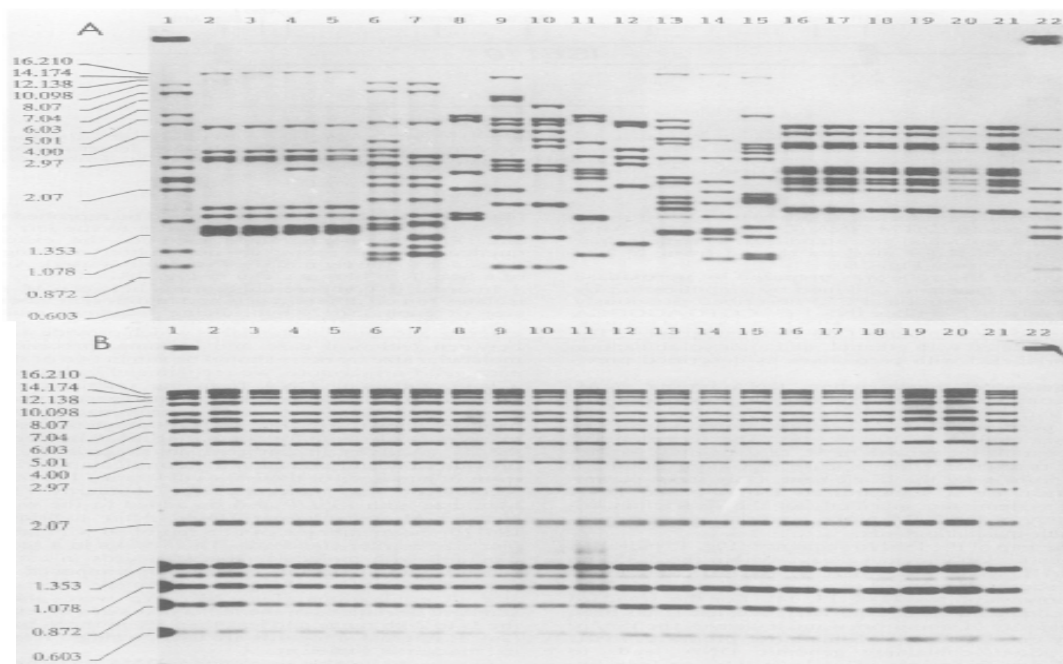


Рис.4 Физическая карта 1.35 кб инсерционного элемента IS6110 *M. tuberculosis*. Сайты прикрепления некоторых рестрикционных энзимов обозначены вертикальными штрихами. *PvuII* режет элемент на базовой паре 461. Следовательно, любой фрагмент ДНК, полученный этим стандартизированным методом, больше 0.9 кб. Закрытые рамки представляют собой 28-бп инвертированные повторы, ограничивающие IS6110. Линии справа и слева схематически изображают хромосомную ДНК. [117]

Для стандартного метода была рекомендована рестриктаза PvuII, так как ее использовали в большинстве лабораторий, а также потому, что она разрезает последовательность IS6110 только один раз. Благодаря этой особенности, обработка при помощи PvuII ДНК, содержащей IS6110, приводит к гибридизации фрагментов как минимум на 0.9 или 0.46 кб, в зависимости от используемого зонда IS6110. Исходя из того, что *M.tuberculosis* обычно содержит от 8 до 20 копий IS6110 [118], использование ДНК зонда, который перекрывает рамки сайта PvuII, приводит к получению от 16 до 40 полос. Такое количество приводит к перегруженности линий полосами с перехлестом. По этой причине был выбран зонд направо от сайта PvuII на физической карте, как показано на рис.1. Это уменьшило количество полос, содержащих IS6110, на фингерпринте до половины максимально возможных. в исключительных случаях, когда дифференциация профилей неадекватна, мембраны можно перезондировать меченой ДНК, содержащей только IS-последовательности налево от сайта PvuII. **Стандарты молекулярной массы.** Иллюстрация Саузерн Блота приведена на **Рис.2а**. Чтобы сравнить фингерпринты изолятов *M. tuberculosis*, прогнанных на разных гелях, сайт каждого IS6110-гибридизационного фрагмента должен быть четко определен. Это требует использования маркеров молекулярной массы, имеющих разброс от 10 до 0.9 кб для большинства гибридизационных фрагментов. Рекомендуется использование комбинации внешних и внутренних стандартов, обеспечивающих компромисс между технической выполнимостью и максимальной точностью. Внешние маркеры молекулярной массы должны прогоняться в 2-3 лунках каждого геля. Более того, следует включить в каждый гель лунку, содержащую ДНК от референс-штамма *M.tuberculosis* Mt14323, который, будучи обработан PvuII и зондирован IS6110, дает 10 приблизительно поровну распределенных полос установленного размера (**Рис.5а**). Хотя использование внешних маркеров вполне допустимо для сравнения малых количеств сходных штаммов (в случае исследования вспышки), оно может не дать достаточной точности для компьютерных сравнений сотен или тысяч штаммов. По этой причине рекомендовано добавление стандартов молекулярных масс, которые не гибридизуются с IS6110, в лунки с нарезанной ДНК *M. tuberculosis*. После гибридизации с IS6110, мембрана может быть перезондирована мечеными стандартами молекулярной массы. Результат будет виден на повторной автордиографии. Вторую автордиографию можно наложить на первую, что даст исключительно точное определение молекулярной массы. (**Рис.5б**).

**Рис.5а-5б.** Фингерпринты штаммов *M. tuberculosis*, полученные по стандартной методике.

Хромосомная ДНК от 22 различных микобактериальных изолятов была обработана рестриктазой *RvuII*, и после смешивания с маркерной ДНК, фрагменты были разделены электрофорезом до утра. Фрагменты были перенесены на фильтры и гибридизированы меченой пероксидазой IS6110-ДНК (а) и меченой пероксидазой маркерной ДНК (б). Линия 22-референс штамм *M. tuberculosis* H37Rv, линии 2-5-штаммы из вспышки туберкулеза в Амстердаме в 1991 году. Все остальные лунки содержат ДНК из эпидемиологически несвязанных штаммов *M. tuberculosis*. Штаммы, соответствующие линиям 16-21 были выбраны из коллекции 200 штаммов, выделенных от жителей Нидерландов. Внутренние маркеры (б) – обработанные *RvuII* суперспиральные ДНК с молекулярными размерами 16.2, 14.2, 12.1, 10.1, 8.07, 7.04, 6.03, 5.01, 4.00, 2.97, и 2.07 kb, а также обработанные *HaeIII* 4X174 с молекулярными размерами 1,353, 1,078, 872, и 603 bp [116]



*Компьютерный анализ* Во время вспышек ТБ в сравнении нуждается относительно небольшое количество конфигураций ДНК и обработка данных может быть проведена визуально без учета внутренних маркеров. Но все большее и большее количество этих конфигураций получается в разных лабораториях и, следовательно, количество сравнительного материала значительно возрастает. Для его анализа необходимо наличие компьютерного обеспечения с нормализацией профилей гибридизации. Одним из самых ранних примеров приложения компьютерного анализа ДНК может служить попытка проанализировать родственность штаммов *Candida albicans*, выделенных в клинических условиях. Учитывались как позиция, так и интенсивность полос, что позволило вычислить значения сходства штаммов и группировки их по признакам родственности с помощью дендрограмм после попарного сравнения [98]. В приложении к типированию микобактерий к анализу был добавлен двухполосной стандарт внутреннего размера, что позволило создать

«библиотеку» нормализованных профилей ДНК известных микобактериальных образцов и идентификацию ограниченного количества неизвестных путем создания вероятностной матрицы [90]. Благодаря характеристике метода RFLP- IS6110 разница в интенсивности полос не учитывается, более того, при наличии большого количества полос коэффициенты симилярности становятся более достоверными [48]. Позднее для хранения и анализа большого количества нормализованных профилей ДНК были созданы такие компьютерные программы как GelCompar (Applied Maths) и BioImage (Millipore Systems), позволяющие визуализацию родственности штаммов путем построения графиков в виде дендрограмм и их сравнение с базой данных.

В Девятом Ежегодном докладе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по эпиднадзору, планированию и финансированию борьбы с туберкулезом содержатся данные всех национальных программ борьбы с туберкулезом (НПБТ), за 10 последовательных лет (1994-2003 гг.) для оценки прогресса в направлении достижения Целей тысячелетия в области развития (ЦТР) в области борьбы с туберкулезом. Пятью задачами ЦТР, имеющими непосредственное отношение к борьбе с туберкулезом, являются: к 2005 году обеспечить диагностирование 70% новых случаев заболевания туберкулезом по положительному мазку и успешное излечение 85 % из них; к 2015 году остановить рост показателей заболеваемости и добиться начала их снижения; в период 1990-2015 гг. снизить вдвое распространенность туберкулеза и смертность от него.

Молекулярное типирование может служить дополнительным методом эпидемиологических исследований для достижения лучшего понимания факторов, влияющих на трансмиссию ТБ в обществе и для оценки региональных программ ТБ контроля с целью улучшения методов борьбы с ТБ. **Bloom et al. (1992)** показали, что трансмиссия мультирезистентного ТБ может быть пресечена при выполнении инструкций Центра по Контролю за Заболеваемостью США, и что молекулярное типирование оказывает неоценимую услугу при принятии решений по стратегии ТБ контроля. Методология, применяемая для молекулярного типирования, строго зависит от поставленных вопросов; стандартизованная методика может использоваться для сравнения штаммов из разных лабораторий, регионов, стран и континентов для лучшего понимания глобальной миграции *M. tuberculosis* [101]. Создание национальных и интернациональных сетей фингерпринтинга

поможет распространить методику. Создание Европейской Общественной Сети лабораторий в Европе-пример такой попытки. Сегодня имеется более 1 000 000 фингерпринтов для сравнения [107]. Попытка создания подобной сети в Латинской Америке была осуществлена под наблюдением Латино-Американской ТБ-сети, при поддержке Университета Объединенных Наций. В Нью-Йорке была создана сеть на базе собственных фингерпринтов. Если возникает необходимость срочной идентификации, применяется метод амплифицированного типирования. Хотя многие из этих методов появились недавно и некоторые из них все еще нуждаются в стандартизации и проверке по целому ряду параметров, предварительные результаты, полученные с их помощью, выглядят очень многообещающе. Возможно, через несколько лет прямо в клиниках, рутинным методом, будут типировать *M. tuberculosis* прямо в клинических изолятах. Фингерпринтинг также может помочь при решении вопросов патогенеза *M. tuberculosis*, в связи с резистентностью и вирулентностью, влияния БЦЖ-вакцинации на ТБ, взаимодействия бактерии и хозяина в специфических обстоятельствах, а также связи между генетикой популяции и чувствительностью к туберкулезу [107].

## **Глава 5. Бактериоскопия, культуральная диагностика, питательные среды.**

Доказательством этиологической связи между патологическим процессом и инфекционным агентом должно служить, согласно постулату Коха, выделение данного инфекционного агента от заболевшего. Обнаружение микобактерий туберкулезного комплекса в клинических образцах является одним из основных диагностических подходов во фтизиатрии [75]. Микробиологические исследования играют в современных условиях важнейшую роль в выявлении, диагностике и дифференциальной диагностике туберкулеза, выборе рациональных схем лечения, оценке его эффективности и коррекции химиотерапевтической тактики, контроле диспансерных контингентов, а также в выявлении нозокомиальной туберкулезной инфекции и определении путей трансмиссии возбудителя. Наличие туберкулезной палочки в клинических образцах выявляется несколькими методами. Лабораторная диагностика обеспечивает выполнение главной задачи диагностики и лечения туберкулеза – выявление у больного МБТ [7, 60]. В лабораторную диагностику на современном этапе входят следующие методики: сбор и обработка мокроты; микроскопическая идентификация МБТ в выделяемых субстанциях или тканях;

культивирование; определение резистентности к препаратам; серологические исследования; выполнение новых молекулярно-биологических методов, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [13, 32, 17]. Сбор мокроты, содержащей МБТ, проводится в специально подготовленном помещении больницы или в амбулаторных условиях. Микроскопия мокроты. Наличие туберкулезной палочки в клинических образцах выявляется несколькими методами. Из них традиционными являются бактериоскопия (световая и люминесцентная) [1]. Уже более 100 лет существует самый простой и быстрый метод выявления кислотоустойчивых микобактерий (КУБ) - это микроскопия мазка. КУБ – микобактерии способные оставаться окрашенными даже после обработки кислотными растворами и могут быть выявлены с помощью микроскопа в окрашенных образцах мокроты. Микобактерии отличаются от других микроорганизмов характерным составом своей клеточной стенки, состоящей из миколовых кислот, которые благодаря своим сорбционным свойствам, обеспечивают способность окрашиваться по методикам, выявляющим КУБ. Резистентность к стандартным методам окрашивания и способность МБТ сохранять раннее окрашивание, является следствием высокого содержания липидов во внешней оболочке клетки. Вообще, грам-положительные бактерии в своем составе, имеют приблизительно 5 % липидов или воска, грам-отрицательные организмы около - 20 % и МБТ примерно 60 %. [135]. Быстрый метод бактериоскопии обладает низкой чувствительностью: для обнаружения микобактерий туберкулеза (МБТ) необходимо, чтобы 1 мл материала содержал не менее 100 тыс. микробных клеток. Люминесцентная микроскопия увеличивает чувствительность бактериоскопии на 10-30%. К недостаткам бактериоскопии относится невозможность идентифицировать принадлежность микобактерии к тому или иному виду, а также определить чувствительность данного штамма к антитуберкулезным препаратам. При антибактериальной терапии обнаружение микобактерий туберкулеза имеет прогностическое значение. Поэтому бактериовыделение оценивается количественно [1, 60, 75]. Золотым стандартом выявления микобактерий признаны *культуральные исследования*. Для посева патологического материала используют яичные среды: Левенштейна–Йенсена, среду Финна П, Петраньяни и др., а также на агаровые и бульонные среды: Миддлбрук, Огава, Школьникова и др. [1, 135, 75, 59]. Количество микобактерий (или колоний в пробирке при культуральном методе исследования) в процессе химиотерапии является ориентировочным

показателем ее эффективности или косвенным свидетельством развития устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам. [57, 52, 21, 59]. Бактериологический посев на специальные среды является более чувствительным методом, нежели бактериоскопия. Для высева необходимо присутствие 20-100 жизнеспособных МБТ на 1 мл материала. Посев материала на среду *Левенштейна-Йенсена* проводят в бактериологической лаборатории. Рост первых колоний на классических средах отмечают через 4-8 нед. Современные методы с использованием высокоселективных агаровых и бульонных сред Миддлбрука позволяют выращивать культуры за 1-2 недели, но идентификация микроорганизма требует дополнительного времени. Современную технику посева считают очень информативной и в развитых странах в настоящее время не проводят биологические пробы с заражением морских свинок [1, 135, 75, 59]. *M. tuberculosis* обладает свойством вырабатывать ниацин, что отличает её от других микобактерий.[135]. Продолжительность роста МБТ ограничивает диагностические возможности клиницистов. МБТ выявляются лишь при 52-65% случаев активного туберкулеза легких, а в клинике внелегочного туберкулеза удельный вес их выявления еще ниже. При туберкулезных менингитах лишь в 3% случаев обнаруживается рост микобактерий на питательных средах. Незначительным является удельный вес высеваемости у больных туберкулезом мочеполовой системы. Частота высева микобактерий туберкулеза при нефротуберкулезе варьирует от 26,7% до 73% случаев [136]. Наблюдаются случаи, когда больные после лечения выделяют значительное количество маложилиеспособных или мертвых МБТ. В таких случаях посева дают отрицательные результаты, и бактериоскопические методы являются единственными, с помощью которых удастся обнаружить возбудителя туберкулеза. Значительные трудности представляет обнаружение микобактерий у лиц со скудным их выделением. Среди впервые выявленных больных у одной трети бактериовыделение является однократным [137]. С этой точки зрения применение агаровых и бульонных сред Миддлбрук представляет собой хороший дополнительный или альтернативный метод выделения культуры микобактерий туберкулеза. [1, 73, 59, 87]

**Питательные среды.** *Среда Левенштейна-Йенсена.* Традиционной для выделения микобактерии является твердая яичная среда Левенштейна-Йенсена. К ее достоинствам относится простота приготовления, дешевизна, низкий уровень контаминации, долгота



хранения. Вместе с тем, она не лишена недостатков. Главным ее недостатком является длительность высеваания-от 3 до 8 недель-микобактерий туберкулеза. Кроме того, если в процессе культивирования появляется рост сопутствующей микрофлоры, он отмечается по всей поверхности питательной среды, из-за чего данные пробы приходится выбрасывать[135]

*Агар Миддлбрук 7Н10* Эта среда используются для выделения и культивирования *M.tuberculosis*. Дюбо и Миддлбрук [35] разработали различные составы питательных сред, содержащих олеиновую кислоту и альбумины, предохраняющие микобактерии от воздействия токсичных веществ и способствующие их росту. Миддлбрук и Кон [73] усовершенствовали среду на основе олеиновой кислоты и альбуминов и обнаружили более быстрый и обильный рост туберкулезных бацилл на среде 7Н10. Кубика и Дай [66] показали более низкий уровень контаминации среды 7Н10 сопутствующей флорой по сравнению со средами, содержащими яичную эмульсию.

*Пробирки MGIT(с модифицированным бульоном Миддлбрук 7Н9). Пробирки MGIT* (Mycobacteria Growth Indicator Tube, MGIT) в настоящее время применяются как мануальная или автоматизированная система и были оценены как быстрый и чувствительный метод для выделения и детекции микобактерий в клинических изолятах [3,14,15, 87]. *MGIT* содержит модифицированный бульон Миддлбрук 7Н9, конъюгированный с сенсором флюоресценции (силикон, импрегнированный пентагидратом рутения), позволяющий определить рост при помощи ультрафиолетового излучения с длиной волны 365 нм. Все среды Миддлбрука (агары и бульоны) требуют обязательной ростовой добавки OADC. Добавка OADC (Middlebrook OADC Growth Supplement) содержит олеиновую кислоту, альбумин, хлористый натрий, глюкозу и каталазу. Олеиновая кислота и другие высокомолекулярные жирные кислоты составляют неотъемлемую часть метаболизма микобактерий, глюкоза используется как источник энергии. Каталаза нейтрализует токсичные перекиси, альбумин предохраняет туберкулезные бактерии от воздействия других токсичных агентов [75]. Сравнительные исследования яичной среды Левенштейн-Йенсена и сред Миддлбрука, агаров и бульонов в пробирках MGIT, позволяют отметить преимущество последних по целому ряду параметров, в частности, по скорости и интенсивности роста, а также по более низкому уровню контаминации [82] .

## Глава 6. Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к химиотерапевтическим препаратам первого ряда.

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

- **монорезистентные** к 1 противотуберкулезному препарату;
- **полирезистентные** к 2 противотуберкулезным препаратам и более, но не к сочетанию изониазида и рифампицина;
- **множественно лекарственно-резистентные**, (мультирезистентные, Multi-Drug Resistant) как минимум к сочетанию изониазида и рифампицина [135].

**Определение критериев лекарственной устойчивости.** Всемирная Организация Здравоохранения приняла следующие критерии лекарственной чувствительности и устойчивости, а также определение поли-и мультирезистентности микобактерий туберкулеза [135, 126]. **Чувствительность** микобактерий к противотуберкулезным препаратам определяется неспособностью штамма расти на среде, содержащий препарат, при стандартных условиях постановки опыта. Чувствительными к данному препарату считаются те штаммы микобактерий, на которые этот препарат в критической концентрации оказывает бактерицидное или бактериостатическое действие в соответствии с принятым критерием устойчивости. **Устойчивость** (резистентность) определяется как снижение чувствительности до такой степени, что данный штамм микобактерий способен размножаться при воздействии на него препарата в критической или более высокой концентрации. Наряду с понятиями "чувствительность" и "устойчивость" к противотуберкулезным препаратам в настоящее время используются также термины, определяющие различные аспекты лекарственной устойчивости. Так, в случае наличия лекарственной устойчивости к двум или более лекарственным препаратам данный штамм

микобактерий определяется как **полирезистентный**. Особое место среди полирезистентных занимают микобактерии, у которых обнаруживается лекарственная устойчивость к двум основным противотуберкулезным препаратам (изониазиду и рифампицину). штаммы, обладающие лекарственной устойчивостью одновременно к изониазиду и рифампицину, независимо от наличия устойчивости к другим противотуберкулезным препаратам, обозначаются как штаммы с **множественной лекарственной устойчивостью** (или штаммы с **МЛУ**, мультирезистентные штаммы). Уровень устойчивости данного штамма в целом выражается той максимальной концентрацией препарата (количество мкг в 1 мл питательной среды), при которой еще наблюдается размножение микобактерий (по числу колоний на плотных средах). Лекарственно-устойчивые микроорганизмы способны размножаться при таком содержании препарата в среде, которое оказывает на чувствительные особи бактериостатическое или бактерицидное воздействие. Для различных препаратов установлена определенная критическая концентрация. Она имеет клиническое значение, так как отражает воздействие препарата на микобактерии туберкулеза в условиях макроорганизма. *Критерием устойчивости микобактериальной популяции называют показатель роста микобактериального пула, выраженный в абсолютных (число КОЕ, колоние-образующих единиц) или относительных единицах (пропорция КОЕ), на питательной среде, содержащей противотуберкулезный препарат в критической концентрации, превышение которого считается наличием признака устойчивости микобактерий.* Противотуберкулезные препараты подразделяют на основные (первого ряда) и резервные (второго ряда). Основные препараты (препараты первого ряда): изониазид (H)- производное изоникотиновой кислоты (ГИНК), рифампицин (R)- полусинтетическое производное Рифамицина В, продуцируемый антибиотик широкого спектра действия *Amicolatopsis mediterranei*, пипразинамид (Z), этамбутол (E)- синтетический препарат с активным действием только в отношении МБТ, стрептомицин (S)- антибиотик широкого спектра действия, продуцируемый *Streptomyces griseus*. Их назначают в виде отдельных или комбинированных лекарственных форм.

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

максимальной терапевтической дозы, фармакокинетики препарата и многих других факторов. Мультирезистентному ТБ уделяется особое внимание, так как лечение пациентов, у которых процесс вызван такими штаммами, представляет большие трудности [126]. Кроме того, некоторые штаммы с множественной лекарственной устойчивостью обладают повышенной способностью к распространению (трансмиссивностью) и вызывают тяжелые прогрессирующие формы заболевания. Резистентность создает эпидемиологически опасную ситуацию, когда здоровое население инфицируется и заболевает устойчивыми к лекарствам микобактериями [126]. Этим штаммам уделяется особое внимание, так как лечение пациентов, у которых процесс вызван такими штаммами, представляет большие трудности. Оно является длительным, дорогостоящим и требует использования препаратов резервного ряда, многие из которых дорогостоящие и могут вызывать тяжелые побочные реакции.[84, 113, 47]. Кроме того, некоторые штаммы с множественной лекарственной устойчивостью обладают повышенной способностью к распространению (трансмиссивностью) и вызывают тяжелые прогрессирующие формы заболевания, нередко приводящие к неблагоприятным исходам [113,20].

***Тесты на лекарственную устойчивость (ЛУ)*** Тесты на лекарственную устойчивость (ЛУ) должны проводиться для каждой первично выделенной культуры возбудителя туберкулеза для выбора эффективного режима химиотерапии. Дополнительно этот тест нужно проводить, если пациент продолжает выделять жизнеспособные микобактерии после трех месяцев лечения, либо в случае реактивации заболевания. Этот подход признан исключительно важным для вспышек мультирезистентного туберкулеза [ 1, 135].

***Метод абсолютных концентраций.*** В большинстве случаев этот метод применяется для непрямого определения лекарственной устойчивости. *Непрямым* методом называется метод определения лекарственной устойчивости после выделения культуры микобактерий. [135] Он позволяет исследовать любое количество микобактерий в диагностическом материале, поскольку для определения лекарственной устойчивости используются штаммы микобактерий, предварительно выделенные на питательных средах. Так как сроки выделения возбудителя на яичных питательных средах составляют не менее 1 - 1,5 месяцев, результаты определения лекарственной устойчивости указанным методом обычно получают не ранее, чем через 2 . 2,5 месяца после посева материала. При определении ЛУ микобактерий этим

методом культура считается чувствительной к той концентрации препарата, которая содержится в среде, если число колоний микобактерий, выросших на одной пробирке с препаратом, не превышает 20, а посевная доза соответствует  $1 \cdot 10^7$  микробных тел. Культура расценивается как **устойчивая** к данной концентрации препарата только при наличии на пробирке с этой концентрацией 20 колоний и более при обильном росте в контрольной пробирке, не содержащей лекарственного препарата. [1,32]. Метод абсолютных концентраций предусматривает использование не только критической, но и максимальной концентрации препарата в среде. Это связано с тем, что расширенное определение уровня лекарственной устойчивости возбудителя позволяет клиницисту варьировать дозировки препаратов и лекарственные режимы, добиваясь более эффективного воздействия препаратов за счет допустимого повышения дозы и использования синергидных и аддитивных свойств различных комбинаций лекарственных препаратов.

**Метод пропорций.** Метод основан на сравнении числа микобактерий выделенной культуры, выросших в отсутствие препарата и в его присутствии в критических концентрациях. Для этого приготовленную суспензию микобактерий, содержащую 1 мг/мл влажного веса микобактерий, разводят до концентрации  $10^{-4}$  и  $10^{-6}$ . Оба разведения суспензии засевают на питательную среду без препарата и на набор сред с разными препаратами. Если на среде с препаратом вырастают колонии, составляющие более 1% от числа выросших на среде без препарата, культура считается устойчивой к данному препарату. Если количество колоний, устойчивых к данному препарату, менее 1%, культура считается чувствительной. [59, 135, 1].

**Метод тестирования лекарственной устойчивости в пробирках MGIT.** Система с индикацией роста по флюоресценции в ультрафиолетовом свете. Пробирки с индикатором роста MGIT (Mycobacterium Growth Indicator Tube) содержат модифицированный бульон Middlebrook 7H9. Встроенный в силикон дна пробирок флюоресцентный компонент чувствителен к присутствию кислорода, растворенного в бульоне. Активно размножающиеся микобактерии поглощают кислород, что позволяет наблюдать интенсивную флюоресценцию при использовании ультрафиолетового света с длиной волны 365 нм. Рост также может быть зафиксирован по наличию неомогенной замутненности - мелких зерен или хлопьев в

культуральной среде. Для определения лекарственной устойчивости требуется от 3-х до 14-ти дней [3, 87, 82].

## **Глава 7. Молекулярно-генетические методы диагностики МБТ.**

Дальнейшее развитие лабораторных методов исследования во фтизиатрии было обеспечено в первую очередь фундаментальными исследованиями в области химии, иммунологии и генетики. В последнее время развиваются методы, объединенные понятием генодиагностика. **Генодиагностика** - это комплекс методов, позволяющих обнаруживать последовательности нуклеиновой кислоты, специфичные для определенного вида возбудителя инфекционного заболевания. Генодиагностика - относительно новый раздел диагностики, возникший гораздо позже методов, основанных на микробиологических и иммунологических принципах [98, 68]. Для обнаружения микроорганизмов, трудно культивируемых в лабораторных условиях, внутриклеточных паразитов, персистирующих форм микроорганизмов, атипичных форм бактерий наиболее рационально и эффективно применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [65,70]. За последние годы в зарубежной печати появились работы, характеризующие ПЦР как метод, обладающий высокой чувствительностью, специфичностью и быстротой (в течение 4–5 часов) выявления МБТ. Эти преимущества позволяют диагностировать возбудителя на ранних стадиях заболевания и в различных биологических материалах [13]. Метод ПЦР основан на ферментативной амплификации выбранных специфических участков генома бактерий рода *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), их дальнейшей детекции и идентификации. В настоящее время существует ряд разработок по использованию ПЦР в диагностике туберкулеза, но до сих пор не найдена оптимальная маркерная последовательность в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, обеспечивающая максимальную специфичность и чувствительность анализа, что препятствует широкому применению ПЦР с целью выявления МБТ в практическом здравоохранении. В 1989 г. А. Brisson-Noel [13] с соавт. одни из первых опубликовали свои материалы, посвященные быстрой диагностике туберкулеза методом ПЦР. Возможности ПЦР-анализа настолько широки, что позволили обнаружить ДНК *M. tuberculosis* в останках людей, умерших за 2000-1500 лет до нашей эры, а

также у перуанских мумий 1000-летней давности. Интереснейшая область исследования, которая открывается благодаря ПЦР–диагностике, – изучение латентной инфекции *M. tuberculosis*. По современной концепции туберкулезной инфекции, из 100 человек, контактирующих с *M. tuberculosis*, 90 могут быть инфицированы, но только у 10 развивается активная болезнь. У остальных 90% инфекция будет оставаться латентной из–за противотуберкулезного иммунитета. Проведение ПЦР–исследований у пациентов из групп риска выявляло больных с отрицательными результатами микроскопии и посевов, но с субклинической инфекцией *M. tuberculosis* [140]. Многие современные коммерческие тесты используют также ДНК-полимеразный метод (полимеразную цепную реакцию, ПЦР-метод), позволяющий обнаруживать в исследуемом материале буквально считанные микобактерий (10-1000 особей) путём идентификации участка ДНК и его многократного повторения (амплификации)[25]. Результат исследования может быть получен в течение 2-х часов. Несмотря на то, что уже имеются коммерческие тест-системы Amplicor и Genprobe, пока широкого распространения ПЦР-метод ещё не получил. На эффективность ПЦР-анализа существенным образом влияет метод обработки клинического материала [76,122,138] . Особенно ярко преимущества ПЦР проявляются при внелегочных формах инфекции, когда туберкулезную этиологию заболевания удавалось установить в 26,5% при помощи ПЦР и в 14,5% при культивировании. [ 132,133].

В таблице 2 приведена сравнительная характеристика по чувствительности и продолжительности исполнения микробиологических методов и ПЦР. [134]

**Таблица 2.** Сравнительная чувствительность и продолжительность исполнения различных лабораторных методов выявления микобактерий туберкулезного комплекса

Метод	Чувствительность	Продолжительность исследования
Микроскопия с окрашиванием по Цилю-Нильсену	100.000 - 1.000.000 МБТ в 1 мл	1 – 2 часа
Люминесцентная микроскопия	10.000-100.000 МБТ в 1 мл	1- 2 часа
Культуральный посев	20-100 МБТ в 1 мл	1- 2 месяца
ПЦР	1-10 МБТ в 1 мл	5 часов

В Грузии молекулярно-генетические методы диагностики туберкулеза в настоящее время применяются на коммерческой основе. Оборудование и реактивы для ПЦР-

лаборатории довольно дороги , сам метод находится на стадии своего развития и еще не стандартизирован, а это значит, что в любом случае требуется микробиологическое подтверждение диагноза туберкулеза.

## **Раздел II. Собственные исследования**

### **Глава 1. Материалы и методы.**

За период 2001-2004 гг. было проведено 2497 посевов клинических изолятов мокроты, полученных от пациентов , находившихся на излечении в Национальном Центре с диагнозом туберкулеза легких, с целью получения культур микобактерий туберкулеза. За это время были получены 1455 культур. 1605 клинических образцов было параллельно посеяно на агаровую среду Миддлбрук 7Н10 и в пробирки с флюоресцентным маркером MGIT. Посевы на среде Левенштейн-Йенсена проводились согласно методике, указанной в рекомендациях ВОЗ по культуральным исследованиям в микобактериологических лабораториях. Для посевов на агаре Middlebrook 7Н10 использовалась методика деконтаминации материалов, указанная в Диагностических стандартах Туберкулеза Центра по Контролю за Заболеваемостью США. **1455** выделенных культур было протестировано на лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам первого ряда (стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу) методом абсолютных концентраций на яичной среде Левенштейн-Йенсена. **486** из них были параллельно протестированы на агаре Миддлбрук 7Н10 методом пропорций и в пробирках MGIT по инструкции производителя. 185 изолятов были исследованы методом молекулярного типирования, из них 40-проанализированы на компьютере при помощи специальной программы.

#### **1.1 Молекулярное типирование (ДНК фингерпринтинг) штаммов *M. tuberculosis*.**

В работе были исследованы 185 штаммов *M.tb*, выделенных в Грузии и протестированных на лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам 1 ряда.

Техника геномной дактилоскопии включает в себя получение культуры *M.tb*, экстракцию ДНК, расщепление рестрикционной эндонуклеазой, Саузерн блоттинг и зондирование IS элемента. Критическими для стандартизованного метода IS6110-RFLP являются три параметра: специфичность рестрикционного энзима, природа ДНК-зонда и



соответствующие стандарты молекулярной массы, которые позволяют провести компьютерный анализ профилей гибридизации. Достаточная культуральная масса была получена путем посева на селективные среды Миддлбрук 7Н10 и 7Н11, а затем- в бульон Миддлбрук 7Н9. Экстракция ДНК и ее последующий разрыв проведены в соответствии со стандартизованным протоколом. Для разрыва ДНК в качестве рестрикционной эндонуклеазы была использована рестриктаза PvuII, благодаря своей способности находить сайт рестрикции IS6110. В качестве стандарта массы был использован JC-standard, CDC, Atlanta. Схематическое изображение метода анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции показано на Рис.6.

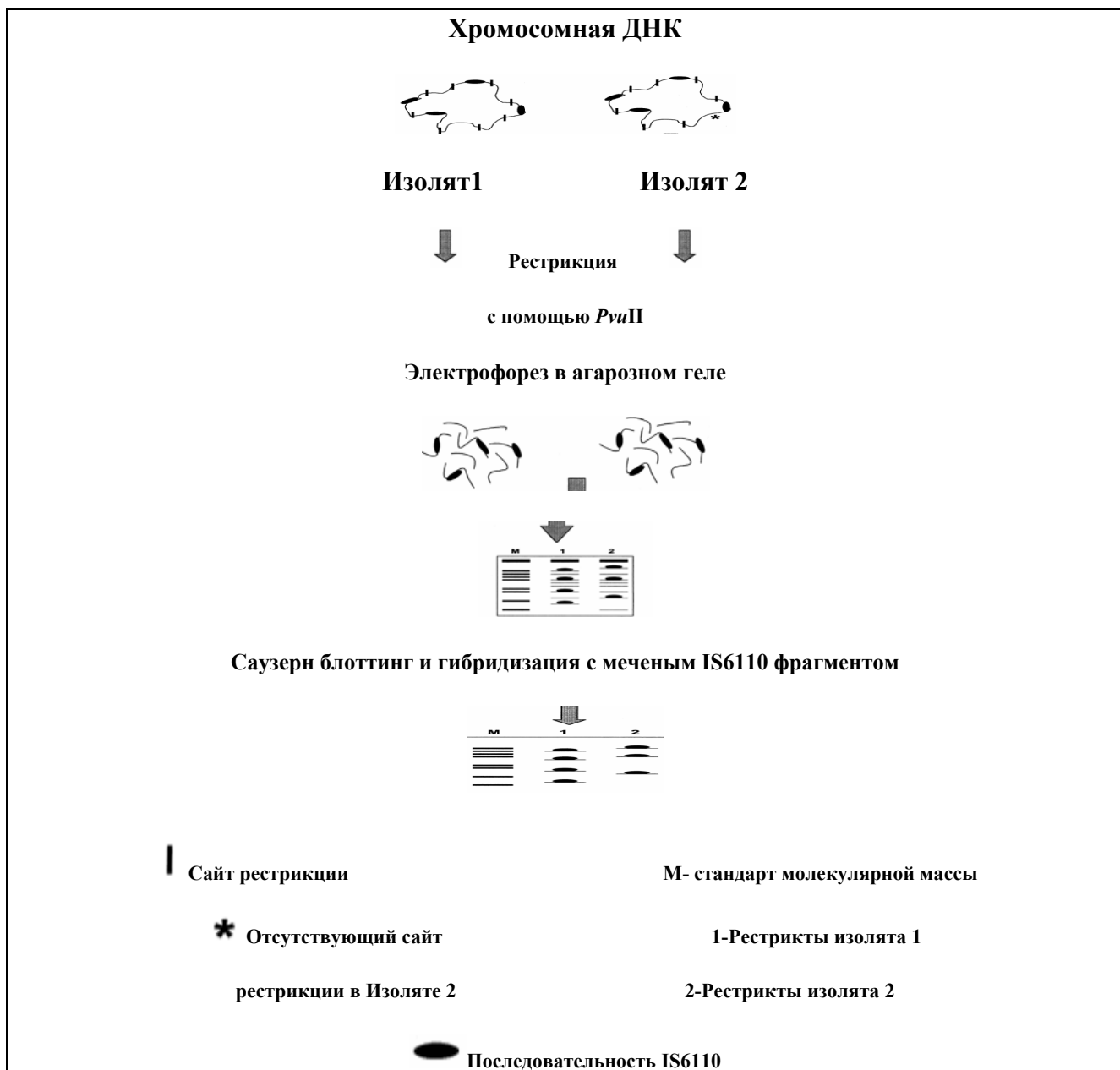
Как видно из рисунка, после обработки ферментами рестрикции образцы ДНК различных изолятов помещают на разные дорожки в гель и проводят *гель-электрофорез*. Далее фрагменты переносятся на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану (процесс *блоттинга*), с которой они прочно связываются. Мембрана помещается в раствор, содержащий ДНК-зонд, где происходит гибридизация зонда с уникальными последовательностями гипервариабельных участков. Затем получают радиоавтограф, на котором профили гибридизации выявляются в виде серии полос, число и положение которых различно для каждого изолята. Полученные профили гибридизации штаммов представляют собой наборы содержащих элемент IS6110 фрагментов рестрикции ДНК, которые различаются по количеству и молекулярной массе. При этом большинство эпидемиологически несвязанных штаммов имеют индивидуальные профили гибридизации [139]. Полученные профили гибридизации были проанализированы при помощи программы Gel compare version 4.2 (Applied Maths Inc., Belgium)

## ЭКСТРАКЦИЯ ДНК

Процедура.

1. Культуры *Mycobacterium tuberculosis*, выращенные в 5.0 ml бульона Middlebrook and Cohn 7Н9 с Tween 80 при 37°C в течение 1-2 недель. Статические условия, без встряхивания при содержании от 5% до 7% CO<sub>2</sub>. Используя пипетку длиной 225mm (Fisher 13-711-38 или эквивалент) перенести 1.5 ml клеток из осадка в 1.5ml микроцентрифужную пробирку (Не встряхивать!). Прогреть клетки в водяной бане при 95°C + в течение 8 мин

Рисунок 6. Метод анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции (RFLP) позволяет различить два изолята МБТ. Хромосомная ДНК из двух клинических изолятов МБТ была обработана рестриктазой *PvuII*. Полученные фрагменты ДНК были прогнаны электрофорезом на агарозном геле вместе со стандартом молекулярной массы. Затем они были перенесены с геля на нейлоновую мембрану блоттингом Саузерна и гибридизированы с нерадиоактивно-меченым элементом IS6110.



2. Отцентрифугировать убитые нагреванием клетки в охлаждаемой центрифуге 1 минуту при 14 000 об/мин, слить надосадочную жидкость. Ресуспендировать бляшку в 500  $\mu$ l 0.1X TE буфера (pH 8.0), перемешать.
3. Добавить 50  $\mu$ l лизоцима (10mg/ml), тщательно перемешать, инкубировать 1 час при 37°C. Каждый раз готовить свежий раствор лизоцима, в это же время поместить СТАВ в водяную баню на 65°C.
4. Добавить 75  $\mu$ l раствора SDS (10%) и 6  $\mu$ l протеиназы К (10 mg/ml), тщательно перемешать и инкубировать 10 мин.при 65°C.
5. Добавить 100  $\mu$ l р-ра NaCl (5M), тщательно перемешать.
6. Добавить 75  $\mu$ l р-ра СТАВ/NaCl, тщательно перемешать, инкубировать 10 мин при 65°C.
7. Добавить 750  $\mu$ l р-ра хлороформа/ изоамилового спирта(24:1), тщательно перемешать переворачиванием, отцентрифугировать 5 мин при комнатной температуре на 14,000 об/мин.
8. Перенести верхний водянистый слой (около 700  $\mu$ l) в чистую маркированную микроцентрифужку.
9. Добавить 700  $\mu$ l холодного изопропанола (-20°C), поместить в морозилку на -20°C на ночь.
10. Отцентрифугировать в охлаждаемой центрифуге 20 мин. при -4°C на 14,000 об/мин. Слить надосадочную жидкость. Осторожно высушить. Сохранить бляшку.
11. Ресуспендировать бляшку ДНК в 500  $\mu$ l холодного 70% этанола (-4°C). Отцентрифугировать на14,000G в течение 5 мин.
12. Слить осадок и высушить в вакуумной сушилке. Добавить 12  $\mu$ l 0.1X TE буфера. Хранить при -4°C до использования.

### **Электрофорез для установления концентрации ДНК.**

1. Приготовить 100 ml буфера из 1% агарозы (1.0 gm/100 ml) в 1X TBE. Поставить в микроволновую печь в режиме разморозки на 3-4 минуты, периодически встряхивать раствор до полного растворения частичек агарозы. Охладить до ~ 50C. Добавить 10  $\mu$ l EtBr и залить гель.
2. Использовать 1 $\mu$ l 1kb маркера и 1 $\mu$ l маркера молекулярной массы (BioRad 170-8207) в отдельных лунках на противоположных сторонах геля.

3. Прогнать 1  $\mu$ l образца на минигеле в течение 45 минут (100v).
4. Установить концентр. ДНК для каждого изолята и отрегулировать до 10 – 20 ng /  $\mu$ l.

### **РЕСТРИКЦИЯ ДНК ПРИ ПОМОЩИ *PvuII***

Процедура:

1. Перенести 10  $\mu$ l нормализованной ДНК в 1.5 ml микроцентрифужку.
2. Приготовить смесь энзимов с *PvuII*.  
Смешать 2.5  $\mu$ l воды ; 1.5  $\mu$ l буфера; 1.0  $\mu$ l энзима
3. Добавить 5.0  $\mu$ l смеси энзима в каждую пробирку.
4. Инкубировать при 37°C в течение 2 часов. За это время приготовить агарозный гель
5. Добавить 1.5  $\mu$ l стоп-микса (Раствор SDS, бромфенола синего, Na<sub>2</sub>EDTA, и глицерина)
6. Начать процедуру электрофореза.

### **ПРОЦЕДУРА ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА ДЛЯ ГЕЛЯ ФИНГЕРПРИНТИНГА**

1. Приготовить большой гель, 20cm X 30 cm. Залить 150 ml 1% агарозы (1.5 gm/150 ml), на 20 лунок. НЕ ДОБАВЛЯТЬ EtBr.
2. Добавить 1kb пробу в первую лунку, контроль 14323 в лунки 2, 9, и 19. Добавить JC стандарт (Jack Crawford, CDC, Atlanta, GA.) в лунки 3, 10, и 30. Добавить образцы (13.5  $\mu$ l) в оставшиеся лунки.
3. Запустить прогон геля на ночь (17 ч) при 35v

### **ПРОЦЕДУРА САУЗЕРН БЛОТТИНГА**

1. По истечении 17 часов остановить электрофорез. (Маркер бромфенол синий дает полосу длиной ок.17см)
2. Снять гель и окрасить его раствором бромистого этидия 1mg/ml в течение 30 мин. Поместить гель под источник УФ излучения и сфотографировать.
3. Обесцветить в dH<sub>2</sub>O в течение 30 мин.

### **Приготовление геля для Саузерн блота.**

1. Погрузить гель в 0.25 N HCL (апуринизация ДНК-облегчает перенос больших фрагментов ДНК с геля на мембраны) на 5 - 10 min. Соблюдать точное время! (растворить 62.5 ml HCL в 250 ml дистиллированной воды).

2. Промыть гель 2-3 раза дистиллированной водой.
3. Обработать гель 250 ml 0.5N NaOH, 1.5 M NaCl в течение 30 min при комнатной температуре. Это денатурирует ДНК. (Добавить 12.5 ml 10N NaOH к 125 ml 3 M NaCl, довести объем до 250 ml дистиллированной водой).
4. Слить денатурирующий раствор. НЕ ПРОМЫВАТЬ ГЕЛЬ!
5. Нейтрализовать гель 0.5 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl в течение 30 min (Добавить 125 ml 1M Tris-HCL к 125 ml 3 M NaCl). Приготовить заранее.

**Проведение Саузерн Блота.** Приготовить прибор Stratagene Posiblitter TM следуя инструкции производителя. Включить на 65mm /Mg в течение от 60 до 90 минут.

Ковалентно связать ДНК с мембраной при помощи набора Stratagene UV Stratalinker, настроенного на “Auto CrossLink” способ.

### **ГИБРИДИЗАЦИЯ И МЕЧЕНИЕ ДНК.**

Процедура: День 1

1. Положить мембрану в гибридизационную пробирку. Добавить 20 ml подогретого (42°) гибридизационного буфера. Инкубировать при 42°С 30 min с вращением.

Подготовка зонда для метки:

2. Денатурировать 10 µl зонда ДНК кипячением в течение 10 мин.
4. Немедленно охладить ДНК во льду 8 мин.
5. Отцентрифугировать пробирку 5 сек на 14,000 об/мин для осадки жидкости
6. Добавить равный объем “DNA labelling reagent” к охлажденной ДНК, помешать пипеткой.
7. Добавить равный объем “раствора глутаральдегида” (объем. равный реагенту метки) помешать пипеткой. Мешать содержимое 1 сек на вортексе.
8. Отцентрифугировать пробирку 5 сек на 14,000 об/мин.
9. Инкубировать 10 мин при 37°С.
10. Добавить меченый зонд в гибридизационную пробирку с мембраной и прегибридизационным раствором.
11. Поместить пробирку в гибридизационную камеру при 42°С **на всю ночь.**
12. Слить гибридизационный раствор, добавить 200 ml подогретой (42°С) первичной промывки, вернуть пробирку в гибридизационную камеру 42°С на 20 мин. с вращением.

13. Слить первичную промывку, добавить 200 ml подогретой (42°C) первичной промывки, вернуть пробирку в гибридизационную камеру 42°C на 20 мин. с вращением.
14. Слить первичную промывку, вынуть мембрану в контейнер, 200 ml вторичной промывки, встряхивать при комнатной температуре 5 мин.
15. Слить вторичную промывку, добавить 200 ml свежей вторичной промывки, встряхивать при комнатной температуре 30 мин.
16. Включить фотопроектор.

#### **ДЕТЕКЦИЯ ДНК (ECL KIT)**

1. Вынуть мембрану из вторичной промывки. поместить на фильтровальную бумагу для удаления излишков буфера, затем положить ее в контейнер.
2. Смешать 15 ml раствора детекции #1 с 15 ml раствора детекции #2
3. Добавить раствор детекции прямо на лицевую сторону мембраны.
4. Инкубировать 1 мин при комнатной температуре.
5. Быстро смыть раствор детекции с мембраны, поместить ее в протектор, предварительно обрезанный и вставленный в кассету пленки.
6. Отнести кассету в темную комнату, выключить свет, положить рентгеновскую пленку поверх мембраны, закрыть кассету для экспозиции.
7. Экспозировать пленку 3 минуты, снять, немедленно заместить свежей пленкой, экспозированную же обработать для установления времени следующей экспозиции.
8. Рекомендованное время экспозиций-3 мин, 20 мин и 4 часа.

Процедура занимает около 1 часа, хотя экспозиция может продлиться всю ночь.

### **1.2 Посев клинического материала на питательные среды.**

Перед посевом клинического материала на питательную среду с целью выделения культуры *M.tuberculosis* проводилась обработка материала миколитическими разжижающими веществами, с целью удаления белковых масс, деконтаминация образца, с целью удаления сопутствующей бактериальной флоры и центрифугирование. Содержимое центрифужной пробирки использовалось для микроскопии, и посева на:

- а) плотную яичную среду (Левенштейна-Йенсена);
- б) агаровую среду ( Миддлбрук 7H10);
- в) на ручную систему бульонного культивирования (MGIT ).

Затем проводилась инкубация, оценка и учет результатов посева диагностического материала. Для гомогенизации и деконтаминации диагностического материала использовались стандартные методы разжижения и деконтаминации: обработка материала 4% раствором едкого натра (модифицированный метод Петрова), применяемая традиционно и метод с использованием N-ацетил-L-цистеина и гидроокиси натрия (NALC-NaOH). Обработка материала по стандартизированному методу Петрова проводилась в соответствии с рекомендациями Всемирной Организации Здравоохранения :

Исследуемый материал, находящийся в стерильной 50 мл. пробирке, заливали двойным объемом 4% раствора едкого натра и тщательно перемешивали на вортекс миксере; выдерживали полученную со щелочью смесь 15 мин при комнатной температуре (не превышая времени экспозиции); пробирки центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин; сливали надосадочную жидкость в емкость с дезинфицирующим раствором, оставив в пробирке 0,8 . 1,2 мл осадка; к осадку добавляли титрованием 10% раствор соляной кислоты, содержащий индикатор феноловый красный до получения нейтрального значения *pH*, определяемого сменой цвета раствора с фиолетового на желтый.

*Метод с использованием N-ацетил-L-цистеина и гидроокиси натрия (NALC-NaOH)*  
Применение муколитического препарата *NALC*, используемого для быстрого разжижения мокроты, позволяет снизить концентрацию деконтаминирующего вещества (*NaOH*) до конечной концентрации 1%. Цитрат натрия включен в литическую смесь для связывания ионов тяжелых металлов, которые могут присутствовать в пробе и инактивировать действие N- ацетил-L-цистеина. Это более мягкая деконтаминация, при ее применении погибает около 30% микобактерий **(8)**, что, конечно, улучшает высеваемость образцов.

В работе использовался коммерческий набор для деконтаминации-разжижения BBL™ Мусоргер™, в который входит: NaOH- 20.0г; Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>X2H<sub>2</sub>O(три натрий цитрат)-14.5г; Каждая ампула содержит NALC(C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S) – 0.375г Буфер: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 2.37г; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2.27г. Конечная pH=6.8

Процедура:

Готовился BBL™ Мусоргер™ фосфатный буфер, путем растворения одного пакета в 500 мл дистиллированной воды, автоклавировался при 121 °C 15 минут; ослабив винтовую крышку флакона BBL™ Мусоргер™ реагента , фиксировали ампулу внутри флакона и ломали ее

сжатием. Слегка встряхивали для растворения NALC; в ламинарном боксе , используя стерильную центрифужную пробирку, переносили в нее равные количества исследуемого материала и NALC- NaOH (по 10 мл); закрывали пробирку и мешали на вортекс-миксере; оставляли смесь при комнатной температуре на 15 минут; добавляли подготовленный фосфатный буфер до 50-мл отметки на пробирке.и смешивали. Центрифугировали в течение 15 минут при ускорении 3000 g; осторожно сливали надосадочную жидкость, добавляли малое количество фосфатного буфера с рН=6.8 (от 0.5 до 2.0 мл) и ресуспендировали осадок.

***Техника посева и инкубации, оценка и учет результатов.*** Достоверная клиническая интерпретация результатов микробиологического обследования достигается при обязательном соблюдении следующего правила: микроскопическое и культуральное исследования должны производиться параллельно только из одной и той же пробы диагностического материала.

. набирали стерильной мерной или пастеровской пипеткой 1,0 . 1,2 мл полученного после обработки и нейтрализации осадка, оставив приблизительно 0,2 мл для последующего приготовления мазка для микроскопии;

. вносили равные объемы набранного материала , обработанного по методу Петрова (примерно по 0,5 - 0,6 мл) в 2 пробирки со средой Левенштейна-Йенсена, материал же, обработанный при помощи NALC- NaOH засеивали на косяки агара Миддлбрук 7Н10 и в пробирки MGIT.

Остаток осадка забирали той же пипеткой и наносили на подготовленное и пронумерованное предметное стекло 1.2 капли осадка для получения мазка; подготовленные мазки оставляли сушиться на воздухе, после чего фиксировали их троекратным проведением в пламени и окрашивали по Циль-Нильсену.

По завершении посева всех проб засеянные пробирки с плотными средами перемещали в горизонтальные штативы - диваны и помещали в термостат при температуре 37°C. При посеве на агары и в бульон Миддлбрук следует учесть, что рост на этих средах оптимален в присутствии CO<sub>2</sub>, поэтому, ввиду отсутствия специального термостата, чашки Петри и пробирки герметично упаковываются в автоклавные пакеты, пробки пробирок оставляются слегка отпущенными.



**Просмотр** засеянных пробирок со средой Левенштейн-Йенсена просматривают еженедельно в течение 8-12 недель. При первичном посеве микроскопически отрицательного материала средняя продолжительность роста микобактерий туберкулеза на плотных питательных средах может составить 20-46 дней. Рост отдельных штаммов появляется через 60 и даже 90 дней. Это обуславливает необходимость выдерживать посеvy в термостате до 12 недель. Агары Миддлбрука следует просматривать начиная с 7 дня роста, под микроскопом проходящего света, что позволяет фиксировать появление микроколоний начиная с 7-8 дня после посева. Во время просмотров регистрировались следующие параметры для каждой питательной среды: *«появление роста»*- срок появления роста, начиная со дня посева; *«интенсивность роста»*- суммарное число колониеобразующих единиц (КОЕ) на всех пробирках, засеянных данным материалом, если материал засеивается на пробирки с одинаковыми средами (этот показатель имеет большое диагностическое и прогностическое значение, особенно если посеvy производятся в динамике наблюдения за больным в процессе химиотерапии); Поскольку поскольку инокулировались разные питательные среды, результат отмечался для каждой из них, кроме бульонной, *«загрязнение посева»*- неспецифической гноеродной микрофлорой или грибами; *«отсутствие роста»*. Все указанные параметры регистрировались в протоколе каждого анализа.

**Питательные среды.** Для посева диагностического материала используют разнообразные питательные среды, среди которых можно выделить 3 основные группы:

1. плотные питательные среды на яичной основе;
2. плотные или полужидкие питательные среды на агаровой основе;
3. жидкие синтетические и полусинтетические питательные среды.

В Грузии культуральные исследования диагностического материала традиционно осуществляются на плотных яичных средах, в частности на среде Левенштейн-Йенсена. Но, в результате многочисленных сравнительных испытаний установлено, что для культуральной диагностики туберкулеза следует использовать как минимум две разные по составу питательные среды. Наиболее широкое распространение получил набор из 2 сред – яичной Левенштейна-Йенсена и агаровой или бульонной Миддлбрук 7Н10 и 7Н9.

*Среда Левенштейна-Йенсена* применяется во всем мире в качестве стандартной среды для первичного выделения возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности. Эта среда рекомендуется для использования всеми микробиологическими лабораториями противотуберкулезной службы для получения сравнимых результатов. Это

плотная яичная среда, на которой хороший рост микобактерий туберкулеза получают на 15-25-й день после посева микроскопически положительного материала. В состав этой питательной среды входит глицерин, который способствует росту *M. tuberculosis*. Для культивирования *M. bovis* среду Левенштейна-Йенсена обогащают 0,5% пируватом натрия, исключив из солевого раствора глицерин. С этой целью в состав солевого раствора вместо глицерина добавляют 8,0 г пирувата натрия. Применение этой модификации среды рекомендуется в тех территориях, где возможно распространение *M. bovis*. В данной работе для приготовления среды Левенштейн-Йенсена использовали стандартную сухую базу производства фирмы «Мерк», Франция.

38 г. сухой базы растворяли в 1 л дистиллированной воды и автоклавировали при 120 °С 15 минут. Затем готовили яичную массу путем гомогенизации свежих куриных яиц, смешивали раствор солей с яичной массой, разливали по пробиркам и подвергали коагуляции в специальных аппаратах при температуре 85°С в течение 45 минут.

В Грузии агаровая среда Миддлбрук 7Н10 и пробирки MGIT были впервые применены для посева и постановки тестов на лекарственную устойчивость в данном исследовании.

Состав на 1 л среды: модифицированная база бульона 7Н9-5.9г; казеин пептон - 25г; глицерин-3.1мл. Обязательным компонентом сред Миддлбрук является *ростовая добавка OADC*. Состав на 1 литр воды: хлорид натрия-8.5г; бычий альбумин (У фракция)-50.0г; декстроза-20.0г; каталаза-0.03 г; олеиновая кислота-0.6г. *Смесь антибиотиков PANTA*. Состав на 1 флакон лиофилизированной смеси: полимиксин В-6.000ед; Амфотерицин В-600 мкг; Наликсидиновая кислота-2.400 мкг; Триметоприм-600мкг; Азиоциллин-1.200 ед.

*Приготовление агара Миддлбрук 7Н10:* Приготовление агара Миддлбрук 7Н10 требует разведения 37,2 г сухой базы в дистиллированной воде, затем агар нужно проавтоклавируют, добавить ростовую добавку *OADC* в количестве 100 мл на 1 литр среды и разлить по пробиркам –по 5 мл или по чашкам Петри-по 10мл.

#### ***Процедура приготовления к использованию пробирок MGIT:***

Асептически добавить 0.5 мл ростовой добавки *OADC*; асептически добавить 0.1мл *PANTA*, разведенной 3мл дистиллированной воды; перемешать, инокулировать и инкубировать при 37°С; просматривать ежедневно начиная со 2 дня инкубации.

### ***Приготовление положительного контроля:***

1. Опустошить одну пробирку.
2. Маркировать ее как положительный контроль, поставить дату.
3. Приготовить 0.4% раствор сульфита натрия (0.4г на 100 мл стерильной дистиллированной воды).
4. Добавить 5 мл сульфита натрия в пробирку и дать отстояться 1 час перед применением.
5. Положительный контроль может использоваться многократно в течение 2-4 недель при хранении при комнатной температуре.

Подготовка к использованию пробирок - в каждую пробирку асептически добавляется в количестве 0.5 мл и смесь лиофилизированных антибиотиков PANTA по 0.3мл. Просмотр пробирок осуществлялся ежедневно, начиная со 2 дня инкубации. При этом пробирки помещались в источник ультрафиолетового излучения рядом с отрицательным контролем (незасеянной пробиркой), визуально отмечались пробирки, дававшие флюоресценцию- яркий оранжевый свет по дну и мениску. Такие пробирки отбирались и сравнивались с положительным контролем. Если пробирка давала флюоресценцию, сравнимую с положительным контролем, это означало рост. Также рост может определяться по наличию неомогенной замутненности-хлопьев или зерен. Содержимое пробирок бралось на мазок по Циль-Нильсену. Негативные пробирки просматривались в течение 8 недель.

### **1.3 Идентификация выделенных микобактериальных культур.**

#### **Предварительная идентификация комплекса *Mycobacterium tuberculosis***

Первичная идентификация микобактерий комплекса *M.tuberculosis* от нетуберкулезных микобактерий осуществляется по следующим культуральным характеристикам, приведенным в Табл.3. Для последующей дифференциации *M. tuberculosis* и *M. bovis* культуры были проверены ниациновым тестом. Ниациновая проба основана на том, что продуцируемая микобактериями никотиновая кислота, вступая в реакцию с цианистыми соединениями, дает ярко-желтое окрашивание. Наибольшее количество никотиновой кислоты обнаруживается у штаммов, выращенных на среде Левенштейна-Йенсена, поэтому именно эта среда использовалась для проведения ниациновой пробы. Подлежащие

дифференциации культуры микобактерий были выращены на среде Левенштейна-Йенсена в течение не менее 3-4 недель и имели достаточно массивный (не менее 50 колоний) рост.

Таблица 3. **Культуральные признаки комплекса *M. tuberculosis***

Культуральные признаки	Комплекс <i>M. tuberculosis</i>
Скорость роста	Медленнорастущие > 3 недель
Пигментообразование	Цвет слоновой кости
Морфология колоний	<i>R</i> или <i>S</i> формы
Наличие кислотоустойчивости	Выраженная кислотоустойчивая окраска
Температура роста	Оптимальный рост при 35 . 37°C

Для постановки ниациновой пробы использовались специально приготовленные бумажные полоски. Преимущество этого метода заключается в использовании вместо цианистых соединений роданистого калия - вещества более безопасного и доступного для бактериологических лабораторий, а также в быстроте реакции, позволяющей через 3-4 часа получить ответ о принадлежности выделенной на плотной питательной среде культуры к микобактериям человеческого вида или к другим микобактериям.

#### **1.4 Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам первого ряда**

В настоящее время для определения лекарственной устойчивости микобактерий к противотуберкулезным препаратам в международной практике используются следующие методы:

- метод абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена,
- метод пропорций на среде Левенштейна-Йенсена или на среде Миддлбука 7Н10,
- метод индикации роста по флюоресценции в ультрафиолетовом свете.

Выбор того или иного метода определяется традиционно сложившимися методическими подходами, используемыми в данной стране. Однако необходимо иметь в виду, что обязательным условием эффективного мониторинга, обеспечения эпидемиологического надзора за лекарственной устойчивостью микобактерий и распространением лекарственно-устойчивых штаммов возбудителя, а также сопоставления результатов исследований и эффективности лечения в масштабах страны должен использоваться только один из предложенных унифицированных методов. В нашей стране получило распространение

определение лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. При всех методах определения лекарственной устойчивости необходимым звеном в деятельности лаборатории является обеспечение контроля качества исследований.

**Метод абсолютных концентраций.** В Грузии для определения лекарственной устойчивости микобактерий традиционно используется метод абсолютных концентраций на плотной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена. В большинстве случаев этот метод применяется для непрямого определения лекарственной устойчивости. Непрямым методом называется метод определения лекарственной устойчивости после выделения культуры микобактерий. Он позволяет исследовать любое количество микобактерий в диагностическом материале, поскольку для определения лекарственной устойчивости используются штаммы микобактерий, предварительно выделенные на питательных средах. Так как сроки выделения возбудителя на питательных средах составляют не менее 1 . 1,5 месяцев, результаты определения лекарственной устойчивости указанным методом обычно получают не ранее, чем через 2 . 2,5 месяца после посева материала. При определении лекарственной устойчивости микобактерий на плотных средах культура считается чувствительной к той концентрации препарата, которая содержится в среде, если число колоний микобактерий, выросших на одной пробирке с препаратом, не превышает 20, а посевная доза соответствует  $1 \cdot 10^7$  микробных тел. Культура расценивается как устойчивая к данной концентрации препарата только при наличии на пробирке с этой концентрацией 20 колоний и более при обильном росте в контрольной пробирке, не содержащей лекарственного препарата. В отечественной фтизиатрической практике при определении лекарственной устойчивости ранее не ограничивались определением только критических концентраций. Это было связано с тем, что расширенное определение уровня лекарственной устойчивости возбудителя позволяет клиницисту варьировать дозировки препаратов и лекарственные режимы, добиваясь более эффективного воздействия препаратов за счет допустимого повышения дозы и использования синергидных и аддитивных свойств различных комбинаций лекарственных препаратов. В настоящее время Национальной Программой Борьбы с Туберкулезом Грузии принята единая стратегия DOTS (Directly Observed Therapy Strategy)- лечение под непосредственным наблюдением. По правилам этой стратегии все больные получают определенные, строго фиксированные дозы

анти туберкулезных препаратов. В большинстве стран мира, признающих и применяющих стратегию DOTS, для определения лекарственной устойчивости применяют метод пропорций на среде Левенштейн-Йенсена. В этом случае процедура метода трудоемкая и долговременная, поэтому замена метода абсолютных концентраций на метод пропорций представлялась нецелесообразной. С другой стороны, контроль качества постановки теста на оекарственную устойчивость, проводимый за границей по методу пропорций на среде Л-Й, показывал низкую степень соответствия результатов НРЛ Грузии. Поэтому нашей целью явилась адаптация существующей методики к современным требованиям. Для этого была проведена серия экспериментов по смене концентраций в среде Левенштейн-Йенсена. Были выбраны только критические концентрации, принятые для метода пропорций, процедура же постановки теста и определения результата, осталась от метода абсолютных концентраций.

**Таблица 4. Концентрации препаратов, используемые при определении лекарственной устойчивости микобактерий методом абсолютных концентраций на среде Левенштейн-Йенсена**

Препараты I ряда	Концентрации в мкг/мл для классического метода абс. концентраций		Концентрации в мкг/мл для модифицированного метода абс.концентраций
Стрептомицин	10	25	4
Изониазид	1	10	0,2
Рифампицин	40	80	40
Этамбутол	2	5	2

*Разведение противотуберкулезных препаратов и приготовление питательных сред*

В питательную среду Левенштейна-Йенсена, не содержащую крахмала (крахмал адсорбирует лекарственные препараты), непосредственно перед свертыванием добавляли рабочие разведения противотуберкулезных препаратов первого ряда в указанных концентрациях. Для приготовления питательных сред с целью определения лекарственной устойчивости микобактерий использовались химически чистые субстанции противотуберкулезных препаратов (Sigma-Aldrich INC). Для приготовления из химически чистой порошковой формы препарата рабочих растворов, содержащих необходимые для исследования концентрации активной субстанции, расчеты производили с учетом процента активности препарата. Активность препарата может варьировать от одной его серии к другой серии. Сведения об активности приводятся на этикетках или упаковках лекарственных препаратов. Взвешивание производилось на электронных весах с точностью до четвертого знака после запятой.

*Постановка опытов по определению лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций.*

Непосредственно перед постановкой опыта по определению лекарственной устойчивости необходимо убедиться в том, что отобранные для исследования культуры микобактерий не загрязнены посторонней микрофлорой. Проверенные и отобранные для постановки опыта культуры микобактерий расставить в штативе в порядке номеров. При любом методе определения чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам каждую серию приготовленной питательной среды с препаратами необходимо проверить, засевая на нее заведомо чувствительную культуру микобактерий туберкулеза (справочный штамм лаборатории, H37Rv). Контрольная культура засеивается так же, как и испытуемые. Если среда с препаратами приготовлена правильно, то контрольная культура не должна расти при тех концентрациях препаратов, при которых не растут чувствительные к данному препарату штаммы. Появление роста контрольного штамма в пробирке с препаратом указывает на то, что при приготовлении среды с препаратами допущена ошибка или на то, что неправильно приготовлена бактериальная суспензия.

*Процедура исследования:*

- полученную бактериальную суспензию внести по 0,2 мл суспензии в верхнюю 1/3 косяка во все пробирки с питательной средой, приготовленной для определения устойчивости культуры данного номера, тщательно сверяя номер культуры засеваемой суспензии с номерами, написанными на пробирках. Во избежание ошибок все пробирки, подготовленные для засева одной культуры, следует расставлять в одном ряду штатива;
- по завершении засева всех суспензий засеянные пробирки переместить в горизонтальные штативы-диваны и поместить в термостат при температуре 37°C; при этом поверхность косяка питательной среды должна находиться в горизонтальной плоскости, а наклон штатива должен исключить смачивание пробки материалом засева;
- по истечении 2-3 суток инкубации засеянные пробирки перевести в вертикальное положение;
- инкубирование проводить в течение 21 дня при обязательном еженедельном просмотре.

*Оценка результатов*

Результат определения лекарственной устойчивости учитывают на 21 день после посева. При скудном росте в контрольной пробирке все пробирки с препаратами оставляют еще на 1 - 2

недели в термостате до получения выраженного роста в контроле, после чего выдают окончательный ответ. Культуру считают чувствительной к данной концентрации препарата, если в пробирке со средой, содержащей препарат, выросло менее 20 колоний при обильном росте в контрольной пробирке. Культура считается устойчивой к той концентрации препарата, которая содержится в данной пробирке, если в пробирке со средой выросло более 20 колоний при обильном росте в контроле.

**Метод пропорций.** Метод основан на сравнении числа микобактерий выделенной культуры, выросших в отсутствии препарата и в его присутствии в критических концентрациях. Для этого приготовленную, как описано выше, суспензию микобактерий, содержащую 1 мг/мл влажного веса микобактерий, разводят до концентрации  $10^{-4}$  и  $10^{-6}$ . Оба разведения суспензии засевают на питательную среду без препарата и на набор сред с разными препаратами. Если на среде с препаратом вырастают колонии, составляющие более 1% от числа выросших на среде без препарата, культура считается устойчивой к данному препарату. Если количество КОЕ, устойчивых к данному препарату, менее 1%, культура считается чувствительной. Авторами проводились исследования по методу абсолютных концентраций на среде Левенштейн-Йенсена со следующими концентрациями препаратов 1 ряда: стрептомицин (Str) - 4 мкг/мл, изониазид (Inh) - 0,2 мкг/мл, рифампицин (Rif) - 40 мкг/мл, этамбутол (Emb) - 2 мкг/мл. Одновременно те же штаммы тестировались на агаре миддлбрук 7Н10. Концентрации препаратов в агаре Миддлбрук 7Н10 следующие: Str-2,0мкг/мл; Inh-0,2мкг/мл; Rif-1,0мкг/мл; Emb-5,0мкг/мл. Для дальнейшего повышения скорости определения лекарственной устойчивости была предпринята попытка постановки *теста в пробирках с индикацией роста по флюоресценции в ультрафиолетовом свете*. Пробирки с индикатором роста содержат модифицированный бульон Миддлбрук 7Н9. В пробирки с питательной средой вносят обогатитель и смесь антибиотиков, подавляющую рост посторонней микрофлоры. Встроенный в силикон дна пробирок флюоресцентный компонент чувствителен к присутствию кислорода, растворенного в бульоне. Высокие начальные концентрации растворенного кислорода гасят эмиссию этого вещества, и регистрируется очень низкий уровень флюоресценции. Позднее, активно размножающиеся микобактерии поглощают кислород, что позволяет наблюдать более интенсивную флюоресценцию при использовании ультрафиолетового трансиллюминатора. Рост также может быть зафиксирован по наличию неомогенной замутненности - мелких зерен или хлопьев в культуральной среде.



Концентрации для пробирок MGIT : Str -0,8 мкг/мл, Inh 0,1 мкг/мл, Rif 1,0 мкг/мл, Emb 3,5 мкг/мл. Учет результатов производится в течение 8-ми недель от момента посева. Бактериальная суспензия, приготовленная как описано выше, засеивается по 0.5 мл в пробирки с ростовой добавкой и разведениями антитуберкулезных препаратов по инструкции производителя и инкубируются в термостате с проходящим током CO<sub>2</sub> или в герметично закрытых полиэтиленовых пакетах. Для определения лекарственной устойчивости требуется от 3-х до 14-ти дней. Во всех случаях исследования лекарственной резистентности положительный результат анализа обязательно подтверждался при контрольном микроскопическом исследовании на наличие кислотоустойчивых бактерий и отсутствие роста загрязняющей микрофлоры.

## **Глава 2. Результаты собственных исследований.**

### **2.1. Молекулярное типирование региональных штаммов *M. tuberculosis***

Штаммы *M. tuberculosis* были выделены из мокроты пациентов с диагнозом туберкулеза легких, находящихся на лечении в Национальном Центре туберкулеза Грузии, Тбилиси, за период 2001-2004 гг. Изоляты от 185 пациентов (132 мужчин и 53 женщины, возраст от 15 до 81 года) были проанализированы при помощи анализа длин рестрикционных фрагментов (ДНК-фингерпринтинг). Все клинические материалы были исследованы микроскопически (иммерсионная микроскопия по Циль-Нильсену), затем было проведено культуральное исследование (Левенштейн-Йенсен, Миддлбрук 7H10, пробирки MGIT). Высеявшиеся культуры были вновь тестированы микроскопически по Циль-Нильсену. Идентификация и тесты на лекарственную устойчивость были проведены как описано выше. Экстракция ДНК и последующий блоттинг по Саузерну, гибридизация и детекция были проведены в соответствии со стандартным методом [117]. Сорок штаммов, выделенных из мокроты пациентов-жителей Тбилиси, были проанализированы при помощи кластерного анализа. Для сравнения фингерпринтов использовалась программа Gel Compar, версия 3.1b (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Belgium) методом невзвешенных средних (метод аппроксимации) с коэффициентом Диска. Результаты показаны на **Рис.7**. Характеристики штаммов даны в **Табл.5**.

Мазок-положительные клинические материалы были у 76% всех пациентов, и такие изоляты были представлены в каждом кластере штаммов с идентичными профилями гибридизации. В составе кластеров изоляты, выделенные из мазок-позитивных мокрот встречались чаще, чем из мазок-отрицательных. Идентичные или тесно связанные штаммы были выделены от пациентов более молодого возраста (от 15 до 42 лет), чем от пациентов старшей возрастной группы. Тринадцать пациентов в младшей группе были инфицированы штаммами, принадлежащими к одному из шести кластеров и в целом 20 из 40 штаммов имели коэффициент симилярности 90%. От пациентов старшей группы не было выделено идентичных штаммов и только 4 из 90 штаммов имели высокую степень схожести. Высокая степень преобладания сходных штаммов у младшей группы пациентов являлась статистически достоверной ( $p < 0.05$ ).

**Таблица 5. Характеристики типированных штаммов.**

Характеристика пациентов	Количество пациентов	Штаммы с 90- 100% сходством	Штаммы с уникальными профилями гибридизации
Мужчины	132	52	89
Женщины	53	9	44
Возраст			
>42	70	4	66
<42	115	48	67
Тбилиси	95	13/6	82
Др.регионы	90	39	51
Резистентный ТБ	137	13/6	172
Мазок+	116	12/6	104
Мазок-	15	1	14
Микр.неизв.	54	0	54

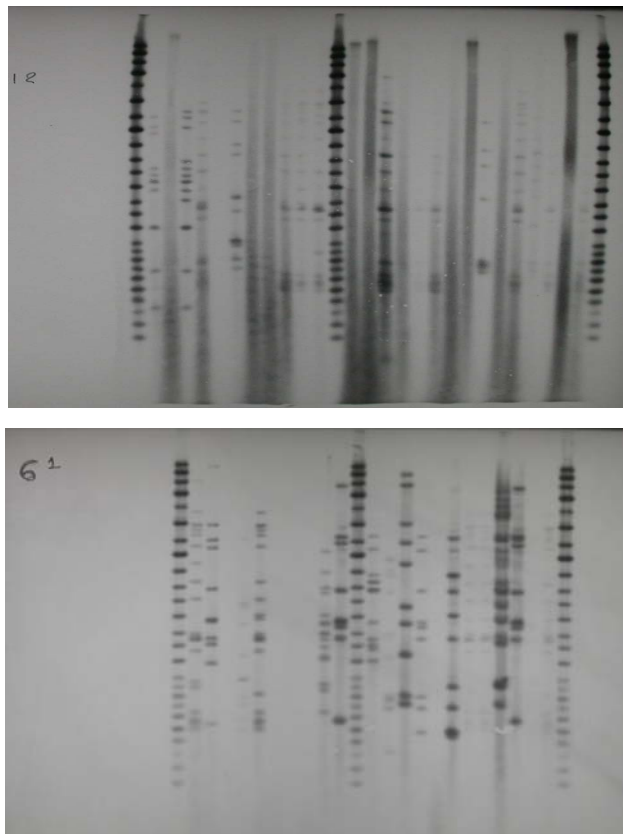
Была показана более частое инфицирование связанными или идентичными штаммами мужчин, чем женщин. От женщин, из 53 изолятов, было выделено только девять штаммов высокой степени схожести и ни одного кластера. Резистентные штаммы были выделены от 136 пациентов. В одном случае идентичный фингерпринт был найден у двух мультирезистентных штаммов от молодых людей из Тбилиси с мазок-положительным туберкулезом (**Рис.8**).

В общем и целом фингерпринты отличались друг от друга как по количеству полос, так и по их локализации. На Рис.8 показаны два автордиографа мембран. Первая, тринадцатая и двадцать девятая лунки-стандарт молекулярной массы. Между ними размещаются ДНК исследуемых штаммов. На верхней фотографии видно, что семь полос не

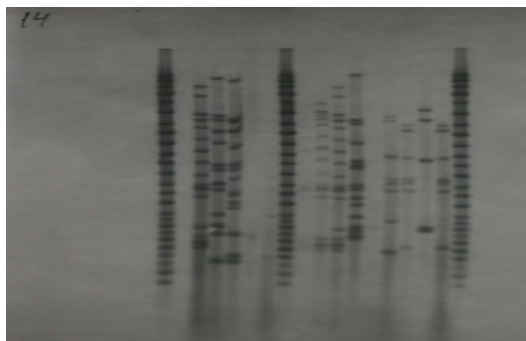
читаются, это можно объяснить контаминацией материала. На левой половине отчетливо видны парные профили 4-х штаммов. На правой стороне все читабельные профили отличаются друг от друга. Нижний снимок демонстрирует абсолютное разнообразие профилей гибридизации выделенных ДНК.

**Рисунок 7. Фингерпринты региональных штаммов *M. tuberculosis*.**

На снимках отчетливо видно большое разнообразие генетического полиморфизма ДНК выделенных изолятов.



**Рисунок 8. Авторадиограф фингерпринтов некоторых штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в Грузии. 7-й и 8-й справа профили идентичны.**



Для четырнадцати пациентов, инфицированных лекарственно-устойчивым туберкулезом, были получены последовательные изоляты после 10, 13 и 12 месяцев лечения. У двенадцати из них штаммы показали идентичные профили IS6110 (Рис.9), а в остальных двух случаях были получены очень сходные профили (у 2 изолятов была одна лишняя полоса).

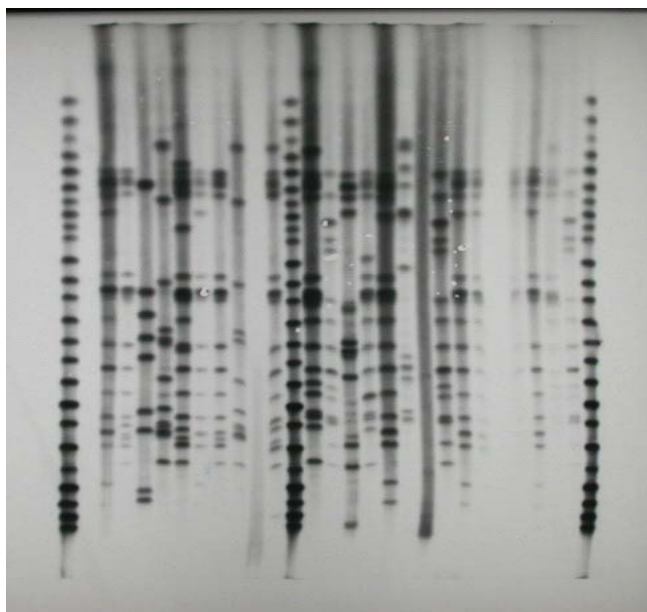
Таблица 6. Профили резистентности типированных последовательных штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от одних и тех же пациентов через большие промежутки времени.

Штамм	Дата посева	Пол	Лекарственная устойчивость			
			INH	RIF	STR	EMB
ROG-242	Сент.2001	Ж	S	S	S	S
	Дек.2002		R	S	R	S
ROG-0272	Окт.2000	М	S	S	S	S
	Янв.2002		R	S	R	S
ROG-0276	Ноя.2002	М	S	S	S	S
	Окт.2003		R	R	R	R
ROG-0278	Янв.2001	М	S	S	S	S
	Июль 2003		R	R	R	R
ROG-0279	Июн.2000	Ж	S	S	S	S
	Фев.2001		R	S	S	S
ROG-0291	Дек.2000	М	S	S	S	S
	Фев.2002		R	R	R	S
ROG-0301	Янв.2001	М	R	S	S	S
	Май 2002		R	R	R	R
ROG-0303	Янв.2001	М	R	S	S	S
	Сент. 2001		R	S	R	S
ROG-0315	Фев.2001	М	R	S	S	S
	Авг.2002		R	R	R	S
ROG-0320	Фев.2001	Ж	S	S	S	S
	Апр.2002		R	S	R	S
ROG-0322	Фев.2001	М	R	S	S	S
	Янв.2002		R	R	R	R
ROG-0331	Мар.2001	М	S	S	S	S
	Июн. 2002		R	S	R	S
ROG-0334	Окт. 2000	М	R	S	S	S
	Янв.2002		R	R	R	S
ROG-0336	Мар.2001	М	S	S	S	S
	Мар. 2003		R	R	R	S

S-стрептомицин (1.0мкг/мл); I-изониазид(0.2 мкг/мл);R-рифампицин (40мкг/мл);E –этамбутол (0.2мкг/мл).  
Neg-негативный; POS-позитивный

В то же время, уровень лекарственной устойчивости изолятов повысился (**Табл.6**): 9 штаммов изначально были полностью чувствительны ко всем четырем препаратам, из них 4 приобрели резистентность к изониазиду и стрептомицину, один – только к изониазиду, а оставшиеся четыре стали мультирезистентными. Пять штаммов изначально были резистентными к изониазиду, все они стали мультирезистентными.

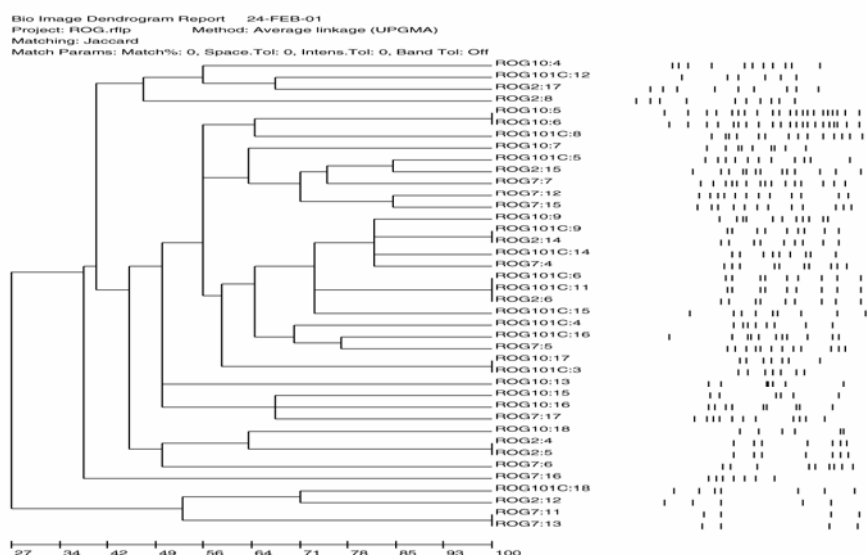
**Рисунок 9.** Фингерпринты некоторых последовательно выделенных штаммов *M. tuberculosis*. Слева направо: 1и 2, 6 и 7; справа налево: 1 и 2, 3 и 4.



Около 51% всех пациентов были из Тбилиси, столицы Грузии. 31 штамм со сходными фингерпринтами были выделены от пациентов из Тбилиси. От пациентов в возрасте выше 42 лет среди выделенных штаммов только 4 принадлежали к группам с высокой степенью сходства (коэффициент симилярности 90%).

Дендрограмма, показывающая связь между этими 40 штаммами, показана на **Рис. 10**. Среди изолятов от 90 пациентов, живущих за пределами столицы и области, только 4 (4.4%) принадлежали к парам с высокой степенью сходства. Высокая степень преобладания идентичных или сходных штаммов у пациентов из Тбилиси являлась статистически достоверной ( $p < 0.05$ ).

**Рисунок 10. Дендрограмма, полученная в результате компьютерного анализа 40 штаммов МБТ, выделенных в Грузии.**



У всех штаммов количество копий *IS6110* в изолятах *M. tuberculosis*, выделенных в Грузии было от 0 до 20. Для визуализации результатов компьютерного анализа полученных профилей гибридизации, был выведен специализированный вид диаграммы- дендрограмма, представленная на Рис.1. На правой стороне дендрограммы видны профили гибридизации, изображенные в виде вертикальных штрихов. Они сгруппированы по степени сходства. Левая сторона представляет собой собственно диаграмму, сходные профили отмечены на ней вертикальными штрихами на концах линий, обозначающих профили. У 25 изолятов были отмечены различные профили гибридизации; однако, были отмечены и определённые сходства между исследуемыми штаммами. Все мультирезистентные штаммы имели различные профили гибридизации. Профили гибридизации 7 изолятов были распределены по трём предварительным группам, которые позволяют обнаружить определенные эпидемиологические связи между ними. Как видно из рисунка, профили ROG 10:5 и ROG 10:6; ROG 2:4 и ROG 2:5; ROG 7:11 и ROG 7:13 идентичны, два профиля гибридизации (ROG 101C:9 и ROG 2:14) показали относительное сходство. Три профиля (ROG 101C:6,

ROG 101C:11 и ROG 2:6) образовали отдельную группу. Результаты исследования показали большое различие между генетическими профилями исследуемых штаммов

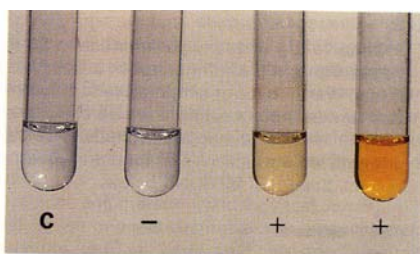
ДНК-фингерпринтинг штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от выборочных популяций в различных географических регионах были использованы для описания текущей трансмиссии определенных штаммов, например, лекарственно-устойчивых. Международный стандартный эпидемиологический маркер (IS6110) и метод (RFLP), а также стандартная система обработки данных (Gel Compar software) делают возможным группировку и сравнение результатов, полученных в различных исследованиях [16]. Изоляты *M. tuberculosis* с идентичными фингерпринтами скорее всего эпидемиологически связаны, а пациенты, инфицированные ими, вероятно, заразились от определенного источника, тогда как пациенты, инфицированные штаммами с уникальными профилями гибридизации, скорее всего представляют собой случаи рецидива или же получили инфекцию из другого источника [1,5]. Таким образом, популяция с высоким процентом штаммов *M. tuberculosis*, принадлежащих к идентичным кластерам должна характеризоваться значительным уровнем трансмиссии [13].

Лекарственно-устойчивый туберкулез –это широко распространенная проблема в развивающихся странах. Однако, в Грузии не было продемонстрировано клональной трансмиссии туберкулеза среди пациентов с лекарственно-устойчивыми формами. С другой стороны, лекарственно-устойчивые штаммы имели общие фингерпринты с чувствительным штаммом в 1 из 6 кластеров. Таким образом, можно сказать, что лекарственно-устойчивый туберкулез в Грузии проявляется скорее у некоторых несвязанных друг с другом пациентов (имеющих проблемы с лечением), чем путем распространения изначально резистентных штаммов *M.tuberculosis*. Важнейшими итогами данного исследования явились высокий уровень многообразия и отсутствие какого-либо конкретного клона, инфицирующего, к примеру, пациентов с лекарственно-устойчивыми формами ТБ или ВИЧ-инфекцией. Хотя идентичные или высокосходные штаммы были выделены от определенных групп пациентов, например, мужчин или младшей возрастной группы, пациентов из Тбилиси. Таким образом, результат означает, что большинство недавних трансмиссий происходит между пациентами именно этих групп.

## 2.2 Оптимизация культуральной диагностики туберкулеза в Грузии.

Всего за период 2001-2004 гг было проведено культуральное исследование 2497 клинических изолятов (мокрот) от пациентов НЦТЛЗ с диагнозом туберкулеза легких. Все материалы были деконтаминированы по стандартной методике (модифицированный метод Петрова) и засеяны на скосы среды Левенштейн-Йенсена. Из них 1605 клинических изолятов, деконтаминированных NALC+NaOH, были засеяны на агар Миддлбрук 7Н10 и в пробирки MGIT с бульоном Миддлбрук 7Н9. Исследование проводилось с целью определения сравнительной эффективности использования различных питательных сред для бактериологической диагностики туберкулеза в условиях Грузии. Из 2497 посевов было получено 1455 культур *M.tuberculosis*. Идентификация с помощью ниацинового теста (Рис.1) подтвердила принадлежность всех выделенных культур к *M.tuberculosis*. Все полученные культуры были протестированы на устойчивость к противотуберкулезным препаратам первого ряда (изониазиду, стрептомицину, рифампицину и этамбутолу) методом абсолютных концентраций на среде Левенштейн-Йенсена, часть из них (486 культур) –одновременно методом пропорций на среде Миддлбрук 7Н10 и в бульоне Миддлбрук 7Н9. Данные были обработаны на компьютере при помощи статистической программы SASS.

Рисунок 11. Проведение ниацинового теста для идентификации микобактерий.



Были выбраны следующие критерии эффективности для той или иной среды: а) длительность культурального исследования, б) высеваемость культур, в) уровень контаминации, г) интенсивность роста, д) простота и быстрота приготовления, е) длительность хранения среды и ж) стоимость.

На средах Левенштейн-Йенсена и Миддлбрук 7Н10 микобактерии туберкулеза дают обильный рост в виде шероховатых, эйгонических колоний (Рис. 12,13). Цвет их кремовый,



иногда с желтоватым или розовым оттенком, оптимальная температура для роста-37-37.5°C. Для выращивания культур на средах Миддлбрука требуется специальный термостат с 5% потоком CO<sub>2</sub>, если же подобного термостата нет, можно воспользоваться полиэтиленовыми пакетами, герметично их запечатав.

Скорость высевания культур *M.tuberculosis* на различных средах представлена на **Таблице 7**. Этот показатель на плотных средах учитывался по первому визуальному проявлению роста. Для яичной среды просмотр проводился раз в неделю в течение 8 недель, для агара первый просмотр –через неделю после посева, последующие-каждый день с 8 по 21.

**Рисунок 12. Колонии *M.tuberculosis* на среде Левенштейн-Йенсена.**



**Рисунок 13. Колонии *M.tuberculosis* на среде Миддлбрук 7H10.**



**Таблица 7. Скорость высевания культур *M.tuberculosis* на различных питательных средах.**

Среда	Первое проявление роста	Позднейшее проявление роста	Среднее значение
Левеншт.-Йенсена	14	62	27
Миддлбрук 7H10	10	49	20
MGIT	3	32	7.9

Как видно из **Табл.7**, средняя длительность исследования на агаровой среде составила в среднем 20 суток, на яичной среде- 27 суток. Выделение культуры в пробирках MGIT в среднем составило 7,9 суток.

На Таблице 8 представлено сравнение высеваемости и уровня контаминации засеянных инокулятов на яичной среде Левенштейн-Йенсена, агаре Миддлбрук и в пробирках MGIT. Высеваемость культур *M.tuberculosis* на среде Левенштейна-Йенсена составила примерно 62%, на агаре Миддлбрук 7Н10- 61,7 %, в пробирках MGIT -61,6 %.

Принято считать, что уровень контаминации при посевах на микобактерии должен составлять от 2 до 5 % всех клинических образцов мокроты.

**Таблица 8. Сравнение высеваемости и контаминации засеянных культур на различных питательных средах.**

Среда	Культуро-положительные образцы		Культуро-отрицательные образцы		Контаминация	
	#	%	#	%	#	%
Левенштейн-Йенсена	996	62,0	564	35,1	45	2.8
Миддлбрук 7Н10	990	61,7	566	35,3	49	3
MGIT	989	61,6	530	33	72	4.5

Если контаминировано менее 2 % посевов, считается, что деконтаминант убивает как постороннюю флору, так и большинство микобактерий. Если же уровень контаминации более 5%, процесс деконтаминации производится неадекватно [55]. Всего в сумме по трем использованным средам, 183 посева были контаминированы. Среди посевов на среде Левенштейна-Йенсена контаминированы были 45 пробирок, что составило 2,8%, среди посевов на агаре Миддлбрук 7Н10 контаминация наблюдалась на 93 чашках Петри, но результат невозможно было прочитать только на 49, что составило 3%, среди посевов в пробирках MGIT контаминированы оказались 72 посева, что составило 4.5 %.

Интенсивность роста учитывается по количеству колоний, выросших на скосе питательной среды или на чашке Петри. Для этого используется специальная шкала, по которой состояние среды после посева оценивается следующим образом:

(-) - роста нет

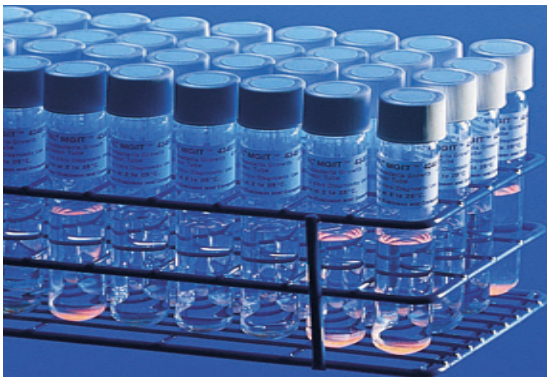
1+ - от 20 до 100 колоний

2+ - от 100 до 250 колоний

3+ -от 300 и выше, сливной рост.

При оценке роста засеянных культур на агаре Миддлбрук 7Н10 интенсивность роста в среднем составила 3+ по приведенной выше трехплюсовой шкале оценки роста культуры, тогда как на яичной среде этот показатель был равен в среднем 2+. То есть, при равной интенсивности роста, культуру на агаре можно обнаружить с опережением как минимум в одну неделю. Определить интенсивность роста в бульоне MGIT на ранних сроках после инокуляции не представляется возможным. Можно лишь зарегистрировать проявление роста по свечению (см **Рис. 14**).

**Рисунок 14. Рост культуры M.tuberculosis в пробирках MGIT в ультрафиолетовом свете.**



**В ультрафиолетовом излучении дно пробирки и мениск светятся ярко-оранжевым светом, что свидетельствует о наличии роста культуры.**

Кроме посевов клинических материалов, эффективность применения новых для Грузии сред проверялась также и для постановки тестов на лекарственную чувствительность к противотуберкулезным препаратам первого ряда.

Работа проводилась на 486 выделенных штаммах M.tuberculosis. определение чувствительности проводилось методом абсолютных концентраций на яичной среде Левенштейн-Йенсена, методом пропорций на агаре Миддлбрук 7Н10 и по протоколу производителя в пробирках MGIT. Суспензия плотностью 5 по стандарту Макфарленда засеивалась одновременно в количестве по 0.6 мл на все три среды, затем засеянные пробирки и чашки Петри помещались в термостат на инкубацию

Одним из главных критериев оценки культуральных свойств питательных сред является *время получения результата*. Для яичной среды соблюдался срок, определенный

методикой, то есть 21 день. Тест оценивался в первую очередь по росту на контрольных пробирках, не содержащих противотуберкулезных препаратов. Агаровая среда проверялась ежедневно, начиная с 10 дня после инокуляции под микроскопом проходящего света, позволяющим увидеть колонии микробов на ранней стадии роста. Культуры, засеянные в пробирки MGIT, проверялись, согласно методике, указанной производителем, начиная с третьего дня после посева на трансиллюминаторе с ультрафиолетовым светом. Отсутствие роста в препарат-содержащей пробирке, в течение 2-х дней, когда определяется рост в пробирке, не содержащей препарата, указывало на чувствительность организма к препарату. Флюоресценция в препарат-содержащей пробирке, наблюдаемая менее, чем через два дня по сравнению с флюоресценцией в препарат-несодержащей пробирке, означала устойчивость микроорганизма к препарату. Результаты сравнительной скорости и интенсивности роста бактерий можно видеть в Таблице 9.

Таблица 9. Сравнительная скорость исследования лекарственной устойчивости на средах Левенштейна-Йенсена, Миддлбрук 7Н10 и в пробирках MGIT

Среда	Первые признаки роста (дни, в среднем)	Интенсивность роста (в среднем)
Л-Й	21	+1,5
Миддлбрук 7Н10	14	2+
MGIT	7,7	-

Как видно из **Табл.9**, тест на агаровой среде ускоряет получение результата в среднем на неделю, рост наблюдается на 10-16 день (см. **Рис.15**). Пробирки MGIT позволяют определить наличие роста уже начиная с 3-5 дня, в среднем же тест длится 7,7 суток. Интенсивность роста в таблице показана на момент первого момента определения роста. На агаре интенсивность роста была выше, чем на яичной среде. Просмотр под микроскопом проходящего света позволял обнаружить колонии на начальной стадии роста.

Рисунок 15. Проведение теста на лекарственную устойчивость на агаре Миддлбрук 7Н10.



Левый верхний квадрант-контроль. В остальных квадрантах-среда с добавлением противотуберкулезных препаратов.

Использование агара и бульона позволило значительно сократить сроки исследования, что согласуется с данными зарубежных исследователей [82,].

Был проведен сравнительный анализ результатов теста на лекарственную устойчивость, полученных на всех трех средах. Его результаты показаны в **Таблице 10**.

**Таблица 10.** Корреляция результатов тестов лекарственной устойчивости *M.tb* на различных питательных средах.

Среда		Стрептомицин		Изониазид		Рифампицин		Этамбутол	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Левенштейн-Йенсен M7H10	n	461	25	464	22	474	12	458	28
	%	95%	5%	95.5%	4,5%	97.5%	2.5%	94.2%	5.8%
M7H10- MGIT	n	479	7	480	6	482	4	481	5
	%	98.6%	1,4%	98.8%	1,2%	99,8%	0,2%	99%	1%
Левенштейн-Йенсен- MGIT	n	461	25	464	22	474	12	466	20
	%	95%	5%	95.5%	4,5%	97.5%	2.5%	96%	4%

Из 486 штаммов *на яичной среде и агаре* результаты по стрептомицину совпали у 461 (95%), по изониазиду - у 464 (95.5%), по рифампицину - у 474 (97.5%), по этамбутолу - у 458 (94.2%).

*На агаре и в бульоне MGIT:* результаты по стрептомицину совпали у 479 (98.6%), по изониазиду - у 480 (98.8%), по рифампицину - у 485 (99.8%), по этамбутолу - у 481 (99%).

*На яичной среде и в бульоне MGIT:* результаты по стрептомицину совпали у 461 (95%), по изониазиду - у 464 (95.5%), по рифампицину - у 474 (97.5%), по этамбутолу - у 466 (96%). Т. обр., максимальное отклонение составило не более 6%, что можно расценивать как достоверную степень корреляции ( $p < 0,05$ ).

Приготовление питательных сред-неотъемлемая часть работы любой бактериологической лаборатории. В настоящее время существует возможность покупки

любых сред в готовом виде, но, как правило, все они очень дороги, поэтому для лабораторий в странах, подобных Грузии, целесообразнее готовить простые среды на месте. Данное утверждение, однако не относится к пробиркам MGIT, так как они содержат встроенный индикатор роста, который невозможно получить в лаборатории. Для того, чтобы сравнить целесообразность приготовления яичной и агаровой среды в условиях бактериологической лаборатории, мы свели основные характеристики в **Таблицу 11**. В ней приведено сравнение некоторых параметров сред Левенштейн-Йенсена, Миддлбрук 7H10 и пробирок MGIT, таких как количество лаборантов, занятых в их приготовлении, время приготовления, выход среды из одной банки сухой базы среды, стандартизованность среды, наличие тех или иных добавок, а также стоимость из расчета на 100 пробирок или чашек Петри.

Приготовление среды *Левенштейна-Йенсена*-это длительный и трудоемкий процесс. Он включает в себя несколько стадий и требует затраты длительного времени. Кроме приготовления собственно раствора сухой базы среды и его автоклавирования в течение 15 минут при температуре 120°C, такую стадию, как получение яичной эмульсии с предварительным замачиванием яиц в дезинфектанте и их последующей гомогенизацией. Замачивание проводится в течение одного часа. Кроме того после смешивания яичной основы с раствором сухой базы среды, смесь нужно обязательно профильтровать. После охлаждения проавтоклавируемой основы с приготовленной яичной массой много времени занимает розлив среды в пробирки с завинчивающимися пробками, которые затем в специальных штативах ставятся в аппарат-свертыватель, где среда сворачивается в течение 45 минут при температуре 80°C.

**Таблица 11. Сравнение некоторых характеристик различных питательных сред для выделения культур микобактерий.**

Среда	Количество лаборантов	Время приготовления (на 100 проб.)	Выход из 500г сухой базы (л)	Основа	Стандарт	Добавки	Стоимость на 100 проб. /100чашек Петри
Левенштейн-Йенсена	3	4 часа	14	Сухая база	нет	Яичная масса	5-7долл.США
Миддлбрук 7Н10	2	1-1.5 часа	27	Сухая база	да	OADC	20-25 долл.США
MGIT	1	20 минут	-	Готовая в пробирках	да	OADC	6 долл.США/ 1 пробирка

По нашим расчетам, приготовление 100 пробирок яичной среды занимает от 3 до 4 часов рабочего времени трех лаборантов. Для приготовления набора из 100 тестов на лекарственную устойчивость группе из 3 лаборантов и 2 санитаров требуется затратить полный рабочий день (7 часов).

Приготовление агара Миддлбрук 7Н10 требует разведения 37,2 г сухой базы в дистиллированной воде, затем агар нужно проавтоклавируют при температуре 120°С в течение 15 минут, охладить до 65°С и добавить ростовую добавку. После этого агар фильтруется через вакуумный фильтр и его можно разливать по пробиркам или чашкам Петри. В отличие от яичных, агаровые среды не требуют свертывания, после разлива им достаточно дать застыть, сложив их в вертикальные стопки в специальных штативах. Времени на это требуется от 1 до 1,5 часов. Тесты на лекарственную устойчивость на агаровой среде проводятся на разовых чашках Петри с внутренними перегородками, так называемых чашках Фелсена. Перегородки делят чашку на 4 квадранта, фабрично помеченных цифрами от 1 до 4. На приготовление 100 чашек агара уходит от 3 до 4 часов рабочего времени.

Пробирки MGIT не требуют приготовления вообще. Единственное, что нужно сделать—это асептически добавить в пробирку 0,5 мл ростовой добавки и (в случае внелегочных материалов) смесь лиофилизированных антибиотиков PANTA, и пробирки готовы к употреблению. Для подготовки пробирок MGIT нужно только инокулировать их лекарственными препаратами, причем это необязательно делать партиями. Можно взять то

количество, которое необходимо для проведения конкретного числа тестов и инокулировать непосредственно перед работой. Это делается инсулиновым шприцем прямо через пробку.

Агар Миддлбрук можно хранить 3-4 месяца в темном прохладном месте, так же, как и пробирки MGIT. В этом отношении эти среды не уступают среде Левенштейна-Йенсена. Единственное ограничение-их нельзя оставлять на свету, так как образующийся формальдегид пагубно влияет на микобактерии.

*Стоимость.* Наиболее дешевой средой, конечно, является яичная среда Левенштейна-Йенсена. На 100 пробирок среды требуется в среднем затратить всего около 5 долларов США. Стоимость банки сухой базы весом в 500г обходится в 75-80 долларов США.

Сухая база агара Миддлбрук 7Н10 весом в 500 г. стоит, в зависимости от производителя, от 75 до 90 долларов США, но и количественный выход агара из 500 г сухой базы выше- из одной банки получается 27 литров против 14 из 500 г сухой базы среды Левенштейна-Йенсена. Агары обходятся в четыре-пять раз дороже за счет ростовой добавки OADC, необходимого ингредиента для роста микобактерий. 100 мл добавки стоит 73 доллара США, на каждый литр приготовленной среды идет 100 мл добавки.

Пробирки MGIT стоят дороже агаров, одна пробирка обходится около 10 долларов США. В цену не включается стоимость наборов ростовой добавки и лиофилизированной смеси антибиотиков.

### **2.3 Профили резистентности выделенных штаммов M.tuberculosis и динамика изменения их соотношения по годам за период 2001-2004 гг.**

За период 2001-2004 гг было проведено тестирование на устойчивость к противотуберкулезным препаратам первого ряда (изониазиду, стрептомицину, рифампицину и этамбутолу) 1455 выделенных и идентифицированных культур M.tuberculosis. Тестирование проводилось методом абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена. Все данные были обработаны на компьютере при помощи статистической программы SAS. Ниже представлены результаты исследований профилей резистентности культур M.tuberculosis за период 2001-2004 гг.

**Таблица 12. Возраст обследованных больных**

Среднее значение	38.02
std	13.79
Min	15
Max	81



Возрастная группа	Частота	%
15-24	237	16.7%
25-34	408	28.7%
35-44	376	26.4%
45-54	216	15.2%
55-64	111	7.8%
>65	74	5.2%
Всего	1422	100.0%

Всего в исследование было включено 1422 человека в возрасте от 15 до 81 года. Из них от 15 до 24 лет-237 человек, от 25 до 35 лет-408 человек, от 35 до 44 лет-376 человек, от 45 до 54 лет – 216 человек, от 55 до 64 лет-111 человек, и 74 человека в возрасте старше 65 лет. На 33 пациента возрастные данные отсутствовали.

Распределение по полу показано в **Таблице 13**.

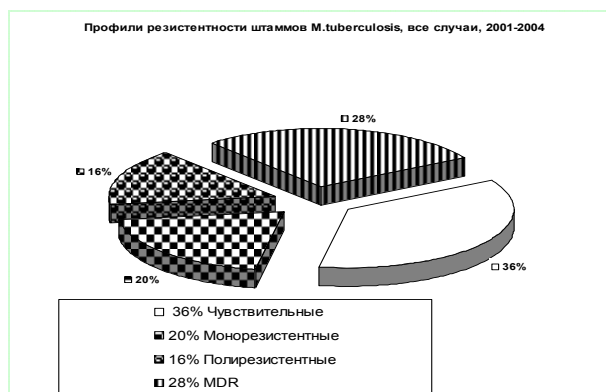
**Таблица 13. Пол исследуемых пациентов**

Пол	Частота	%
Мужчины	1045	73.5
Женщины	377	26.5
<b>Всего</b>	<b>1422</b>	<b>100%</b>

Пациентов мужского пола было 1045, что составило 73.5%, женского-377, что составило 26.5%.

На рисунке 16 показано процентное соотношение всех типов резистентности культур микобактерий туберкулеза, выделенных от больных в Грузии в 2001-2004 гг без их деления на леченные и нелеченные случаи.

**Рисунок 16. Распределение профилей резистентности среди штаммов M.tuberculosis, все случаи, 2001-2004**



Как видно из Рис.16, при рассмотрении общего количества штаммов резистентность распределяется так: полностью чувствительные штаммы составляют 36% всех изолятов, монорезистентные -16%, полирезистентные-20%, штаммы же со множественной

лекарственной устойчивостью (MDR) составляют 28% всей исследованной бактериальной популяции.

В Табл.14. те же профили резистентности представлены более подробно:

Таблица 14. Профили резистентности ТБ штаммов, выделенных в Грузии, 2001-2004 гг.

	Неопред.сл.		Новые сл.		Леченные		Всего(n=931)	
	N=9	%	N=534	%	N=388	%	N=931	%
<b>Монорезистент</b>								
INH	0	0%	39	7.30%	20	5.20%	59	6.30%
RIF	0	0%	3	0.60%	4	1%	7	0.80%
SM	3	0.3%	75	14.0%	30	7.70%	108	11.60%
EMB	0	0%	9	1.70%	5	1.30%	14	1.50%
<b>Всего Монорезист</b>	<b>3</b>	<b>0.3%</b>	<b>126</b>	<b>23.6%</b>	<b>59</b>	<b>15.2%</b>	<b>188</b>	<b>20.2%</b>
<b>Полирезистент</b>								
H+E	0	0%	1	0.10%	1	0.30%	2	0.20%
H+S	3	0.3%	48	5.1%	35	3.8 %	86	9.20%
R+S	1	0.1%	5	0.50%	7	1.80%	13	1.40%
R+E	0	0%	1	0.10%	2	0.50%	3	0.30%
S+E	0	0%	5	0.50%	2	0.50%	7	0.80%
R+S+E	0	0%	1	0.10%	1	0.30%	2	0.20%
H+S+E	0	0%	15	2.80%	18	4.60%	33	3.50%
<b>Всего Полирезистентн</b>	<b>4</b>	<b>0.4%</b>	<b>76</b>	<b>8.1%</b>	<b>66</b>	<b>17.0%</b>	<b>146</b>	<b>15.60%</b>
<b>MDR</b>								
H+R	0	0%	6	1.10%	9	2.30%	15	1.60%
H+R+E	0	0%	0	0%	6	1.60%	6	0.60%
H+R+S	0	0%	26	4.90%	72	18.90%	98	10.50%
H+R+S+E	0	0%	24	4.50%	119	30.70%	143	15.40%
<b>Всего MDR</b>	<b>2</b>	<b>0.2%</b>	<b>56</b>	<b>10.5%</b>	<b>206</b>	<b>53.5%</b>	<b>262</b>	<b>28.10%</b>

Из таблицы видно, что **монорезистентных** изолятов было 188 ( 20.20%), из них резистентных к изониазиду -59(6.3%); к рифампицину-7(0.8%); к стрептомицину-108 (11.60%); к этамбутолу-14 (1.50%).

Штаммы, выделенные от «новых» случаев составили 126 (23.60%). Среди этих штаммов монорезистентность к отдельным препаратам распределена следующим образом: к изониазиду -39 (7.30%); к рифампицину-3 (0.60%); к стрептомицину-75 (14.00%); к этамбутолу-9 (1.70%).

Среди штаммов от леченных больных (388 штаммов) монорезистентность выглядела следующим образом: к изониазиду -20 (5.20%); к рифампицину-4 (1%); к стрептомицину-30 (7.70%); к этамбутолу-5 (1.30%).

**Полирезистентность** была выявлена у 146 (15.6%) штаммов из 931.

Из них к сочетанию изониазид+этамбутол (H+E) -2(0.20%); изониазид+стрептомицин (H+S) - 86 (9.20%); рифампицин+ стрептомицин(R+S) – 13(1.40%); рифампицин+ этамбутол(R+E) – 3 (0.30%); стрептомицин+ этамбутол(S+E) – 7 (0.80%); рифампицин+ стрептомицин+ этамбутол(R+S+E) – 2(0.20%); изониазид+стрептомицин+ этамбутол(H+S+E) – 33 (3.50%).

При рассмотрении в приложении к дефинициям случаев ТБ, среди новых случаев (всего 76 (14.2%)) полирезистентность распределилась следующим образом. К сочетанию изониазид+этамбутол (H+E) -1(0.20%); изониазид+стрептомицин (H+S) -48 (9 %); рифампицин+ стрептомицин(R+S) – 5(0.90%); рифампицин+ этамбутол(R+E) – 1 (0.20%); стрептомицин+ этамбутол(S+E) – 5 (0.90%); рифампицин+ стрептомицин+ этамбутол(R+S+E) – 1(0.20%); изониазид+стрептомицин+ этамбутол(H+S+E) – 15 (2.80%).

Среди леченных случаев (всего 66 (17.00%)) к сочетанию: изониазид+этамбутол (H+E) - 1(0.30%); изониазид+стрептомицин (H+S) -35 (9 %); рифампицин+ стрептомицин(R+S) – 7(1.80%); рифампицин+ этамбутол(R+E) – 2 (0.50%); стрептомицин+ этамбутол(S+E) – 2 (0.50%); рифампицин+ стрептомицин+ этамбутол(R+S+E) – 1(0.30%); изониазид+стрептомицин+ этамбутол (H+S+E) – 18 (4.60%).

**MDR, или множественная лекарственная устойчивость** была выявлена у 262 штаммов, что составило 28.10%. Оттуда к сочетаниям: изониазид+рифампицин (H+R) – 15 (1.60%); изониазид+рифампицин+этамбутол – 6(0.60%); изониазид+рифампицин+ стрептомицин (H+R+S)– 98 (10.50%); изониазид+рифампицин+ стрептомицин+этамбутол (H+R+S+E) – 143 (15.40%).

Среди штаммов, выделенных от нелеченных больных, множественная лекарственная устойчивость была определена в 56 случаях, что составило 10.50%. Из них к сочетаниям: изониазид+рифампицин (H+R) – 6 (1.10%); изониазид+рифампицин+этамбутол – 0(0.00%); изониазид+рифампицин+ стрептомицин (H+R+S)– 26 (4.90%); изониазид+рифампицин+ стрептомицин+этамбутол (H+R+S+E) – 24 (4.50%).

Среди штаммов от нелеченных больных распределение было следующим: изониазид+рифампицин (H+R) – 9 (2.30%); изониазид+рифампицин+этамбутол – 6(1.60%);

изониазид+рифампицин+ стрептомицин (H+R+S)– 72(18.90%); изониазид+рифампицин+ стрептомицин+этамбутол (H+R+S+E) – 119 (30.70%).

На таблице 15 показаны изменения в соотношении резистентности разных типов по всем случаям за период с 2001 по 2004 г.

**Таблица 15. Временные изменения в профилях резистентности штаммов M.tuberculosis, выделенных в Грузии, 2001-2004**

**15А. Профили резистентности штаммов M.tuberculosis, все случаи (Новые и леченные), 2001-2004.**

	Годы								Cochran-Armitage Trend Test P-value
	2001		2002		2003		2004		
	N=159	%	N=190	%	N=306	%	N=276	%	
<b>Монорезистент</b>									
INH	6	3.8%	11	5.8%	27	8.8%	15	5.4%	
RIF	0	0.0%	0	0%	3	1.0%	4	1.5%	
SM	32	20.1%	10	5.3%	26	8.5%	40	14.5%	
EMB	2	1.3%	10	5.3%	1	0.3%	1	0.4%	
<b>Всего монорезистент</b>	<b>40</b>	<b>25.2%</b>	<b>31</b>	<b>16 %</b>	<b>57</b>	<b>19%</b>	<b>60</b>	<b>22%</b>	<b>&lt;0,05</b>
<b>Полирезистент</b>									
H+E	0	0.0%	2	1.1%	0	0.0%	0	0%	
H+S	18	11.3%	14	7%	31	10.%	23	8.3%	
R+S	1	0.6%	0	0.0%	4	1.3%	8	2.9%	
R+E	0	0.0%	2	1.1%	1	0.3%	0	0%	
S+E	5	3.1%	1	0.5%	1	0.3%	0	0%	
R+S+E	1	0.6%	0	0.0%	0	0.0%	1	0.4%	
H+S+E	15	9.4%	10	5.3%	6	2.0%	2	0.7%	
<b>Всего полирезистент</b>	<b>40</b>	<b>25.0%</b>	<b>29%</b>	<b>15%</b>	<b>43</b>	<b>14%</b>	<b>34</b>	<b>12%</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>MDR</b>									
H+R	1	0.6%	4	2.1%	6	2.0%	4	1.5%	
H+R+E	0	0.0%	2	1.1%	3	1.0%	1	0.4%	
H+R+S	13	8.2%	13	6.8%	36	11.8%	36	13%	
H+R+S+E	39	24.5%	53	27.9%	37	12.1%	14	5.1%	
<b>Всего MDR</b>	<b>53</b>	<b>33.3%</b>	<b>72</b>	<b>37.90%</b>	<b>82</b>	<b>26.90%</b>	<b>55</b>	<b>20%</b>	
Любая INH	92	57.8%	109	57.5%	146	47.8%	95	34.4%	
Любая RIF	55	34.5%	74	39.0%	90	29.5%	68	24.8%	
Любая SM	124	77.8%	101	53.2%	141	46.1%	124	44.9%	
Любая EMB	62	38.9%	80	42.3%	49	16.0%	19	7.0%	
<b>Любая резистентн</b>	<b>133</b>	<b>83.5%</b>	<b>132</b>	<b>69.70%</b>	<b>182</b>	<b>59.50%</b>	<b>149</b>	<b>54.10 %</b>	<b>&lt;0.0001</b>

Как видно из **Таблицы 15А**, в **2001** году на устойчивость было исследовано 159 штаммов **M.tuberculosis**. Среди них **монорезистентных** было 40, что составило 25,2%. Из этих 40 штаммов резистентных только к изониазиду было 6 (3.8%); к стрептомицину – 32 (20.1%), к этамбутолу-2 (1.3%). Штаммов, монорезистентных к рифампицину, не оказалось.

**Полирезистентных** штаммов было также 40, что составило 25.2%. Из них 18 (11.3%) - к сочетанию изониазид+стрептомицин; 15 (9.4%) - к сочетанию изониазид+стрептомицин+этамбутол; 5 (3.1%) - к сочетанию стрептомицин+этамбутол и 1(0.6%) – к сочетанию рифампицин+стрептомицин.

Штаммов с **множественной лекарственной устойчивостью (MDR)** всего было 53 (33.3%). Из них к сочетанию рифампицин+изониазид-1(0.6%); рифампицин+изониазид+стрептомицин – 13 (8.2%); рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол-39 (24.5%).

Всего штаммов с любой выявленной резистентностью было 133, что составило 83.5%.

В **2002** году на устойчивость к противотуберкулезным препаратам 1 ряда было исследовано 190 изолятов **M.tuberculosis**. Из них **монорезистентных** было 31, что составило 16.40%. Отсюда 11(5.80%) культур было резистентно к изониазиду, 10 (5.3%) – к стрептомицину и 10 (5.3%) – к этамбутолу. **Полирезистентных** культур было 29 (15.4%). Из них к сочетаниям: изониазид+этамбутол -2 (1.1%); изониазид+стрептомицин – 14 (7%); рифампицин+ этамбутол – 2(1.1%); стрептомицин+этамбутол – 1 (0.5%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 10(5.3%).

Штаммов с **множественной лекарственной устойчивостью (MDR)** было 72 (37.9%). Оттуда к сочетаниям: рифампицин+изониазид-4 (2.1%); изониазид+ рифампицин+этамбутол-2(1.1%) рифампицин+изониазид+стрептомицин–13(6.8%); рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол-53 (27.9%).

Всего штаммов с любой выявленной резистентностью было 132, что составило 69.7%.

В **2003** году на устойчивость к противотуберкулезным препаратам 1 ряда было исследовано 306 изолятов **M.tuberculosis**. Среди них **монорезистентных** было 57, что составило 18.6%. Из этих 57 штаммов резистентных только к изониазиду было 27 (8.8%); к рифампицину -3 (1%); к стрептомицину – 26 (8.5%), к этамбутолу-1 (0.3%).

**Полирезистентных** штаммов было 43, что составило 14%. Из них 31 (10.10 %) - к сочетанию изониазид+стрептомицин; 6 (2%) - к сочетанию

изониазид+стрептомицин+этамбутол; 4(1.3%) – к сочетанию рифампицин+стрептомицин и по 1 (0.3%) - к сочетанию стрептомицин+этамбутол и рифампицин-этамбутол.

Штаммов с **множественной лекарственной устойчивостью (MDR)** всего было 82 (26.9%). Из них к сочетанию рифампицин+изониазид-6(2 %); рифампицин+изониазид+стрептомицин – 36 (11.8%);рифампицин+изониазид+этамбутол-3(1%); рифампицин + изониазид + стрептомицин +этамбутол-37 (12.10 %).

Всего штаммов с любой выявленной резистентностью было 182, что составило 59.5 %.

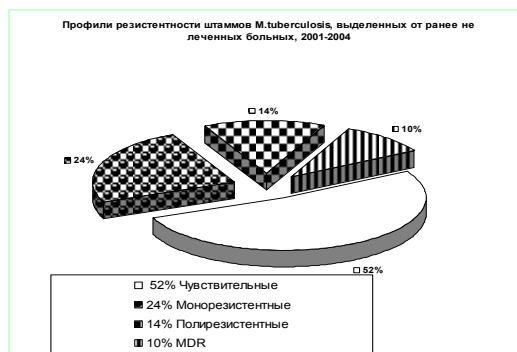
В **2004** году на устойчивость к противотуберкулезным препаратам 1 ряда было исследовано 276 изолятов *M.tuberculosis*. Из них **монорезистентных** было 60, что составило 21.8 %. Отсюда 15 (5.40%) культур было резистентно к изониазиду, 4 (1.5%) -к рифампицину; 40(14.5%) – к стрептомицину и 1 (0.4%) – к этамбутолу. **Полирезистентных** культур было 34 (12%). Из них к сочетаниям: изониазид+стрептомицин – 23 (8.3 %); рифампицин+ стрептомицин -8(2.9%); рифампицин+ стрептомицин + этамбутол – 1(0.4%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 2(0.7%).

Штаммов с **множественной лекарственной устойчивостью (MDR)** было 55 (20%). Оттуда к сочетаниям: рифампицин+изониазид-4 (1.5%); изониазид+ рифампицин+этамбутол-1(0.4%) рифампицин+изониазид+стрептомицин–36(13%); рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол-14 (5.1%).

Всего штаммов с любой выявленной резистентностью было 149, что составило 54.10%.

На Рис.17 в графическом виде показано процентное соотношение между чувствительными и резистентными штаммами, выделенными от ранее не леченных больных туберкулезом в 2001-2004гг.

**Рисунок 17. Распределение профилей резистентности среди штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от «новых» случаев, 2001-2004**



Как видно из рисунка, полностью чувствительные ко всем четырем противотуберкулезным препаратам культуры встречаются в 52 % всех «новых» случаев. Монорезистентные составили 24% , полирезистентные- 14%, 10 % культур были мультирезистентными.

Результаты изменения профилей резистентности в динамике с 2001 до 2004 гг по штаммам M.tuberculosis, выделенным от ранее не леченных больных, представлены на **Таблице 4В**.

**Таблица 15В. Профили резистентности штаммов M.tuberculosis, выделенных от ранее не леченных больных, временное распределение.**

	Годы								Cochran-Armitage Trend Test P-value
	2001		2002		2003		2004		
	N=6 1	%	N=95	%	N=195	%	N=183	%	
<b>Монорезистентность</b>									
INH	0	0.0%	6	6.30%	23	11.80%	10	5.50%	
RIF	0	0.0%	0	0%	1	0.50%	2	1.10%	
SM	17	27.9%	9	9.5%	20	10.30%	29	15.90%	
EMB	0	0.0%	8	8.4%	1	0.50%	0	0.00%	
<b>Всего монорезистентных</b>	<b>17</b>	<b>27.90%</b>	<b>23</b>	<b>24.20%</b>	<b>45</b>	<b>23.10%</b>	<b>41</b>	<b>22.50%</b>	<b>&lt;0.0114</b>
<b>Полирезистентность</b>									
H+E	0	0.00%	1	1.10%	0	0.00%	0	0%	
H+S	5	8%	8	8%	21	10.80%	14	7.70%	
R+S	0	0.00%	0	0.00%	2	1.00%	3	1.60%	
R+E	0	0.00%	1	1.10%	0	0.00%	0	0%	
S+E	4	6.60%	1	1.10%	0	0.00%	0	0%	
R+S+E	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	1	0.60%	
H+S+E	7	11.50%	4	4.20%	3	1.50%	1	0.60%	
<b>Всего полирезистентных</b>	<b>16</b>	<b>26.30%</b>	<b>15</b>	<b>15.90%</b>	<b>26</b>	<b>13.30%</b>	<b>19</b>	<b>11%</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>MDR</b>									
H+R	0	0.00%	2	2.10%	3	1.50%	1	0.60%	
H+R+E	0	0%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	
H+R+S	3	4.90%	4	4.20%	8	4.10%	11	6%	
H+R+S+E	6	9.80%	9	9.50%	3	1.50%	6	3.30%	
<b>Всего MDR</b>	<b>9</b>	<b>14.70%</b>	<b>15</b>	<b>15.80%</b>	<b>14</b>	<b>7.10%</b>	<b>18</b>	<b>9.90%</b>	
Любая INH	21	34.4%	34	35.8%	61	31.2%	43	23.7%	
Любая RIF	9	14.7%	16	16.9%	17	8.6%	24	13.2%	
Любая SM	42	68.9%	35	36.9%	57	29.2%	65	35.7%	
Любая EMB	17	27.9%	24	25.4%	7	3.5%	8	4.5%	
<b>Любая</b>	<b>42</b>	<b>68.90%</b>	<b>53</b>	<b>55.90%</b>	<b>85</b>	<b>43.50%</b>	<b>78</b>	<b>42.90%</b>	<b>0.0002</b>

резистентн.									
-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Из таблицы видно, что в **2001** году из всех выделенных культур 61 была выделена от больных с впервые выявленным туберкулезом. Среди этих изолятов Среди этих изолятов **монорезистентных** было 17 (27,9%), причем все эти изоляты были резистентны к изониазиду. **Полирезистентных** штаммов было 16 (26.3%), из них к сочетаниям: изониазид+стрептомицин – 5 (8%); стрептомицин + этамбутол – 4 (6.6%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 7 (11.5%). **MDR** всего было 9 (14.7%), из них к сочетаниям рифампицин + изониазид + стрептомицин – 3(4.9%); рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол – 6 (9.8%).

Итого, среди выделенных в **2001** г. штаммов первичная любая резистентность наблюдалась у 42 культур, что составило 68.9%.

В **2002** году культур, выделенных от «новых» больных было 95. Из них **монорезистентных** было 23 (24.2%), отсюда резистентных к: изониазиду – 6(6.3%); стрептомицину – 9 (9.5%); этамбутолу – 8 (8.4%). **Полирезистентных** было 15 (15.9%). Из них к сочетаниям: изониазид+ этамбутол – 1 (1.1%); изониазид+стрептомицин – 8 (8%); рифампицин+ этамбутол – 1(1.1%) ; стрептомицин +этамбутол – 1 (1.1%) ; изониазид+стрептомицин+этамбутол – 4(4.2%). **MDR** –штаммов было 15 (15.8%), из них к сочетаниям : рифампицин+изониазид – 2 (2.1%) ; рифампицин + изониазид + стрептомицин – 4 (4.2%) ; рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол – 9 (9.5%).

Среди выделенных в **2002** г. штаммов первичная любая резистентность наблюдалась у 53 культур, что составило 55.9%.

В **2003** году культур, выделенных от «новых» больных было 195. Из этих культур **монорезистентных** было 45 (23.10%). Из них к изониазиду – 23 (11.8%); рифампицину – 1 (0.5%); стрептомицину – 20 (10.3%); этамбутолу – 1(0.5%). **Полирезистентных** штаммов было 26 (13.3%). Из них к сочетаниям: изониазид+стрептомицин – 21 (10.8%); рифампицин+ стрептомицин – 2 (1%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 8 (4.1%). **MDR** –штаммов было 14 (7.10%), из них к сочетаниям: рифампицин+изониазид – 3 (1.5%) ; рифампицин + изониазид + стрептомицин – 8 (4.1%) ; рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол – 3 (1.5%).

Среди выделенных в **2003** г. штаммов первичная любая резистентность наблюдалась у 85 культур, что составило 43.5%.

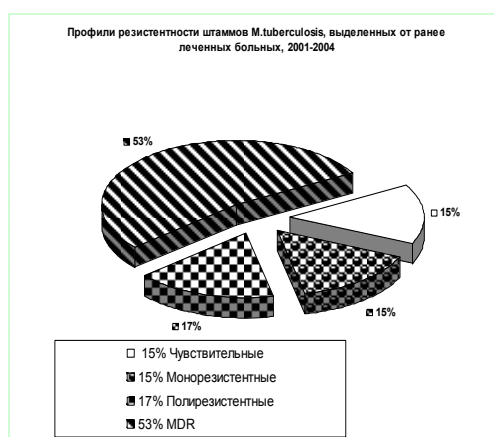


В 2004 году культур, выделенных от «новых» больных было 83. Из этих культур **монорезистентных** было 41 (22.5%). Из них к изониазиду – 10 (5.5%); рифампицину – 2 (1.1%); стрептомицину – 29 (15.9%); этамбутолу – ни одной. **Полирезистентных** штаммов было 19 (11%). Из них к сочетаниям: изониазид+стрептомицин – 14 (7.7%); рифампицин+стрептомицин – 3(1.6%); рифампицин+стрептомицин+этамбутол – 1 (0.6%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 1 (0.6%). **MDR** –штаммов было 18 (9.9%), из них к сочетаниям: рифампицин+изониазид – 1 (0.6%) ; рифампицин + изониазид + стрептомицин – 11 (6%) ; рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол – 6 (3.3%).

Среди выделенных в 2004 г. штаммов первичная любая резистентность наблюдалась у 78 культур, что составило 42.9%.

На **Рис. 18** в графическом виде представлено процентное соотношение между типами резистентности культур, выделенных от больных, получавших ранее лечение от туберкулеза.

Рисунок 18. Распределение профилей резистентности среди штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от леченных больных, 2001-2004



Как видно из рисунка, резистентность распределилась следующим образом: всего 15 % всех выделенных штаммов оказались чувствительны ко всем четырем препаратам первого ряда. Монорезистентных было 15 %, полирезистентных-17%. Штаммов с множественной лекарственной устойчивостью было выявлено 53%.

На **Таблице 15С** показано изменение соотношения типов резистентности у ранее леченных больных по годам с 2001 по2004.

Таблица 15С. Профили резистентности штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от леченных больных, 2001-2004 гг.

	Годы								Cochran-Armitage Trend Test P-value
	2001		2002		2003		2004		
	N=94	%	N=95	%	N=111	%	N=88	%	
<b>Монорезистент</b>									
INH	6	6.40%	5	5.30%	4	3.60%	5	5.70%	0.6815
RIF	0	0.00%	0	0%	2	1.80%	2	2.30%	0.0644
SM	14	14.90%	1	1.10%	6	5.40%	9	10.20%	0.3907
EMB	2	2.10%	2	2.10%	0	0.00%	1	1.10%	0.3044
<b>Всего монорезистентн</b>	<b>22</b>	<b>23.40%</b>	<b>8</b>	<b>8.50%</b>	<b>12</b>	<b>10.80%</b>	<b>17</b>	<b>19.30%</b>	
<b>Полирезистентн</b>									
H+E	0	0.00%	1	1.10%	0	0.00%	0	0%	0.6477
H+S	11	12%	6	6%	10	9.00%	8	9.10%	0.6952
R+S	1	1.10%	0	0.00%	2	1.80%	4	4.60%	0.0535
R+E	0	0.00%	1	1.10%	1	0.90%	0	0%	0.9973
S+E	1	1.10%	0	0.00%	1	0.90%	0	0%	0.5176
R+S+E	1	1.10%	0	0.00%	0	0.00%	0	0.00%	0.169
H+S+E	8	8.50%	6	6.30%	3	2.70%	1	1.10%	0.0081
<b>Всего полирезистент</b>	<b>22</b>	<b>23.50%</b>	<b>14</b>	<b>14.80%</b>	<b>17</b>	<b>15.30%</b>	<b>13</b>	<b>15%</b>	
<b>MDR</b>									
H+R	1	1.10%	2	2.10%	3	2.70%	3	3.40%	0.2757
H+R+E	0	0%	2	2.10%	3	2.70%	1	1.10%	0.4468
H+R+S	10	10.60%	9	9.50%	28	25.20%	25	28%	0.0001
H+R+S+E	33	35.10%	44	46.30%	34	30.60%	8	9.10%	<0.0001
<b>Всего MDR</b>	<b>44</b>	<b>46.80%</b>	<b>57</b>	<b>60.00%</b>	<b>68</b>	<b>61.20%</b>	<b>37</b>	<b>42.00%</b>	0.6766
Любая INH	69	73.40%	75	79.00%	85	76.50%	51	57.90%	0.027
Любая RIF	46	49.00%	58	61.10%	73	65.70%	43	48.90%	0.7374
Любая SM	79	84.10%	66	69.50%	84	75.60%	55	62.50%	0.0057
Любая EMB	45	47.90%	56	59.00%	42	37.80%	11	12.40%	<0.0001
Любая резистентност	<b>88</b>	<b>93.70%</b>	<b>79</b>	<b>83.30%</b>	<b>97</b>	<b>87.30%</b>	<b>67</b>	<b>76.10%</b>	0.0044

Количество штаммов, выделенных от больных с предшествующей историей лечения туберкулеза («леченные» случаи) в **2001** году составило 94. Из них монорезистентных было 22 (23.4%). Отсюда к изониазиду – 6 (6.4%); рифампицину – ни одного штамма; стрептомицину – 14 (14.9%); этамбутолу – 2(2.1%). **Полирезистентных** штаммов было 22 (23.5%). Из них к сочетаниям: изониазид+стрептомицин – 11 (12%); рифампицин+стрептомицин – 1 (1.1%); стрептомицин+этамбутол - 1(1.1%); рифампицин+стрептомицин+этамбутол - 1(1.1%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 8 (8.5%). **MDR**

–штаммов было 44 (46.8%), из них к сочетаниям: рифампицин+изониазид – 1 (1.1%) ; рифампицин + изониазид + стрептомицин – 10 (10.6%) ; рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол – 33 (35.10%).

Среди выделенных в **2001** г. штаммов любая резистентность наблюдалась у 88 культур, что составило 93.7%.

В **2002** году культур, выделенных от «новых» больных было 95. Из них **монорезистентных** было 8(8.5%), отсюда резистентных к: изониазиду – 5(5.3%); стрептомицину – 1 (1.1%); этамбутолу – 2 (2.1%). **Полирезистентных** было 14 (14.8%). Из них к сочетаниям: изониазид+ этамбутол – 1 (1.1%); изониазид+стрептомицин – 6 (6%); рифампицин+ этамбутол – 1(1.1%) ; изониазид+стрептомицин+этамбутол – 6(6.3%). **MDR** – штаммов было 57 (60%), из них к сочетаниям : рифампицин+изониазид – 2 (2.1%) ; рифампицин + изониазид + этамбутол – 2 (2.1%); рифампицин + изониазид + стрептомицин – 9 (9.5 %) ; рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол – 44 (46.3%).

Среди выделенных в **2002** г. штаммов первичная любая резистентность наблюдалась у 79 культур, что составило 83.3%.

В **2003** году культур, выделенных от «леченных» больных было 111. Из этих культур **монорезистентных** было 12 (10.8%). Из них к изониазиду – 4 (3.6%); рифампицину – 2 (1.8%); стрептомицину – 6 (5.4%); этамбутолу – ни одной. **Полирезистентных** штаммов было 17 (15.3%). Из них к сочетаниям: изониазид+стрептомицин – 10 (9%); рифампицин+ стрептомицин – 2 (1.8%); рифампицин+ этамбутол – 1 (0.9%); стрептомицин+этамбутол - 1 (0.9%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 3 (2.7%). **MDR** –штаммов было 68 (61.2%), из них к сочетаниям: рифампицин+изониазид – 3 (2.7%) ; рифампицин + изониазид + стрептомицин – 28 (25.2%) ; рифампицин + изониазид + этамбутол – 3 (2.7 %) ; рифампицин + изониазид + стрептомицин+этамбутол – 34 (30.60%).

Среди выделенных в **2003** г. штаммов любая резистентность наблюдалась у 97 культур, что составило 87.3 %.

В **2004** году культур, выделенных от «леченных» больных было 88. Из этих культур **монорезистентных** было 17 (19.3%). Из них к изониазиду – 5 (5.7%); рифампицину – 2 (2.3%); стрептомицину – 9 (10.2%); этамбутолу – 1 (1.1%). **Полирезистентных** штаммов было 13 (15%). Из них к сочетаниям: изониазид+стрептомицин – 8 (9.1%); рифампицин+ стрептомицин – 4 (4.6%); изониазид+стрептомицин+этамбутол – 1 (1.1%). **MDR** –штаммов

было 37 (42%), из них к сочетаниям: рифампицин+изониазид – 3 (3.4%) ; рифампицин+изониазид+этамбутол – 1 (1.1%); рифампицин + изониазид + стрептомицин – 25(28%) ; рифампицин+изониазид+стрептомицин+этамбутол – 8 (9.1%).

Среди выделенных в 2004 г. штаммов первичная любая резистентность наблюдалась у 67 культур, что составило 76.10%.

### **Глава 3. Обсуждение результатов.**

#### **3.1 Молекулярное типирование региональных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Грузии.**

В условиях роста заболеваемости туберкулезом, сопровождаемого катастрофическим ростом лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) в России, ранняя диагностика и эффективное лечение в сочетании с выявлением контактов являются необходимыми звеньями борьбы с распространением возбудителя.

Однако особенности природы заболевания туберкулезом, в частности длительность инкубационного периода, множественная лекарственная устойчивость (MDR) и отсутствие надежных методов доказательства идентичности штаммов затрудняют не только лечение, но и эпидемиологические исследования в очагах. Последние достижения молекулярной биологии в сочетании с успехами в области молекулярной генетики микобактерий позволили разработать способы надежной дифференцировки штаммов *M.tuberculosis* на уровне хромосомной ДНК, которые существенно повышают эффективность микробиологической диагностики и эпидемиологических исследований при туберкулезе [139, 140].

В настоящее время доказано, что высокая степень геномного полиморфизма МБТ обусловлена наличием широкого спектра особых генетических элементов - повторяющихся последовательностей нуклеотидов - в составе хромосомной ДНК. Это послужило основой для разработки методов геномной дактилоскопии (фингерпринтинга), позволяющих

дифференцировать штаммы на основе выявления различий в количестве копий и локализации на хромосоме бактерий IS-элементов, в частности IS6110, коротких прямых повторов и их спейсеров (DVR), расположенных в DR-области хромосомы *M.tuberculosis* и ряда других последовательностей [130,96].

Начиная с 2001 года в Грузии впервые стали проводиться работы в направлении молекулярной эпидемиологии-микробиологический мониторинг биологических характеристик возбудителя и его топографии на указанных регионах, поиск источников инфекции и слежение за путями ее распространения. С ее помощью возможно доказать идентичность возбудителя при выявлении источника инфекции.

Исследуемые штаммы *M. tuberculosis* были выделены из мокроты 185 пациентов (100 мужчин и 50 женщин, возраст от 15 до 81 года) с диагнозом туберкулеза легких, находящихся на лечении в Национальном Центре туберкулеза Грузии, Тбилиси, за период 2001-2004 гг. Изоляты были проанализированы при помощи анализа длин рестрикционных фрагментов (ДНК-фингерпринтинг). Все клинические материалы были исследованы микроскопически (иммерсионная микроскопия по Циль-Нильсену), затем было проведено культуральное исследование (Левенштейн-Йенсен, Миддлбрук 7H10, пробирки MGIT).

Количество копий фрагмента рестрикции может служить одной из характеристик региональных штаммов, что подтверждено самым высоким содержанием копий у изолятов из Гонконга [27]. Так, многие исследователи отмечают количество копий, характерное для определенных регионов земного шара. Исследуя штаммы *M.tb*, выделенные в Юго-Восточной Азии и Китае, Fomukong с соавт. отмечает широкое распространение штаммов с единственной копией IS6110; Van Soolingen et al.(1993) также докладывали, что многие штаммы с Дальнего Востока содержат единственный элемент IS6110, как случилось с 30% штаммов из Индии, в другом исследовании 40% изолятов из Мадраса содержали всего одну копию, или не содержали ни одной [28]. Среди 41 штамма от пациентов вьетнамского происхождения у 5 штаммов была одна копия IS6110, а четыре изолята не содержали ее вовсе [120]. Некоторые штаммы из Малайзии, Танзании и Омана также содержали одну копию [41]. Интересно, что многие из низкокопийных изолятов, полученных в Танзании [119] и Дании [118] были выделены от пациентов азиатского происхождения.. Полученные нами

фингерпринты показали, что количество копий IS6110 в изолятах *M. tuberculosis*, выделенных в Грузии, варьировалось от 2 до 20, причем от 9 до 18 копий встречались наиболее часто, у 61 штамма. Обнаружены два штамма, вообще не имевших копий IS6110, что означает необходимость их молекулярного типирования с использованием других генетических маркеров.

Как уже упоминалось выше, профиль гибридизации микобактериального штамма является его своеобразной «визитной карточкой», и по наличию или отсутствию сходства конфигураций полос на автордиографе можно сказать, принадлежат ли штаммы к одному клону, либо нет. Фингерпринты региональных штаммов *M.tb.*, выделенных в Грузии, отличались большим разнообразием. Были найдены различные профили IS6110, 139 штаммов из 185 имели уникальный профиль IS6110.

По мере того, как метод молекулярного типирования получал все большее распространение в мире, ученых стал интересовать вопрос, возможно ли установить связь между изменением профиля резистентности и фингерпринтом штамма. Godfrey-Faussett с соавт. [49] исследовал последовательно выделенные штаммы от двух пациентов, развившие резистентность к рифампицину, Pineda-García с соавт.[90] провели такое же исследование для четырех пациентов, при первом тесте имевших чувствительные штаммы, но впоследствии, через 13 и 15 месяцев, выделявшие уже резистентные к двум и более препаратам микобактерии. Такие же наблюдения и у Rigouts с соавт.[93]. За время нашего исследования удалось получить последовательные культуры для четырнадцати пациентов, инфицированных лекарственно-устойчивым туберкулезом, после 10, 11 и 12 месяцев химиотерапии. У 12 из них штаммы показали идентичные профили IS6110, а в остальных двух случаях были получены очень сходные профили (у двух изолятов была одна лишняя полоса). В то же время, уровень лекарственной устойчивости изолятов повысился: 9 штаммов изначально были полностью чувствительны ко всем четырем препаратам, из них 4 приобрели резистентность к изониазиду и стрептомицину, один – только к изониазиду, а оставшиеся четыре стали мультирезистентными. Пять штаммов изначально были резистентными к изониазиду, все они стали мультирезистентными. Фингерпринты последовательных штаммов от одних и тех же больных показали полную идентичность генетического полиморфизма, что подтверждает сообщения других авторов[46,85,92]. Таким образом, изменение лекарственной устойчивости

штаммов *M.tuberculosis*, выделенных в Грузии, не влияло на изменение профиля гибридизации на фингерпринтах этих штаммов.

Настоящее исследование в Грузии является первым в данном регионе, в котором был использован эпидемиологический фингерпринтинг. В Грузии с населением в 4 500 000, заболеваемость туберкулезом высока (132/100 000) и часто встречаются формы с лекарственной устойчивостью. Среди 40 штаммов, проанализированных с помощью программы Gel compare, было обнаружено шесть маленьких кластеров. Дендрограмма, показывающая связь между этими 40 штаммами, показана на рис. 1. Пять из них состояли из двух и один из трех штаммов. Изоляты в одном кластере имели по четыре копии *IS6110*, это количество считается слишком низким для доказательства близкого родства штаммов, таким образом, необходимы дальнейшие исследования для демонстрации того, что штаммы идентичны.

Мазок-положительные клинические материалы были у 76% пациентов, и такие изоляты были представлены в каждом кластере штаммов с идентичными профилями гибридизации. Изоляты, выделенные из мазок-позитивных мокрот встречались чаще (в 81%) в составе кластеров, чем в числе штаммов с уникальными профилями гибридизации. Идентичные или тесно связанные штаммы были выделены от пациентов более молодого возраста (от 15 до 42 лет), чем от пациентов старшей возрастной группы. От пациентов старшей группы не было выделено идентичных штаммов и только 4 из 90 штаммов имели высокую степень схожести. Высокая степень преобладания сходных штаммов у младшей группы пациентов являлась статистически достоверной ( $p < 0.05$ ).

Было показано более частое инфицирование связанными или идентичными штаммами мужчин, чем женщин. Три кластера из двух штаммов и трех высокородственных (90%) штаммов были определены среди 132 изолятов, выделенных от пациентов мужского пола. вообще, преимущественное инфицирование туберкулезом лиц мужского пола заметил еще Holmes с соавт. в 1998г [58].

От женщин, из 53 изолятов, было выделено только девять штаммов высокой степени схожести. От 136 пациентов были выделены резистентные штаммы. В одном случае идентичный фингерпринт был найден у двух мультирезистентных штаммов от молодых людей из Тбилиси с мазок-положительным туберкулезом.

Около 51% всех пациентов были из Тбилиси, столицы Грузии. Многие изоляты из Тбилиси имели различные конфигурации RFLP; 31 (33%) неидентичный штамм имел высокую степень сходства (коэффициент симилярности 90%). Преобладание идентичных или сходных штаммов у пациентов из Тбилиси было статистически достоверным ( $p < 0.05$ ).

ДНК-фингерпринтинг штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от выборочных популяций в различных географических регионах были использованы для описания текущей трансмиссии определенных штаммов, например, лекарственно-устойчивых. Международный стандартный эпидемиологический маркер (IS6110) и метод (RFLP), а также стандартная система обработки данных (Gel Compar software) делают возможным группировку и сравнение результатов, полученных в различных исследованиях [116, 112, 114, 119]. Изоляты *M. tuberculosis* с идентичными фингерпринтами скорее всего эпидемиологически связаны, а пациенты, инфицированные ими, вероятно, заразились от определенного источника, тогда как пациенты, инфицированные штаммами с уникальными профилями гибридизации, скорее всего представляют собой случаи рецидива или же получили инфекцию из другого источника [89, 58, 62]. Таким образом, популяция с высоким процентом штаммов *M. tuberculosis*, принадлежащих к идентичным кластерам теоретически должна характеризоваться значительным уровнем трансмиссии [44, 21, 23].

Лекарственно-устойчивый туберкулез – это широко распространенная проблема в развивающихся странах. Однако, в Грузии не было продемонстрировано клональной трансмиссии туберкулеза среди пациентов с лекарственно-устойчивыми формами. Все резистентные штаммы *M.tuberculosis* показали широкое генетическое разнообразие профилей гибридизации. С другой стороны, лекарственно-устойчивые штаммы имели общие фингерпринты с чувствительными штаммами в 3 кластерах. Таким образом, можно сказать, что лекарственно-устойчивый туберкулез в Грузии проявляется скорее у некоторых несвязанных друг с другом пациентов (имеющих проблемы с лечением), чем путем распространения изначально резистентных штаммов *M. tuberculosis*.

В популяциях с быстрым распространением туберкулеза следует ожидать обнаружения больших кластеров идентичных штаммов. В данном исследовании самый большой кластер составил всего три штамма из 185 исследованных. Следовательно, 2% штаммов принадлежали к наибольшему кластеру, что можно сравнить с предыдущими публикациями, в которых говорилось о пропорциях штаммов от 2% в Нидерландах до 24% на



Карибских островах Гваделупы (таблица 19). Конечно, дальнейшие исследования в этой области внесут дополнения в полученные данные.

Важнейшими итогами данного исследования явились высокий уровень многообразия и отсутствие какого-либо конкретного клона, инфицирующего, к примеру, пациентов с лекарственно-устойчивыми формами ТБ. Хотя идентичные или высокосходные штаммы были выделены от определенных групп пациентов, например, мужчин или младшей возрастной группы, пациентов из Тбилиси. Таким образом, результат означает, что большинство недавних трансмиссий происходит между пациентами именно этих групп.

Таблица 19. Самые большие кластеры идентичных штаммов по локализации в мире.

Регион	Количество штаммов в самом большом кластере/общее количество штаммов (%)	Сноска
Гваделупа	12/51 (24)	105
Эфиопия	28/154 (18)	54
Сан-Франциско	30/191 (16)	101
Нью-Йорк	12/104 (12)	2
Дания	19/186 (10)	126
Колумбия	2/27 (7.4)	50
Тунис	10/190 (5.3)	54
Гондурас	3/84 (3.6)	87
Нидерланды	3/153 (2.0)	54
Грузия	3/40 (7.5)	Настоящее исследование

По результатам молекулярного типирования региональных штаммов *M.tuberculosis* в Грузии было установлено, что профили гибридизации исследованных изолятов отличаются большим генетическим разнообразием. Лишь малая их часть имела сходные финтерпринты, причем штаммы *M.tuberculosis* с идентичными или близкородственными профилями гибридизации были выделены от пациентов в возрасте до 42 лет. Все изоляты, полученные от пациентов старше 42 лет имели уникальные профили гибридизации. Из этого можно предположить, что трансмиссия микобактерий туберкулеза происходит среди младшей группы населения Грузии, у старшей группы наблюдается эндогенная реактивация туберкулеза. Исследования в области молекулярной эпидемиологии необходимо продолжать, с тем, чтобы составить библиотеку финтерпринтов региональных штаммов *M.tuberculosis* Грузии и затем сравнить их с европейской и американской базами данных и тем самым отследить географическое распределение родственных штаммов.

### **3.2 Оптимизация культуральной диагностики туберкулеза в Грузии.**

Туберкулез –это одна из основных проблем здравоохранения в странах бывшего Советского Союза, в том числе и в Грузии. После распада СССР , контроль туберкулеза , как и многие другие отрасли здравоохранения, пришел в упадок. Систематизированные исследования уровня лекарственно-резистентного туберкулеза , с использованием международных стандартизированных методов, не проводились. Не существовало соответствующих методов учета больных, из-за чего статистические данные часто нерепрезентативны. Лабораторная диагностика ТБ также пребывала в запустении, новые методы не внедрялись, а использование старых осложнялось отсутствием необходимых реактивов и сред.

В 1995 года в Грузии была создана Национальная Программа по борьбе с туберкулезом, во главу угла которой, наряду с эпидемиологией, была поставлена микробиологическая диагностика туберкулеза. Известно, что лабораторная диагностика туберкулеза может быть условно разделена на бактериоскопические и культуральные методы. В бактериоскопию входят иммерсионная и люминесцентная микроскопия, чувствительность этих методов часто не превышает 25-40% при сравнении с культурой, в идеальных случаях можно повысить ее до 60-70% [59]. Исследование мазков мокроты на кислотоустойчивые бактерии –наиболее быстрый способ получить доказательство туберкулезной инфекции, однако далеко не у всех инфицированных можно обнаружить в мазке микобактерии туберкулеза, к тому же по мазку невозможно отличить их от условно-патогенных кислотоустойчивых микобактерий.

Всемирная Организация Здравоохранения признает «золотым стандартом» диагностики туберкулеза получение из патологического материала живой культуры микобактерий туберкулеза [135], поэтому значение лабораторных методов диагностики невозможно переоценить. Необходимо было привести используемые методы в соответствие с существующими международными стандартами согласно рекомендациям ВОЗ, а также внедрить новые с целью ускорения и улучшения лабораторной диагностики. За период с 1997 по 2000 год микобактериологическая лаборатория при Национальном Центре Туберкулеза и Легочных Заболеваний Грузии была переоборудована и оснащена аппаратурой,

удовлетворяющей международным стандартам по работе с микобактериями. Культуральные исследования были стандартизированы, был приведен в соответствие с рекомендациями ВОЗ для национальных программ по борьбе с туберкулезом метод деконтаминации и концентрации клинических материалов. Для проведения посевов и тестов на лекарственную устойчивость была выбрана среда Левенштейн-Йенсена, и это было сделано по нескольким причинам. Во-первых, эта среда является традиционной для стран бывшего СССР, а также Европы, во-вторых, она достаточно дешева, чтобы использовать ее в рутинной работе, в третьих к числу ее достоинств относится относительная простота приготовления, низкий уровень контаминации и достаточно долгий (до 4 месяцев) срок хранения готовых пробирок. Следует отметить, что эта среда использовалась в Грузии со дня основания микобактериологической лаборатории, примерно с середины 30-х годов прошлого века.

Многие исследователи отмечают, что культуральный метод-очень трудоёмкий, дорогостоящий и медленный [59, 11, 60]. С другой стороны, от 15 до 25% мазок-отрицательных клинических материалов дают положительную культуру, чем подтверждается диагноз туберкулеза. Выделение культуры возбудителя из клинических материалов-самый достоверный способ постановки диагноза туберкулеза. В проведенном нами исследовании 25% культур было выделено из клинических материалов с отрицательным результатом микроскопии. Это подтверждает диагностическую ценность именно культурального метода диагностики туберкулеза. Традиционный метод культивирования на среде Левенштейн-Йенсена требует от 3 до 8 недель, и именно в этом состоит ее главный недостаток. Кроме того, если в процессе культивирования появляется рост сопутствующей микрофлоры, он отмечается по всей поверхности питательной среды, из-за чего данные пробы становятся непригодными для исследования [135]. Обязательная составляющая лабораторной диагностики туберкулеза - это тест на лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам первого ряда: стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу. Длительность этого теста составляет 21 день, следовательно, от сдачи пациентом мокроты или любого другого клинического материала до получения окончательного ответа, включающего в себя антибиотикорезистентность, проходит от 5 до 11 недель. Вместе с тем, знание конкретных микробиологических характеристик возбудителя имеет огромное значение для проведения курса химиотерапии и своевременной его корректировки.

По рекомендациям многих исследователей микобактериологическая лаборатория должна использовать в работе с культурами более одной среды, так как часто бывает, что разные штаммы *M.tuberculosis* отдают предпочтение разным средам, как яичным так и синтетическим. Имеет также значение тип среды, известно, например, что в жидких средах рост имеет место значительно чаще, чем на твердых. Оптимальная комбинация сред для выделения микобактерий-это плотная и жидкая одновременно, что позволяет максимально повысить вероятность высевания культуры возбудителя. В разных странах мира давно и успешно используют для выделения культуры *M.tuberculosis* в рутинной работе бактериологических лабораторий такие среды, как агары Миддлбрук 7Н10 и 7Н11, а также бульон Миддлбрук 7Н9. Эффективность этих сред неоднократно освещалась в научных публикациях микробиологов разных стран. Агары Миддлбрук, благодаря своей прозрачности, могут просматриваться под микроскопом проходящего света, что позволяет отметить рост еще на стадии микроколоний. Кроме того, преимущество такого способа просмотра культуры, дает возможность дифференцировать микобактерии по морфологии формируемых ими колоний. Пробирки с индикатором роста MGIT (*Mycobacterium Growth Indicator Tube*) по существу являются мини-прибором для индикации роста микобактериальной культуры. Они содержат модифицированный бульон Middlebrook 7Н9. Встроенный в силикон дна пробирок флюоресцентный компонент чувствителен к присутствию кислорода, растворенного в бульоне. Активно размножающиеся микобактерии поглощают кислород, что позволяет наблюдать интенсивную флюоресценцию при использовании ультрафиолетового света с длиной волны 365 нм (трансиллюминатор или лампа Вуда). Рост также может быть зафиксирован по наличию неомогенной замутненности - мелких зерен или хлопьев в культуральной среде. Благодаря флюоресценции, рост микобактерий может быть обнаружен на самой ранней стадии.

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилась оценка эффективности и возможности применения сред, ранее в Грузии не применявшихся, но в то же время хорошо зарекомендовавших себя по сообщениям исследователей в ряде стран мира, в частности, сред Миддлбрука: агара 7Н10 и модифицированного бульона 7Н9 в пробирках MGIT [3, 14, 87] по сравнению с аналогичными процедурами на среде Левенштейн-Йенсена, используемой традиционно. Также было проведено определение

сравнительной эффективности проведения тестов на лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам первого ряда тремя методами- абсолютных концентраций на среде Левенштейна-Йенсена, пропорций на агаре Middlebrook 7H10 и с использованием пробирок MGIT, содержащих модифицированный бульон Миддлбрук 7H9 (по методике производителя). Работа проводилась в Референс Микобактериологической Лаборатории Грузии (РМЛ) при Национальном Центре Туберкулеза и Легочных Заболеваний (НЦТЛЗ).

Эффективность культуральных качеств питательных сред оценивалась по следующим критериям: а) скорость исследования, б) высеваемость культур, в) уровень контаминации, г) интенсивность роста, д) простота и быстрота приготовления, е) длительность хранения среды и ж) стоимость.

Средняя скорость исследования на агаровой среде составила в среднем 20 суток, на яичной среде- 27 суток. Выделение культуры в пробирках MGIT в среднем составило 7,9 суток. Эти данные согласуются с данными других исследователей [15, 87, 14].

Таблица 20. Скорость высевания культур *M.tuberculosis* на различных питательных средах.

Среда	Первое проявление роста, дни	Позднейшее проявление роста, дни	Среднее значение
Левенштейн-Йенсена	14	62	27
Миддлбрук 7H10	10	49	20
MGIT	3	32	7.9

Среднее время роста на агаре Миддлбрук 7H10 было на 1 неделю меньше, чем на среде Левенштейн-Йенсена, тогда как в пробирках MGIT наличие роста микобактерий определялось на 17 дней раньше, чем на яичной среде.

Высеваемость на среде Левенштейна-Йенсена составила примерно 51%, на агаре Миддлбрук 7H10- 52 %, в пробирках MGIT -50,5 %. Нормальная высеваемость культур составляет примерно 52% [70].

Принято считать, что уровень контаминации при посевах на микобактерии должен составлять от 2 до 5 % всех клинических образцов мокроты. Если контаминировано менее 2 % посевов, считается, что деконтаминант убивает как постороннюю флору, так и большинство микобактерий. Если же уровень контаминации более 5%, процесс деконтаминации производится неадекватно [55]. Контаминация на среде Левенштейна-Йенсена составила 2,8%, на агаре Миддлбрук 7H10- 3%, в пробирках MGIT- 4.5 %. Относительно более высокий уровень контаминации в средах Миддлбрука по сравнению со

средой Левенштейн-Йенсена может объясняться меньшим содержанием малахитового зеленого ( 0.0002г/л против 2г/л), а также более мягким способом деконтаминации мокроты . Деконтаминация с использованием N-ацетил-L-цистеина+NaOH помогает сохранить жизнеспособными на 35% больше микобактерий, чем жесткая деконтаминация по модифицированному методу Петрова, используемая для посева на среду Левенштейн-Йенсена, но, с другой стороны, допускает большую вероятность контаминации посева вторичной флорой. Интенсивность роста на агаре составила 3 по трехплюсовой шкале оценки роста культуры, тогда как на яичной среде этот показатель был равен 2. То есть, при равной интенсивности роста, культуру на агаре можно обнаружить с опережением как минимум в одну неделю. За период с 2001 по 2004 гг. исследования на яичной среде Левенштейн-Йенсена микобактерии туберкулеза были выделены в 993 из 1605 ( 62%) клинических образцов. Для агара Миддлбрук 7Н10 и пробирок MGIT этот показатель составил 990 (61,7%) и 989(61,6%) соответственно. Вычисленный коэффициент каппа показал идеальное совпадение между этими тремя методами культивирования.

Таблица 21. Сравнение высеваемости и контаминации засеянных культур на различных питательных средах.

Среда	Культура + образцы		Культура-образцы		Контаминация	
	#	%	#	%	#	%
Левенштейн-Йенсена	993	62,0	567	35,1	45	2.8
Миддлбрук 7Н10	990	61,7	566	35,3	49	3
MGIT	989	61,6	530	33	72	4.5

Приготовление среды *Левенштейна-Йенсена*-это длительный и трудоемкий процесс, он включает в себя, кроме приготовления собственно раствора среды и автоклавирования, такую стадию, как получение яичной эмульсии с предварительным замачиванием яиц в дезинфектанте и их последующей гомогенизацией. Кроме того после смешивания яичной основы с раствором сухой базы среды, смесь нужно обязательно профильтровать. По нашим расчетам, приготовление 100 пробирок яичной среды занимает от 3 до 4 часов рабочего времени трех лаборантов и двух санитаров. Приготовление агара *Миддлбрук* требует разведения 37,2 г сухой базы в дистиллированной воде, затем агар нужно проавтоклавить, добавить ростовую добавку и можно разливать по пробиркам. Времени на это требуется от 1 до 1,5 часов. Пробирки MGIT не требуют приготовления вообще. Единственное, что нужно сделать-это асептически добавить в пробирку 0,5 мл ростовой добавки и (в случае внелегочных материалов) смесь лиофилизированных антибиотиков

PANTA, и пробирки готовы к употреблению. Некоторые сравнительные характеристики использованных сред приведены в **Таблице 22**.

Агар Миддлбрук можно хранить 3-4 месяца в темном прохладном месте, так же, как и пробирки MGIT. В этом отношении эти среды не уступают среде Левенштейна-Йенсена. Единственное ограничение-их нельзя оставлять на свету, так как образующийся формальдегид пагубно влияет на микобактерии. Недостатком сред Миддлбрука является их сравнительная дороговизна по сравнению со средой Левенштейна-Йенсена, но, учитывая экономию времени, меньшую трудоемкость приготовления и процедуры, этот фактор перекрывается уменьшением человеко-часов, затраченных на проведение тестов, а также быстротой получения результатов анализов пациентами и клиницистами- со всеми вытекающими отсюда последствиями: своевременной и точной диагностикой, коррекцией химиотерапии, ценными данными для эпидемиологических исследований.

Таблица 22.Сравнение некоторых характеристик различных питательных сред для выделения культур микобактерий.

Среда	Количество лабораторгов	Время пригот. (на 100 проб.)	Выход из 500г сухой базы (л)	Основа	Стандарт	Добавки	Стоимость на 100 проб. /100чашек Петри
Левенштейн-Йенсена	3	4 часа	14	Сухая база	нет	Яичная масса	5-7долл.США
Миддлбрук 7Н10	2	1-1.5 часа	27	Сухая база	да	OADC	20-25 долл.США
MGIT	1	20 минут	-	Готовая в пробирках	да	OADC	6 долл.США/ 1 пробирка

Применение пробирок MGIT в наших условиях оправданно для urgentных случаев, например, туберкулезного менингита, когда каждый день и час имеют значение для спасения жизни пациента. Культуры, выращенные на бульоне Миддлбрука можно использовать для экстракции бактериальной ДНК, субкультур и других исследований без дополнительного пересевания. По результатам исследования можно предположить, что применение агаровых и бульонных сред миддлбрука в Грузии вполне реально, хотя, конечно, это потребует больших финансовых затрат.

По результатам проведенного исследования среды Миддлбрука показали себя высокоэффективными по ряду параметров и значительно сокращающими время культурального исследования при диагностике туберкулеза. Применение агаров Миддлбрук 7Н10 позволяет сократить время диагностики до 2-3 недель по сравнению с яичной средой.

Применение пробирок MGIT позволяет определить рост *Mycobacterium tuberculosis* уже на третий-пятый день после посева. Среда Миддлбрук характеризуется простотой приготовления, лучшей высеваемостью и большей интенсивностью роста культуры. Более высокая стоимость этих сред окупается возможностью ранней диагностики туберкулеза и своевременным контролем курса химиотерапии. Использование агар Миддлбрук 7H10 и пробирок MGIT позволяет получить результат гораздо быстрее, чем на традиционной среде Левенштейн-Йенсена и даже их относительная дороговизна в конечном итоге оправдывается своевременным микробиологическим подтверждением диагноза и возможностью контроля химиотерапии. Данная работа подтвердила, что агары Миддлбрук и система MGIT имеют огромный потенциал для Грузии: они экономят время лабораторной диагностики, результаты коррелируют с результатами, полученными традиционным методом, они компактны, легки в приготовлении, просты в использовании, не требуют применения радиоактивных элементов. Эти преимущества оправдывают применение агара Миддлбрук 7H10 и MGIT для детекции микобактерий в клинических материалах и тестирования изолятов *M. tuberculosis* на лекарственную устойчивость в лабораториях развивающихся стран с высоким уровнем заболеваемости туберкулезом.

Кроме посевов клинических материалов, в данном исследовании определялась эффективность применения агаров Миддлбрук и пробирок MGIT в проведении непрямого теста на лекарственную чувствительность в условиях страны с низким уровнем экономического развития и высокими показателями заболеваемости туберкулезом, каковой в настоящее время является Грузия. Оценивалась чувствительность применяемых методов, их специфичность, взаимная корреляция полученных результатов лекарственной устойчивости микроорганизмов, а также некоторые характеристики приготовления наборов сред для проведения тестов. Существует два важнейших параметра для оценки при предложении любого нового метода тестирования лекарственной устойчивости. Во-первых, его результаты должны быть сравнимы по точности с традиционным, во-вторых, он должен быть значительно быстрее. В данном исследовании оба предложенных метода удовлетворяют этим требованиям.

По данным Pablos-Mendez с соавт.[83] примерно 10% всех изолятов *M. tuberculosis*, выделяемых в мире от нелеченных больных, резистентны как минимум к одному противотуберкулезному препарату, и до получения результатов исследования лекарственной



устойчивости значительное количество этих больных может получать неподходящее лечение в течение длительного времени.

Уровень совпадений трех разных методов проведения теста на лекарственную устойчивость *M.tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам первого ряда был определен при помощи метода каппа-статистики [90]. Основное внимание уделялось показателям чувствительности, специфичности и коэффициенту согласия Каппа. Чувствительность характеризует долю правильно проведенных тестов с помощью данного метода. Чувствительность равная 1.0 означает, что данная методика правильно определяет лекарственную устойчивость *M.tuberculosis* в 100% случаев. Специфичность характеризует долю правильного определения случаев отсутствия лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* при использовании данного метода. Специфичность равная 1.0 означает, что данная методика в 100% случаев правильно определяет отсутствие искомой лекарственной устойчивости. Коэффициент Каппа отражает степень согласия между двумя тестами, проведенными по данным методикам. Значение коэффициента Каппа равное 1.0 означает полное совпадение результатов тестов, а значение равное 0.0 – полное отсутствие согласия между ними. Данные были интерпретированы в показателях чувствительности и специфичности для каждого из препаратов, использованных в тест-системах по сравнению с традиционным тестом. В таблицах 4 и 5 показаны оценки чувствительности и специфичности тестов, проведенных методом пропорций на агаре Миддлбрук 7Н10 и в пробирках MGIT по отношению к тестам, проведенным по методу абсолютных концентраций на среде Левенштейн-Йенсена.

**Таблица 23. Оценка чувствительности и специфичности определения лекарственной устойчивости микобактерий на средах Левенштейн-Йенсена и Миддлбрук 7Н10**

	Все S	LJ-S/ 7H10-R	LJ-R / 7H10-S	Все R
	A	B	C	D
<b>STR</b>	259	15	14	185
<b>INH</b>	276	11	16	170
<b>RIF</b>	343	6	6	122
<b>EMB</b>	365	14	6	93

Вычислялись следующие показатели: Чувствительность= D/D+C, Специфичность= A/A+B

Предиктивная оценка (чувствительность) = A/A+C, предиктивная оценка (резистентность)= D/D+C

**Таблица 23а. Коэффициент Каппа чувствительности и специфичности теста лекарственной устойчивости микобактерий на средах Левенштейн-Йенсена и Миддлбрук 7Н10**

Препарат	Чувствительность	Специфичность	П/О чувств.	П/О спец.
<b>STR</b>	0.93	0.95	0.95	0.93
<b>INH</b>	0.91	0.96	0.95	0.91
<b>RIF</b>	0.95	0.98	0.98	0.95
<b>EMB</b>	0.94	0.96	0.98	0.94

**Таблица 24. Оценка чувствительности и специфичности определения лекарственной устойчивости микобактерий на среде Левенштейн-Йенсена и в MGIT**

	ALL S	LJ-S/ MGIT-R	LJ-R / 7H10-S	ALL R
	A	B	C	D
STR	259	21	19	185
INH	276	15	25	170
RIF	343	8	7	122
EMB	365	19	7	93

Вычислялись следующие показатели: Чувствительность= D/D+C, Специфичность= A/A+B

Предиктивная оценка (чувствительность) = A/A+C, предиктивная оценка (резистентность)= D/D+C

Препарат	Чувствительность	Специфичность	П/О чувств.	П/О спец.
STR	0.9	0.93	0.93	0.9
INH	0.88	0.95	0.92	0.88
RIF	0.95	0.98	0.98	0.95
EMB	0.93	0.95	0.98	0.93

Общее совпадение результатов для всех трех тестов составило от 94.2 до 99.8%, как показано на Таблице 25.

**Таблица 25. Корреляция результатов тестов лекарственной устойчивости *M.tb* на различных питательных средах.**

Среда	Стрептомицин		Изониазид		Рифампицин		Этамбутол	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Левенштейн-Йенсен – M7H10	461 95%	25 5%	464 95.5%	22 4,5%	474 97.5%	12 2.5%	458 94.2%	28 5.8%
M7H10- MGIT	479 98.6%	7 1,4%	480 98.8%	6 1,2%	482 99,8%	4 0,2%	481 99%	5 1%
Левенштейн-Йенсен- MGIT	461 95%	25 5%	464 95.5%	22 4,5%	474 97.5%	12 2.5%	466 96%	20 4%

Такая степень корреляции считается очень хорошей и свидетельствует о низком уровне систематических погрешностей.

За прошедшие годы большинство исследований, сравнивающих разные системы тестирования лекарственной устойчивости с методом пропорций на агаре Миддлбрук 7H10 продемонстрировали расхождения в результатах. Истинно-главной ошибкой по определению считается ложно-чувствительный результат теста. Сравнивая ручную систему MGIT с методом пропорций на агаре, Walters и Hanna [123] доложили о трех истинно-главных ошибках из 117 штаммов *M. tuberculosis* (два-по изониазиду и один по рифампицину). В большом мультицентровом исследовании 441 штамма *M. tuberculosis*, Rüsч-Gerdes с соавт. [95] обнаружили 11 штаммов, дававших главную ошибку в подобном сравнительном исследовании (один-по изониазиду, три-по рифампицину, пять-по этамбутолу и два-по стрептомицину).

Сравнивая полностью автоматизированную MB/BacT систему (с использованием пробирок MGIT) с методом пропорций на агаре, Diaz-Infantes et al. (5) выявил 5 главных ошибок в тестировании 83 штаммов *M. tuberculosis* (три –по этамбутолу и две-по стрептомицину). Малая пропорция ложнопозитивных результатов лекарственной устойчивости в сравнении среды Левенштейн-Йенсена с агаром Миддлбрук 7H10 (3%-по стрептомицину; 2% по изониазиду; 1% по рифампицину и 2.8% по этамбутолу) и в сравнении той же яичной среды с MGIT ( 4% по стрептомицину, 3% по изониазиду, 1.6% по рифампицину и 4% по этамбутолу) свидетельствует о том, что тесты, проведенные в условиях Национальной Референс Лаборатории Грузии вполне достоверны в определении истинно-резистентных штаммов *M. tuberculosis*. Тем не менее, желательно проведение дополнительных серий тестирования для подтверждения этих результатов.

Ложно-резистентный результат теста считается главной ошибкой, так как он означает неэффективность препарата при лечении, хотя в реальности препарат может с успехом применяться. В нашем исследовании было выявлено следующее количество несовпадающих результатов для среды Левенштейн-Йенсена и агара Миддлбрук 7H10: по 3% по стрептомицину и изониазиду, и по 1% для рифампицина и этамбутола. Для среды Левенштейн-Йенсена и MGIT : 4% по стрептомицину, 5% по изониазиду и по 1% по рифампицину и этамбутолу.

Расхождения в интерпретации между тестами на яичной среде и на средах Миддлбрук можно объяснить тем, что и на агарах, и в бульоне (в случае проведения теста в автоматизированной системе Бактек-960) определение устойчивости дробное, то есть можно обозначить штаммы как средне- и слабрезистентные. В этом случае количество расхождений в результатах падает практически до нуля.

Сравнение коэффициента Каппа специфичности с чувствительностью при критических концентрациях препаратов в средах означает, что проведенные тесты обладают высокой степенью достоверности. Как видно из таблиц, коэффициент совпадения для каждого отдельно взятого метода по сравнению с традиционным методом абсолютных концентраций показал отличную степень согласования результатов. Самое большое расхождение (Каппа=0.88) было выявлено для чувствительности теста на лекарственную устойчивость *M.tuberculosis* к изониазиду в пробирках MGIT. Это может объясняться более низкой критической концентрацией изониазида (0.1 мкг/мл) в бульоне.

Одним из главных критериев оценки культуральных свойств питательных сред является *время получения результата*. Для яичной среды соблюдался срок, определенный методикой, то есть 21 день. Тест оценивался в первую очередь по росту на контрольных пробирках, не содержавших противотуберкулезных препаратов. Агаровая среда проверялась ежедневно, начиная с 10 дня после инокуляции под микроскопом проходящего света, позволяющим увидеть колонии микробов на ранней стадии роста. Культуры, засеянные в пробирки MGIT, проверялись, согласно методике, указанной производителем, начиная с третьего дня после посева на трансиллюминаторе с ультрафиолетовым светом. Отсутствие роста в препарат-содержащей пробирке, в течение 2-х дней, когда определяется рост в пробирке, не содержащей препарата, указывало на чувствительность организма к препарату. Флюоресценция в препарат-содержащей пробирке, наблюдаемая менее, чем через два дня по сравнению с флюоресценцией в препарат-несодержащей пробирке, означала устойчивость микроорганизма к препарату. Результаты сравнительной скорости и интенсивности роста бактерий можно видеть в Таблице 4.

**Таблица 26. Сравнительная скорость исследования лекарственной устойчивости на средах Левенштейна-Йенсена, Миддлбрук 7Н10 и в пробирках MGIT**

Среда	Первые признаки роста (дни, в среднем)	Интенсивность роста (в среднем)
Л-Й	21	+1,5
Миддлбрук 7Н10	14	2+
MGIT	7,7	-

Среднее время получения результатов лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* на агаре Миддлбрук 7Н10 составило 14 дней, что на 1 неделю меньше, чем при проведении теста на среде Левенштейн-Йенсена. Результаты теста в пробирках MGIT в среднем были получены за 7.7 дней, что немного меньше, чем по данным G.Pfyffer с соавт [87] (6.5 дней, автоматизированная система Бактек 960), но меньше, чем у Badak с соавт. [3] (6.5 дней). Таким образом, применение ручной системы MGIT для тестирования лекарственной устойчивости штаммов *M. tuberculosis* сократило сроки исследования в среднем на 13.3 дня. Между чувствительными и резистентными штаммами не было выявлено статистически значимого расхождения ( $P > 0.05$ ) по скорости проведения тестов.

Данное исследование продемонстрировало, что агар Миддлбрук 7Н10 и неавтоматизированная система MGIT является надежным и быстрым методом проведения теста на лекарственную устойчивость *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам первого ряда. Также оно показало, что отличное исполнение этих тестов, освещавшееся в

публикациях [3, 14, 82,86], вполне осуществимо в странах с низким уровнем экономического развития. Таким образом, агар Миддлбрук 7Н10 и пробирки MGIT представляют собой вполне доступную и конкурентоспособную технологию для бактериологических лабораторий в подобных странах, в частности, в Грузии. Эти среды более необходимы в странах с высоким уровнем распространенности мультирезистентного туберкулеза. Необходима финансовая помощь со стороны правительства Грузии, а также международных организаций и биомедицинских компаний для обеспечения микобактериологических лабораторий Грузии этими средами, что поможет усилить стратегию контроля резистентного туберкулеза в стране.

### **3.3 Профили резистентности выделенных штаммов *M.tuberculosis* и динамика изменения их соотношения по годам за период 2001-2004 гг.**

Эпидемическая вспышка туберкулеза, свидетелями которой мы стали сегодня, возникла в весьма своеобразных условиях. Ей предшествовали значительные успехи в борьбе с этим заболеванием, остававшимся спутником человечества на протяжении всей его истории. В 50–80–х годах XX века заболеваемость и смертность от него быстро снижались, а в экономически развитых странах Европы и Северной Америки туберкулез наблюдали почти исключительно у иммигрантов из стран третьего мира и у социально дезадаптированных групп населения. Эти несомненные успехи, происходившие и в Грузии, породили, казалось бы, вполне обоснованные надежды на скорую победу над этой инфекцией. Действительно, задача ликвидации туберкулеза, как распространенного заболевания, была вполне официально поставлена в качестве одной из основных задач перед органами здравоохранения в последние два десятилетия существования Советского Союза. Основания для подобных надежд представлялись, на первый взгляд, достаточными, поскольку туберкулез относился к досконально изученным инфекциям, имелись высокоэффективные противотуберкулезные препараты и были разработаны надежные методы его лечения [49, 78, 83].

Современное положение с туберкулезом в Грузии следует характеризовать, как серьезную эпидемию. Это заболевание прочно и с большим отрывом заняло первое место среди всех инфекций и продолжает быстро распространяться. В 1994 году распространенность туберкулеза в Грузии достигала 286 на 100 тыс. населения. С момента создания Национальной Программы по Борьбе с Туберкулезом в 1995 году, основные его эпидемиологические показатели постепенно пошли на спад благодаря внедрению

рекомендованной Всемирной Организацией Здравоохранения стратегии борьбы с туберкулезом. Тем не менее, они все еще остаются очень высокими. В среднем по Грузии за 2004 г. распространенность туберкулеза достигла 136 на 100 тыс. населения.

В настоящее время в большинстве стран мира, в том числе и в Грузии, применяются **режимы, рекомендуемые Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ)**. Согласно этим рекомендациям, больным с впервые выявленным туберкулезом, сопровождающимся бактериовыделением, на первом этапе назначают четыре противотуберкулезных препарата – изониазид, рифампицин, пиразинамид и этамбутол (или стрептомицин). Больным с рецидивами туберкулеза или при неэффективности ранее проводившегося его лечения следует назначать все пять указанных препаратов или же заменять один из них протионамидом. Менее интенсивное лечение (прием изониазида, рифампицина и пиразинамида или этамбутола) рекомендовано только больным с ограниченными поражениями легких, без бактериовыделения. Необходимость столь интенсивной терапии на первом этапе лечения, помимо высокой эффективности, обусловлена все более частыми случаями лекарственной устойчивости (первичной и вторичной), выявляемой обычно со значительным опозданием. Назначение же одновременно нескольких противотуберкулезных средств позволяет преодолеть возможную лекарственную устойчивость к одному или даже к двум из них. На втором этапе лечения химиотерапию рекомендовано проводить двумя или тремя противотуберкулезными препаратами (предпочтительно с включением изониазида и рифампицина), если отсутствует устойчивость к ним возбудителя.

Приведенные выше рекомендации ВОЗ легли в основу концепции стандартной терапии больных туберкулезом. В настоящее время подобная концепция стала доминирующей во всем мире [84, 135]. Ее распространению способствовали накопление опыта в условиях строгого и объективного контроля, легкость организации и контроля за стандартной терапией, а также более высокая ее эффективность, мало зависящая от квалификации лечащего врача, полноты и качества проводимых обследований. Важно подчеркнуть, что стандартизация химиотерапии отнюдь не исключает перехода на индивидуальный режим лечения. Подобная необходимость возникает чаще всего при заражении лекарственно устойчивыми формами возбудителя (**первичная резистентность**) или при ее развитии в процессе неправильно и нерегулярно проводимой химиотерапии

**(вторичная резистентность)**. Известно, что химиопрепараты по-разному действуют на микробную клетку. Одни ингибируют синтез клеточной стенки бактерий путем разрушения пептидогликана, липопротеидной фракции, подавления функции и диффузии через цитоплазматическую мембрану; другие угнетают синтез нуклеиновых кислот путем нарушения метаболизма РНК и ДНК, избирательного действия на плазмиды, митохондрии, ингибирования РНК-полимеразы, образования разрывов в цепи ДНК, ингибирования репликации ДНК; третьи влияют на функции рибосом, что приводит к разрушению цитоплазмы и гранулярного аппарата.

Так, изониазид оказывает бактерицидное действие, особенно на юные размножающиеся микробные клетки, подавляя синтез миколоевой кислоты в бактериальной стенке, а также разрушая цитоплазму и ее гранулярную субстанцию, состоящую из ДНК. Изониазид способен уничтожить более 90% микобактерий туберкулеза после 7 дней применения. Рифампицин также дает бактерицидный эффект, подавляя активность рибосомной РНК-полимеразы и ингибируя синтез ДНК. Рифампицин, как и изониазид, влияет не только на быстро, но и медленно размножающиеся и даже персистирующие МБТ. Пиразинамид оказывает бактерицидное действие на медленно размножающиеся МБТ, в том числе располагающиеся внутриклеточно, в макрофагах. Механизм действия пиразинамида окончательно не изучен. Наибольший эффект он дает в кислой среде (рН 5,5) на персистирующие варианты. Стрептомицин ингибирует рибосомные протеины, подавляя их синтез. Эффект его проявляется не сразу, а через несколько поколений микробных клеток. Препарат характеризуется сравнительно слабым бактерицидным действием. Этамбутол разрушает стенку микробной клетки, оказывая бактерицидное действие только в больших дозах (24 мг/кг). Рифампицин нарушает функцию  $\beta$ -субъединицы бактериальной РНК и тем самым транскрипцию, но мутации в про-гене обеспечивают устойчивость микобактерии к этому препарату [110,111].

Наиболее существенным для эффективного лечения является бактерицидное действие некоторых противотуберкулезных препаратов, в частности, изониазида и рифампицина, способных быстро убивать большое количество активно размножающихся микобактерий туберкулеза [80, 108].

По мере затихания туберкулезного процесса, величина бактериальной популяции уменьшается вследствие подавления размножения микобактерий туберкулеза. В условиях продолжающейся химиотерапии и уменьшения бактериальной популяции в организме больного сохраняется часть микобактерий туберкулеза, которые находятся в состоянии персистенции. Персистирующие микобактерии нередко выявляются только микроскопическим методом, так как при посеве на питательные среды они не растут. Такие микобактерии называют «спящими» или «дремлющими», иногда «убитыми». В качестве одного из вариантов персистенции микобактерий возможна их трансформация в L-формы или мелкозернистые формы. На этом этапе, когда интенсивное размножение бактериальной популяции сменяется состоянием персистенции остающейся ее части, микобактерии находятся главным образом внутриклеточно (внутри фагоцитов).

Еще несколько лет назад считалось, что эффективность химиотерапии во многом зависит от ее длительности. В период появления первых противотуберкулезных препаратов продолжительность лечения была сравнительно небольшой (1–3 мес). По мере появления новых химиопрепаратов продолжительность лечения постепенно увеличивалась и составляла 12–18 мес. В настоящее время это положение пересмотрено. Апробированная во многих странах методика контролируемой химиотерапии укороченной длительности показала свою высокую эффективность и позволила значительно сократить длительность лечения (до 6–9 мес) за счет использования рациональных режимов химиотерапии, способствующих быстрому подавлению микобактериальной популяции и прекращению бактериовыделения.

Своевременно внесенная коррекция значительно повышает эффективность химиотерапии, способствует более быстрому заживлению деструктивных изменений в легких. Вместе с тем не у всех больных удается достичь положительных результатов лечения. Поэтому повышение эффективности химиотерапии остается одной из главных проблем фтизиатрии. В литературе описано множество причин, препятствующих излечению больного.

Наиболее важной проблемой химиотерапии остается **лекарственная резистентность МБТ**, так как в последнее время во всем мире отмечается увеличение частоты выявления лекарственно-устойчивых МБТ даже у впервые выявленных, ранее не леченных больных деструктивным туберкулезом легких.

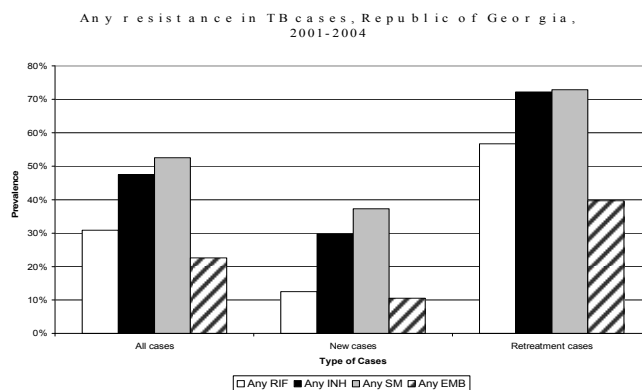


Феномен лекарственной устойчивости МБТ имеет важное клиническое значение. Существует тесная взаимосвязь между количественными изменениями бактериальной популяции и изменением ряда биологических свойств микобактерий, одним из которых является лекарственная резистентность. В большой размножающейся бактериальной популяции всегда имеется небольшое число лекарственно–устойчивых мутантов, которые практического значения не имеют, но по мере уменьшения бактериальной популяции изменяется соотношение между количеством чувствительных и устойчивых МБТ. В этих условиях происходит размножение главным образом устойчивых МБТ, эта часть бактериальной популяции увеличивается, достигая критической пропорции, иногда даже превышая ее. Следовательно, в клинической практике необходимо исследовать лекарственную чувствительность микобактерий и результаты этого исследования сопоставлять с динамикой туберкулезного процесса.

В данном исследовании авторы поставили целью определить соотношение между чувствительными и устойчивыми штаммами *M.tuberculosis*, выделенными от пациентов с эпидемиологически опасной легочной формой туберкулеза, определить пропорцию первичной и вторичной резистентности, а также проследить динамику их изменения по годам с 2001 по 2004.

На Рис. 19 в графическом виде показано распределение типов резистентности по антитуберкулезным препаратам в любых сочетаниях всех выделенных в Грузии штаммов ТБ за период 2001-2004 гг. Как видно из графика, региональные штаммы, резистентные к стрептомицину составляют более 50% в общем количестве случаев, более 70% для ранее леченных больных и до 40% у вновь выявленных случаев. Резистентные к изониазиду составляют: до 50% в общем количестве случаев, более 70% для ранее леченных больных и 30% у вновь выявленных случаев. Следующая по распространенности-резистентность к рифампицину: более 30% в целом, около 60% у ранее леченных больных, до 15 % у новых случаев. Резистентность к этамбутолу составила более 25% в общем количестве случаев, 40% у леченных больных и 10% у новых случаев туберкулеза.

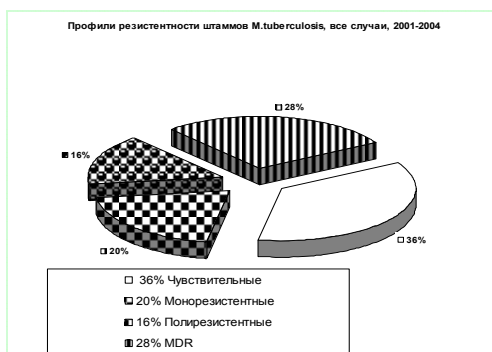
**Рисунок 19. Резистентность штаммов M.tuberculosis, выделенных в Грузии, 2001-2004.**



Хотя самые высокие показатели относятся к штаммам M.tuberculosis, выделенным от ранее леченных пациентов и представляют собой вторичную резистентность, из графика видно, что уровень первичной резистентности катастрофически велик, особенно к стрептомицину.

Как видно из Рис.20, при рассмотрении общего количества штаммов M.tuberculosis резистентность распределяется так: полностью чувствительные штаммы M.tuberculosis составляют 36% всех изолятов, монорезистентные -16%, полирезистентные-20%, штаммы же со множественной лекарственной устойчивостью (MDR) составляют 28% всей исследованной за четыре года бактериальной популяции. Учитывая тот факт, что «дикие» штаммы M.tuberculosis, циркулирующие в популяции, за исключением единичных мутантов отличаются полной чувствительностью к противотуберкулезным препаратам, налицо постепенная смена генотипа и фенотипа региональных микобактерий Грузии на резистентный тип.

**Рисунок 20. Распределение профилей резистентности среди штаммов M.tuberculosis, все случаи, 2001-2004**

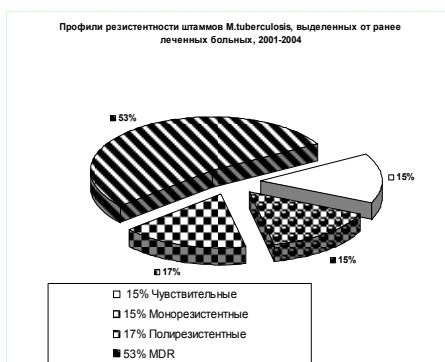


На Рисунке 21 показано распределение типов резистентности и пропорция чувствительных штаммов M.tuberculosis, выделенных от ранее леченных больных за весь период исследования. Как видно из рисунка, преобладает количество штаммов

*M.tuberculosis*, резистентных как минимум к изониазиду и рифампицину, то есть мультирезистентных (53%). Полирезистентные штаммы *M.tuberculosis* у таких больных занимают 17% от общего количества. Еще меньший процент отходит к монорезистентным штаммам и ровно столько же полностью чувствительных ко всем четырем противотуберкулезным препаратам первого ряда. Это свидетельствует о том, что вторичная резистентность, развивающаяся в результате неправильного лечения, например, монотерапии, или преждевременного прерывания курса химиотерапии, как правило, распространяется более, чем на один противотуберкулезный препарат. В случае выделения от ранее леченного больного чувствительной культуры, можно предположить недавнюю реинфекцию.

На **Рисунке 22** представлены данные по распределению типов резистентности среди штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ранее не леченных больных туберкулезом. Как видно из рисунка, полностью чувствительные ко всем четырем противотуберкулезным препаратам культуры встречаются в 52 % всех «новых» случаев. Монорезистентные составили 24% , полирезистентные- 14%, 10 % культур были мультирезистентными.

**Рисунок 21. Распределение профилей резистентности среди штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от леченных больных, 2001-2004**

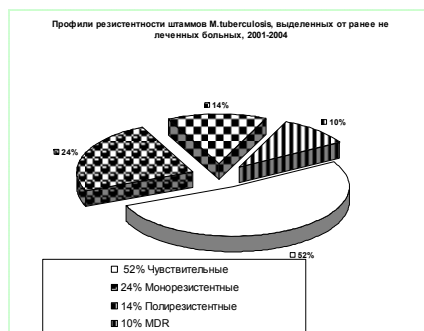


Распределение типов чувствительности-52 на 48%. Это свидетельствует о том, что в Грузии очень высокий уровень первичной резистентности. Из всех типов резистентности у новых больных преобладает монорезистентность-24%. Обычно на развитие монорезистентности требуется от одного до полутора месяцев, за это время, при условии что больной получает неправильное лечение, популяция возбудителя в организме успевает пройти селекцию и выживают только те микобактерии, которые успели мутировать. Поэтому в данном случае мы можем иметь дело с неточностями в сборе первичных эпидемиологических данных от

больных: многие из них по разным причинам скрывают факты приема в прошлом какого-либо из противотуберкулезных препаратов. Другое объяснение высокого уровня монорезистентности может заключаться в том, что культуральное исследование проводится не перед началом лечения такого больного, а через минимум один месяц после начала курса химиотерапии. Мультирезистентные и полирезистентные штаммы *M.tuberculosis*, очевидно, менее вирулентны, чем чувствительные, и поэтому их процентное соотношение у новых случаев сравнительно невелико.

Особенностью современной эпидемиологической ситуации по туберкулезу в мире является *резкое возрастание частоты первичной лекарственной устойчивости*, и Грузия не является исключением. Среди факторов, способствующих возникновению вторичной резистентности, на первом месте стоит недисциплинированность и несознательность больных, по разным поводам уклоняющихся от систематического приема противотуберкулезных препаратов.

**Рисунок 22. Распределение профилей резистентности среди штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от «новых» случаев, 2001-2004**



Значительно реже лекарственная устойчивость развивается из-за плохой переносимости отдельных препаратов, заставляющей прерывать их прием или назначать менее действенные режимы лечения. Быстрое нарастание частоты лекарственной устойчивости стало главной причиной недостаточной эффективности современных режимов химиотерапии туберкулеза. По прогнозам ВОЗ, к 2005 г. в мире заболеют бациллярными формами туберкулеза более 12 млн человек, и у 20–30% из них будет иметь место первичная лекарственная устойчивость к обычным противотуберкулезным препаратам. Одним из методов борьбы с первичной резистентностью должно стать усиление санитарно-просветительской работы среди населения, выявление групп риска и периодическое их обследование.

На графике 23А показаны изменения профилей резистентности выделенных штаммов *M.tuberculosis* по годам с 2001 по 2004 для всех типов больных.

**Рисунок 23. Временные изменения в резистентности туберкулеза в Грузии, 2001-2004.**  
**23А. Все случаи (ранее не леченные и ранее леченные)**



Как видно из графика, общий показатель резистентности с 2001 по 2004 год понижается: если в 2001 году общее количество резистентных культур *M.tuberculosis* превышало 80%, то к 2004 году этот показатель ниже 55%. Уровень резистентных культур снижается за счет уменьшения количества поли- и мультирезистентных штаммов *M.tuberculosis*, тогда как монорезистентность, имеет низшую точку в 2002 году (16.4%), а к 2004 году повышается до 21.8%.

На графике **23В** показано изменение во времени профилей резистентности штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ранее не леченных больных легочной формой туберкулеза.

На графике видно, что количество выделяемых резистентных культур всех типов от таких больных снижалось с 68.9% в 2001 году до 42.9% в 2004 году.

Интересно, что полирезистентность в 2001 году имела показатель, близкий к показателю монорезистентности, затем в 2002 г. их значения практически сравнялись, после чего, в 2003-2004 частота полирезистентных культур снижалась почти до значения мультирезистентности (11% полирезистентных культур и 9% мультирезистентных).

Уровень монорезистентности с 2002 по 2004гг спадает на приблизительно 1% в год-с 24.2 до 22.5%. В целом можно сделать вывод, что среди ранее не леченных больных уровень первично-резистентного туберкулеза с каждым годом медленно, но верно снижается.

### 23В. Резистентность у новых случаев туберкулеза, 2001-2004 гг.

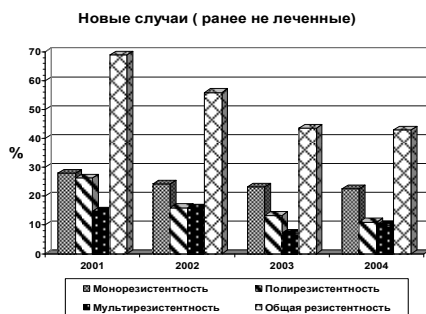
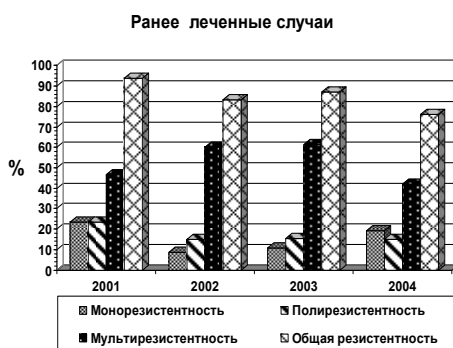


График 23С представляет картину динамики показателей резистентности для штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ранее леченных больных.

### 23С. Резистентность у ранее леченных случаев туберкулеза легких, 2001-2004 гг.



По сравнению с 2001 годом (93.7%), общий уровень резистентного туберкулеза среди ранее леченных больных, понизившись в 2002 году до 83.3%, в 2003 опять подскочил до 87.3%. В 2004 году общее количество резистентных штаммов *M.tuberculosis* составило 76.1%. Самый высокий уровень из всех типов резистентного туберкулеза имеет мультирезистентный тип. Его показатели составили в 2001 году 46.8%, в 2002-60%, в 2003 показатель достиг своего пика в 61.2%, затем, в 2004 спустился до 42%. Эти изменения можно объяснить тем, что определенная часть таких больных-это хроники, среди которых отмечается высокий уровень смертности, с другой стороны, каждый год определенная часть больных, в свое время неправильно лечившихся или прервавших курс химиотерапии, обращается к врачам с рецидивом болезни. За период с 2001 по 2004 год среди выделенных в Грузии региональных штаммов *M.tuberculosis* преобладали резистентные (64%). Из них резистентными к одному противотуберкулезному препарату (монорезистентными) были 20%, резистентными более чем к одному противотуберкулезному препарату (полирезистентными) были 16%,

резистентными как минимум к изониазиду и рифампицину (мультирезистентными) – 28%. Уровень первичной резистентности в Грузии очень высок и составляет 48% всех штаммов *M.tuberculosis*, выделенных от ранее не леченных больных. Среди первичной резистентности преобладает монорезистентность-24%, затем следует полирезистентность-14%, менее всего мультирезистентных культур, 10%, хотя это количество считается очень высоким [78,11]. Уровень вторичной резистентности составляет 85%, отсюда наивысший показатель у мультирезистентности-53%, полирезистентность составляет 17%, а монорезистентность-15%. За период с 2001 по 2004 гг. в Грузии наблюдается постепенное снижение как первичной, так и вторичной резистентности, что свидетельствует об эффективности действующей стратегии Программы по борьбе с туберкулезом.

#### **Глава 4. Выводы**

Проделанная работа дает основания для следующих выводов:

- 1) Молекулярное типирование региональных штаммов *M.tuberculosis* выявило их большое генетическое разнообразие. Количество копий фрагментов ДНК колебалось от 2 до 20 (чаще-9-18).
- 2) Изменение лекарственной устойчивости штаммов *M.tuberculosis* не влияло на изменение профиля гибридизации на фингерпринтах этих штаммов.
- 3) Молекулярное типирование *M.tuberculosis* может быть использовано в качестве трассерного вектора в эпидемиологических исследованиях туберкулеза в Грузии.
- 4) Среды Миддлбрука (агар Middlebrook 7H10 и бульон Middlebrook 7H9 в пробирках *MGIT*) значительно сокращают время культурального исследования в диагностике туберкулеза. Плотная среда дает ответ через 2 -3 недели, жидкая-на 5-7 день; они легки в применении и менее трудоемки по сравнению со средой Левенштейн-Йенсена.
- 5) Среды Миддлбрука с высокой эффективностью можно использовать для изучения лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* .
- 6) За период 2001-2004гг среди региональных штаммов *M.tuberculosis* в 64% доминировали резистентные. Монорезистентных было 20%, полирезистентных-16%, мультирезистентных-28%. С 2001 по 2004 гг наблюдается тенденция к снижению уровня общей резистентности *M.tuberculosis* в Грузии.

7) Несмотря на наблюдающуюся с 2001 по 2004 год тенденцию к снижению уровня общей резистентности, отмечаемые на сегодняшний день показатели первичной и вторичной резистентности остаются на тревожно высоком уровне, а их структура весьма неблагоприятна.

Представленная работа будет полезна для микробиологов, эпидемиологов и клиницистов, работающих в области туберкулеза. Следует продолжать исследования в области молекулярной эпидемиологии региональных штаммов микобактерий туберкулеза с тем, чтобы в дальнейшем каталогизировать их и сравнить с международными базами данных.

Метод генетического фингерпринтинга также нужно использовать для определения лабораторной кросс-контаминации, а также для выявления особенностей профилей гибридизации штаммов *M.tuberculosis* в зависимости от их географического распределения по Грузии. Данные молекулярной эпидемиологии в сочетании с традиционными эпидемиологическими исследованиями могут внести достойный вклад в стратегию борьбы с туберкулезом.

Предложенные в работе среды Миддлбрук 7H10 и пробирки MGIT значительно ускорят лабораторную диагностику туберкулеза и определение лекарственной устойчивости выделяемых штаммов *M.tuberculosis*. Это поможет клиницистам в своевременной диагностике и контроле химиотерапии, но в первую очередь, конечно, пациентам.



## Глава 5. Список литературы.

1. ATS/CDC/Council of the InfDisSociety of America: Diagnostic Standards and Classification of tuberculosis in adults and children/ Am j Respir Crit Care Med 2000; 161:1376-1395]
2. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAsdam RA, Hahn JA, Bosworth W, Drucker E, Bloom BR 1994. Transmission of tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 330: 1710-1716.
3. Badak F Z, Kiska D L, Setterquist S, Hartley C, O'Connell M A, Hopfer R L. Comparison of Mycobacteria Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:2236–2239.
4. Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W.R. Jr. (1994) inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1994. 263:227-230.
5. Bahrmand AR, Madani H, Bakayev VV, Babaei MH, Samar G, Anashchenko V., Polymerase chain reaction of bacterial genomes with single universal primer: application to distinguishing mycobacteria species., *Mol Cell Probes*. 1996 Apr;10(2):117-22
6. Baess I 1979. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of slowly-growing mycobacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand* 87: 221-226.
7. Bass PF, Farer LS, Hopewell PC, Jacobs RF, Snider DE 1990. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Resp Dis* 142: 725-735.
8. Bates JH, Fitzhugh JK 1967. Subdivision of the species *M. tuberculosis* by mycobacteriophage typing. *Am Rev Resp Dis* 96: 7-10.
9. Bauer J, Andersen AB, Kremer K, Miorner H. Usefulness of spoligotyping to discriminate IS6110 low-copy number *M.tb* complex strains cultured in Denmark. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2602-6.].
10. Bifani PJ, Mathema B, Liu Z, Moghazeh S, Shobsin B, Tempalski B, et al. Identification of a 'W' variant outbreak of *M.tb* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999; 282: 2321-7.
11. Bloom BR 1992. Back to a frightening future. *Nature* 358: 538-539.

12. Bodmer T, Zurcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the  $\beta$ -subunit of RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:345-348 ;
13. Brisson-Noel A., Lecossier D., Nassif X. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*, 1989; 2:1069-1071.
14. Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460TB system and Löwenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997a;1:81–84.
15. Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Clinical interest of a new simple system for isolating *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Clin Esp* 1997b;197:148–151.
16. Casper C, Singh SP, Rane S, Daley CL, Schecter GS, Riley LW, *et al.* The transcontinental transmission of TB: a molecular epidemiological assessment. *Am J Public Health* 1996; 86: 551-
17. Caugant, D. A., P. Sandven, J. Eng, J. T. Jeque, and T. Tonjum. 1995. Detection of rifampicin resistance among isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mozambique. *Microb. Drug Resist.* 1:321-326 ;
18. Cave, M. D., K. D. Eisenach, P. F. McDermott, J. H. Bates, and J. T. Crawford. 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell. Probes* 5:73-80.
19. Chevrel-Dellagi, D., A. Abderrahman, R. Haltiti, H. Koubaji, B. Gicquel, and K. Dellagi. 1993. Large-scale DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 32:2446– 2450.
20. Cohn D. *et al.* Drug-resistance in TB: review of the worldwide situation and WHO/IUATLD global surveillance project. // *Clin. Infect. Dis.* 1997, 24, (suppl.1):121-130 ;
21. Cole ST, Telenti A., Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J Suppl.* 1995. Sep;20:701S-713S 3
22. Collins DM, Lisle GW 1984. DNA restriction endonuclease analysis of *M. tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Gen Microbiol* 130: 1019-1021.
23. Collins DM, Stephens DM 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett* 83: 11-16.

24. Collins CH, Yates MD, Grange JM 1982. Subdivision of *M. tuberculosis* in five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *J Hyg Camb* 89: 235-242.
25. Cooksey, R. C., G. P. Morlock, S. Glickman, and J. T. Crawford. 1997. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J. Clin. Microbiol.* 35:1281-1283;
26. Cousins DV, Williams SN, Ross BC, Ellis TM 1993. Use of a repetitive element isolated from *M. tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 37: 1-17.
27. Crawford J, Bates JH. Phage typing of mycobacteria In: Kubica GP, Wayne LG, editors, *The Mycobacteria: a sourcebook: Part A*. New York: Marcel Dekker, 1984 p.123-32.
28. Das S, Chan SL, Allen BW, Mitchison DA, Lowrie DB 1993. Application of DNA fingerprinting with IS986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis in Hong Kong before, during and after short-course chemotherapy. *Tubercle Lung Dis* 74: 47-51.
29. Daley, C. L., P. M. P. M. Small, G. F. Schecter, G. K. Schoolnik, R. A. McAdam, W. R. Jacobs, Jr., and P. C. Hopewell. 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis of restriction fragment length polymorphism. *N. Engl. J. Med.* 323:231–235.
30. Das S, Paramasivan CN, Lowrie DB, Prabhakar R, Narayanan PR 1995. IS6110 RFLP typing of clinical isolates of *M. tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. *Tubercle Lung Dis* 76: 550-554.
31. Dale JW 1995. Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur Respir J* 8 S20: 633s-648s.
32. De Wit D, Steyn S, Shoemaker S, Sogin M 1990. Direct detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 28: 2437-2441.
33. M.S. Díaz-Infantes, M. J. Ruiz-Serrano, L. Martínez-Sánchez, A. Ortega, E. Bouza Evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* Detection System for Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* *J Clin Microbiol.* 2000 May; 38(5): 1988–1989.
34. Dixie E. Snider, Kenneth G. Castro. The Global Threat of Drug-Resistant TB. *The New Eng. J. Med.*, 1998, vol.338, #23, pp.1689-1690

35. Doran TJ, Hodson AL, Davies JK, Radford AJ 1993. Characterization of a highly repeated DNA sequence from *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett* 111: 147-152.
36. Dubos and Middlebrook, 1947, *Am. Rev. Tuberc.*, 56:334.
37. Dutt AK, Meht B, Whitaker BJ, Westmoreland H 1994. Outbreak of tuberculosis in a church. *Chest* 107: 447-452.
38. Dwyer B, Jackson K, Raios K, Sievers A, Wilshire E, Ross B 1993. DNA restriction fragment analysis to define an extended cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. *J Infect Dis* 167: 490-494.
39. Dye C, Williams BG, Espinal MA, Raviglione MC. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science* 2002; 295: 2042-6.
40. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *M. tuberculosis*. *J Infect Dis* 161: 977-981.
41. Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH 1986. Genetic relatedness among strains of the *M. tuberculosis* complex. *Am Rev Respir Dis* 133: 1065-1068.
42. Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH 1988. Repetitive DNA sequences as probes for *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 26: 2240-2245.
43. Fomukong NG, Tang TH, AL-Maamary S, Ibrahim WA, Ramayah S, Yates M, Zainuddin ZF, Dale JW 1994. Insertion sequence typing of *M. tuberculosis*: characterization of a widespread subtype with a single copy of IS6110. *Tubercle Lung Dis* 75: 435-448.
44. Friedman, C. R., M. Y. Stoeckle, B. N. Kreiswirth, W. D. Johnson, Jr., S. M. Manoach, J. Berger, K. Sathianathan, A. Hafner, and L. W. Riley. 1995. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis in an urban setting. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152:355–359.
45. Frothingham R, Hills HG, Wilson KH 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *M. tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 32: 1639-1643.
46. Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, Maurer A-M, Rieder HL, Schopfer K, Bodmer T 1993. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *The Lancet* 342: 841-844.
47. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 843-9.

48. Goble M, Iseman MD, Madsen LA, et al. Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med* 1993; 328:527-532.
49. Godfrey-Faussett P, Stoker NG, Scott JA, Pasvol G, Kelly P, Clancy L 1993. DNA fingerprints of *M. tuberculosis* do not change during the development of rifampicin resistance. *Tubercle Lung Dis* 74: 240-243.
50. Gomez-Marin, J. E., L. Rigouts, L. E. Villegas-Londono, and F. Portaels. 1995. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and tuberculosis epidemiology. *Bull. Pan Am. Health Organ.* 29:226–236.
51. Grange JM, Laszlo A 1990. Serodiagnosis tests for tuberculosis: a need for assessment of their predictive accuracy and acceptability. *Bull WHO* 68: 571-576.
52. Grzybowski S 1991. Tuberculosis in the third world. *Thorax* 46: 689-691.
53. Grzybowski S, Enarson DA 1978. Results in pulmonary tuberculosis patients under various treatment program conditions. *Bull Int Union Against Tub* 53: 70-75.
54. Hermans, P. W. M., F. Messadi, H. Guebrexabher, D. van Soolingen, P. E. W. de Haas, H. Heersma, H. de Neeling, A. Ayoub, F. Portaels, D. Frommel, M. Zribi, and J. D. A. van Embden. 1995. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J. Infect. Dis.* 171:1504–1513.
55. Hermans PW, Van Soolingen D, Dale JW, Schuitma AR, McAdam R, Catty D, Van Embden JD 1990b. Insertion element IS986 from *M. tuberculosis*: a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 28: 2051-2058.
56. Hermans PW, Van Soolingen D, Van Embden JD 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *M. tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*. *J Bacteriol* 174: 4157-4165.
57. Hoffner SE, Svenson SA, Norberg R, Dias F, Ghebremichael S, Kallenius G 1993. Biochemical heterogeneity of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Guinea-Bissau. *J Clin Microbiol* 31: 2215-2217.
58. Honoré N, Cole ST. Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994 ; 38 : 238-24
59. Holmes, C. B., H. Hausler, and P. Nunn. 1998. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2:96-104.
60. Inderlied CB, Salfinger M. *Manual of Clinical Microbiology*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. American Society for Microbiology, 7th ed. Washington, DC; 1999:1601-23. J

- 61. N.K. Jain LABORATORY DIAGNOSIS OF PULMONARY TUBERCULOSIS : CONVENTIONAL AND NEWER APPROACHES, *Ind.J.Tub.*, 1996, 43, 107**
- 62. Jones Jr WD 1988. Phage typing of *M. tuberculosis* cultures from incidents of suspected laboratory cross-contamination. *Tubercle* 69: 43-46.**
- 63. Jones Jr WD, Woodly CL 1983. Phage-typing patterns of *M. tuberculosis* from South-east Asian immigrants. *Am Rev Resp Dis* 127: 348.**
- 64. Kamerbeek J., Schoultz A., Kolk M. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *M.tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. 1997. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 35, 907-914.**
- 65. Kapur, V., Li, L.L., Iordanescu, S., Hamrick, M.R., Wanger, A., Kreiswirth, B.N. and Musser, J.M. (1994). Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene, *rpoB*, encoding the RNA polymerase b subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J. Clin. Microb.* 32:1095-1098.**
- 66. Kox L.F.F., Rhienthong D., Medo Miranda A. A more reliable PCR for detection of *M.tuberculosis* in clinical samples. *J.Clin.microb.*, 1994;32:672-678.**
- 67. Kubica and Dye, 1967, Laboratory Methods for Clinical and Public Health Mycobacteriology, PHS Publication №.1547, U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C.**
- 68. Kubin M. et al. A MDR-TB microepidemic caused by genetically closely related *Mycobacterium Tuerculosis* strains. // *J. Clin. Microbiol.*, 1999, Aug.37, (8):2715-6.**
- 69. Lassence A., Leccossier D. Detection of mycobacterial DNA from patients with tuberculosis pleurisy by means of the PCR:comarison of two protocols. *Thorax*, 1992; 47:265-269**
- 70. Lopez L. et al. Topical antimicrobial therapy in prevention of early childhood caries. // *Pediatr. dent.* 1999, Jan-Feb., 21(1): 9-11.**
- 71. Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Wallace Jr RJ, Bates JH, Crawford JT 1991. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 2030-2033.**
- 72. Manjunath N., Shankar P., Rajan L. Evaluation of a PCR for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle*, 1991;72:21-27.**
- 73. McAdam RA, Hermans PW, Van Soolingen D, Zainuddin ZF, Catty D, Van Embden JD, Dale JW 1990. Characterization of a *M. tuberculosis* sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* 4: 1607-1613.**
- 74. Middlebrook and Cohn, 1958, Am. J. Public Health, 48:844.**

75. Millership SE, Want SV 1992. Whole-cell protein electrophoresis for typing *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 30: 2784-2787.
76. Murray, P. 1992. Laboratory diagnosis of mycobacteriosis. In *Clinical Microbiology Updates*. Hoechst-Roussel Pharmaceuticals, Somerville, NJ
77. Narayanan S, Molecular epidemiology of TB, *Indian J Med Res* 120, October 2004, pp 233-247
78. Nash, K. A., A. Gaytan, and C. B. Inderlied. 1997. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by use of a rapid, simple, and specific RNA/RNA mismatch assay. *J. Infect. Dis.* 176:533-536
79. Nassau E. (1976) Miliary tuberculosis following homograft valve replacement; *Thorax*, Vol 31, 101-106
80. Nardell E, McInnis B, Thomas B, Weidhaas S 1986. Exogenous reinfection with tuberculosis in a shelter for the homeless. *N Engl J Med* 315: 1570-1575.
81. Ohno H, Koga H, Kohno S, Tashiro T, Hara K, Relationship between rifampin MICs for and rpoB mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan *Antimicrob Agents Chemother.* 1996. 40(4):1053-1056
82. Otal I, Martin C, Vincent-Levy-Frebault V, Thierry D, Gicquel B 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 1252-1254.
83. M Palaci, S Y Ueki, D N, 1999 Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens.
84. Pablos-Mendez Ariel et al. Global surveillance for anti-TB drug-resistance 1994-1997. // *The New Eng. J. Med.*, 1998, vol.338, #23, pp.1041-49
85. Park SK, Kim CT, Song SD. Outcome of chemotherapy in 107 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:877-884.
86. Patel R, Kvach JT, Mounts P 1986. Isolation and restriction endonuclease analysis of mycobacterial DNA. *J Gen Microbiol* 132: 541-551.
87. Peerbooms PG, Doornum GJ, Van Deutekom H, Coutinho RA, Van Soolingen D 1995. Laboratory-acquired tuberculosis. *The Lancet* 345: 1311-1312.
88. Pfyffer G E, Welscher H-M, Kissling P, Cieslak C, Casal M J, Gutierrez J, Rüscher-Gerdes S. Comparison of the *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)* with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997;35:364-368.

89. Pineda-Garcia, L., A. Ferrera, and S. E. Hoffner. 1997. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from Patients with Pulmonary Tuberculosis in Honduras JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 1997, p. 2393–2397 Vol. 35, No. 9
90. Pineda-Garcia, L., A. Ferrera, C. Alvarado-Galvez, and S. E. Hoffner. 1997. Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and atypical mycobacteria isolated from patients with suspected pulmonary tuberculosis in Honduras. Chest 111:148–153. Arch. Microbiol. 163:79–86.
91. Plikaytis BD, Plikaytis BB, Shinnick TM 1992. Computer-assisted pattern recognition model for the identification of slowly growing mycobacteria including *M. tuberculosis*. J Gen Microbiol 138: 2265-2273.
92. Poulet S, Cole ST 1994. Characterization of the polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS) present in *M. tuberculosis*. Arch Microbiol 163: 87-95.
93. Rigouts L, Portaels F. DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* do not change during the development of resistance to various antituberculosis drugs. Tubercle Lung Dis 1994; 75: 160.
94. Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *M. tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J Clin Microbiol 30: 942-946.
95. Ross BC, Raios K, Jackson K, Sievers A, Dwyer B 1991. Differentiation of *M. tuberculosis* strains by use of a nonradioactive Southern blot hybridization method. J Infect Dis 163: 904-907.
96. S. RUSCH-GERDES, C.DOMEHL, G. NARDI, M.R. GISMONDO, H. WELSCHER, G.E. PFYFFER.  
Multicenter Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to First-Line Drugs, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 1999, p. 45–48
97. Sahadevan R, Narayanan S, Paramasivan CN, Prabhakar R, Narayanan PR 1995. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *M. tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. J Clin Microbiol 33: 3037-3039.
98. Sbarbaro JA 1995. Tuberculosis in the 1990s. Epidemiology and therapeutic challenge. Chest 108: 58S-62S.



99. Schmid J, Voss E, Soll DR 1990. Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3. *J Clin Microbiol* 28: 1236-1243.
100. Shankar P., Manjunath N., Mohan K. Rapid diagnosis of tuberculosis meningites by PCR. *Lancet*, 1991;387:5-7.
101. Sherman DR, Mdluli K, Hickey MJ, Arain TM, Morris SL, Barry CE 3rd, Stover CK. Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazidresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1996. 14;272(5268)-p.1641-1643.
102. Small PM 1995. Editorial: towards an understanding of the global transmission of *M. tuberculosis*. *J Infect Dis* 171: 1593-1594.
103. Small P., van Embden J.D.A. 1994. Molecular epidemiology of TB, p. 569 – 581. In B. R. Bloom
104. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 330: 1703-1709.
105. Small PM, McClenny NB, Singh SP, Schoolnik GK, Tomkins LS, Mickelsen PA 1993a. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* to confirm cross-contamination in the mycobacterial laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive results. *J Clin Microbiol* 31: 1677-1682.
106. Snider Jr DE, Jones WD, Good RC 1984. The usefulness of phage typing *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Am Rev Respir Dis* 130: 1095-1099.
107. Sola, C., L. Horgen, K. S. Goh, and N. Rastogi. 1997. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* on a Caribbean island with IS6110 and DRr probes. *J. Clin. Microbiol.* 35:843–846.
108. Philip N Suffys, Marcelo E Ivens de Araujo, Wim M Degrave The Changing Face of the Epidemiology of Tuberculosis due to Molecular Strain Typing - A Review. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* v.92 n.3 Rio de Janeiro Maio/Jun. 1997, Vol. 92(3): 297-316
109. Suzuki, Y., Katsukawa, C., Tamaru, A., Abe, C., Makino, M., Mizuguchi, Y., Taniguchi, H. (1998). Detection of Kanamycin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by Identifying Mutations in the 16S rRNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1220-1225
110. Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, et al. Cloning and nucleotide-sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB*

genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 773-780

111. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, and Bodmer T., Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993. 37 :2054-2058.
112. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J.,Matter L., Shopfer K.,Bodmer T., Detection of Rifampin Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae*. *Lancet.*1993.341:647-650.
113. Telzak EE, Sepkowitz K, Alpert P, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in patients without HIV infection. *N Engl J Med* 1995; 333:907-911.
114. Theisen A, Reichel C, Rusch-Gerdes S, Haas WH, Rockstroh JK, Spengler U, Sauerbruch T 1995. Mixed-strain infection with a drug-sensitive and multidrug-resistant strain of *M. tuberculosis*. *The Lancet* 345: 1512-1513.
115. Thierry D, Brisson-Noel A, VincenT-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon J-L, Gicquel B 1990a. Characterization of a *M. tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 28: 2668-2673.
116. Thierry D, Cave MD, Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH, Gicquel B, Guesdon JL 1990b. IS6110, an IS-like element of *M. tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res* 18: 188.
117. van Embden, J. D. A., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Dale, K. D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and P. M. Small. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31:406–409
118. Van Soolingen D, De Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, Van Embden JD 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 31: 1987-1995.
119. Van Soolingen D, Hermans PW, De Haas PE, Soll DR, Van Embden JD 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacteriu tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 29: 2578-2586.
120. Van Soolingen D, Hermans PW, De Haas PE, Van Embden JD 1992. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphism in *M. tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 30: 1772-1777.

121. Varnerot A, Clement F, Gheorghiu M, Levy-Frebault VV 1992. Pulsed field gel electrophoresis of representatives of *M. tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains. *FEMS Microbiol Letters* 98: 155-160.
122. Victor T. et al. Detection of mutations in drug resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* by a dot-blot hybridization strategy. *Tuber Lung Dis.* 1999. Vol. 79. P.343-348.
123. Walters, S. B., B. A. Hanna, S. E. Kodosi, D. T. Stitt, P. M. Tierno, and L. J. Tick. 1994. Rapid detection of multi drug resistant tuberculosis (MDR-TB) directly from patient specimens with the Mycobacterial Growth Indicator Tube, abstr. C-113, p. 510. *In* Program and abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology 1994. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 764 NOTES J. CLIN. MICROBIOL.
124. Wiid IJ, Werely C, Beyers N, Donald P, Van Helden PD 1994. Oligonucleotide (GTG)<sub>5</sub> as a marker for *M. tuberculosis* strain identification. *J Clin Microbiol* 32: 1318-1321.
125. Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, Crawford JT, Portaels F, Salfinger M, Nolan CM, Abe C, Sticht-Groh V, Gillis TP. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:2380-238
126. WHO-Global report-2004, Geneva, Switzerland.
127. Yang ZH, De Haas PE, Wachmann CH, Van Soolingen D, Van Embden JD, Andersen AB 1995a. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol* 33: 2077-2081.
128. Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, Mwasekaga M, Fuursted K, Askgaard DS, Bennedsen J, DE Haas PE, Van Soolingen D, Van Embden JD, Andersen AB 1995b. DNA fingerprinting and phenotyping of *M. tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. *J Clin Microbiol* 33: 1064-1069.
129. K Y Yuen, K S Chan, W C Yam, K H Yim, W F Ng, and M H Ng 1996. Single-tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol.* 1996 April; 49(4): 290-294.
130. Zainuddin ZF, Dale JW 1989. Polymorphic repetitive DNA sequences in *M. tuberculosis* detected with a gene probe from a *Mycobacterium fortuitum* plasmid. *J Gen Microbiol* 135: 2347-2355.

131. Zhang Y, Mazurek GH, Cave DM, Eisenach KD, Pang Y, Murphy DT, Wallace Jr RJ 1992. DNA polymorphisms in strains of *M. tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J Clin Microbiol* 30: 1551-1556.
132. Вишневская Е.Б. Особенности выделения ДНК для ПЦР при туберкулезе внелегочных локализаций. // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 5.-с.23-26.
133. Вишневский Б.И., Мирлина Е.Д. ПЦР-диагностика микобактерий туберкулеза методом полимеразной цепной реакции при туберкулезе различных локализаций. // В сб.: Проблемы ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза. Материалы научно-практической конференции. Обнинск, 1996.-с. 14.
134. Дзадзиева М.Ф., Жербутович Н.В. Диагностическая ценность ПЦР при туберкулезе. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1997. - № 5.-с.10-13.
135. ВОЗ, 1998. Лабораторная служба в программах борьбы с туберкулезом, Часть 3, Культуральное исследование,
136. Калюк А.Н. Комплексные бактериологические исследования в диагностике туберкулеза. // Туберкулез и экология. - 1995. - № 3.-с.28-31.
137. Козулицына Т.И. Микробиологические исследования./ В руководстве для врачей: Туберкулез органов дыхания. М.,1981.- с.136-149.
138. Мирлина Е.Д., Ланцов В.А. Диагностические возможности метода ПЦР при генитальном туберкулезе у женщин.
139. Нестеренко Л.Н. Использование молекулярно-биологических методов в диагностике и типировании штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. / В сб.: Молекулярные основы патогенеза и диагностики туберкулеза и другой легочной патологии. Материалы научно-практической конференции. М., 1995.- с.50.
140. Черноусова Л.Н., Ларионова Е.Е., Севастьянова Э.В., Голышевская В.И. Роль ПЦР-анализа в комплексных бактериологических анализах во фтизиатрии.