

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

На правах рукопису

ЛЕВИЦЬКА НЕЛЛІ АНАТОЛІЇВНА

УДК 615.015.8:579.873.21(477.73)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ
РЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ДО ЛІКАРСЬКИХ
ЗАСОБІВ

14.03.05 — фармакологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Науковий керівник
Бажора Юрій Іванович
з. д. н. т. України,
доктор медичних наук, професор

Одеса 2006

ЗМІСТ

	ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМОЛІВ І ТЕРМІНІВ	4
	ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1	ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
	1.1. Короткі відомості про систематику та біологію патогенних мікобактерій	13
	1.2. Сучасні уявлення про фармакотерапію туберкульозу	20
	1.3. Лікарська стійкість мікобактерій і причини її виникнення. Первинна і вторинна стійкість	27
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	42
	2.1. Характеристика ретроспективних і проспективних методів дослідження	42
	2.2. Бактеріоскопічні та бактеріологічні методи, використані для вивчення резистентності мікобактерії	49
	2.3. Молекулярно-генетичні методи, використані для вивчення медикаментозної стійкості мікобактерії туберкульозу	57
РОЗДІЛ 3	ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ В МИКОЛАЇВСЬКІЙ ОБЛАСТІ В 2000-2005 рр	67
	3.1. Дані ретроспективного дослідження.	67
	3.2. Первинна і набута стійкість мікобактерій до препаратів першого ряду	78
	3.3. Порівняльна характеристика ефективності, чутливості та специфічності бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів досліджень	86

3.4.	Характеристика контрольної групи хворих	91
РОЗДІЛ 4	МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА МОЖЛИВІ ШЛЯХІ ЇЇ ПОДОЛАННЯ	94
4.1.	Поширеність мутацій, асоційованих з лікарською стійкістю	94
4.2.	Вивчення виникнення вторинної стійкості в процесі лікування туберкульозу і визначення препаратів першого-другого рядів та їх комбінацій, придатних для терапії лікарсько-стійкого туберкульозу	97
4.3.	Перехресна стійкість МБТ до препаратів першого ряду	105
4.4.	Показники стійкості мікобактерій туберкульозу до окремих препаратів другого-третього рядів	106
4.5.	Обґрунтування ефективності використання фторхінолонів для терапії туберкульозу	109
РОЗДІЛ 5	АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	116
	ВИСНОВКИ	126
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	128
	ДОДАТОК А	150
	ДОДАТОК Б	157
	ДОДАТОК В	166
	ДОДАТОК Г	167
	ДОДАТОК Д	169

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І ТЕРМІНІВ

- ВООЗ — Всесвітня організація охорони здоров'я
- МЛС — мультирезистентний туберкульоз
- МБТ — мікобактерії туберкульозу
- ІФП — Інститут фтизіатрії та пульмонології ім. Ф. Г. Яновського
- ПТП — протитуберкульозні препарати
- ЛЧ — лікарська чутливість к ПТП
- ЛС — лікарська стійкість до ПТП
- ХРТ — хіміорезистентний туберкульоз
- DRTB — drug resistant tuberculosis
- MPTB — мультирезистентний туберкульоз
- MDRTB — multidrug resistant tuberculosis
- H — ізоніазид
- МПК — мінімальна пригнічуюча концентрація
- Et — етіонамід
- Z — піразинамід
- S — стрептоміцин
- R — рифампіцин
- E — етамбутол
- МОПТД — Миколаївський обласний протитуберкульозний диспансер
- DOTS — Directly Observed Therapy, Short Course

ВСТУП

Туберкульоз сьогодні є серйозною загрозою здоров'ю людства [1]. Половина населення земної кулі інфікована *M. tuberculosis*. Туберкульоз не ліквідовано в жодній країні світу [2]. В багатьох країнах, особливо які розвиваються, захворюваність вийшла з-під контролю, в зв'язку з чим ВООЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я) в 1993 р. проголосила ТБ (туберкульоз) глобальною небезпекою, оскільки щороку понад 9 млн людей у світі захворюють на ТБ, а понад 2 млн помирає від цього захворювання [1; 2]. За останні 10 років минулого століття три важливих фактори вплинули на підвищення ризику захворювання на туберкульоз, а саме: збільшення захворюваності на туберкульоз у світі, зростання кількості ВІЛ-інфікованих людей і поява МЛУ (мультирезистентних) і полірезистентних штамів МБТ (мікобактерій туберкульозу) [2]. В 1997 р. ВООЗ виступила із застереженням: «Якщо розпочнеться епідемія туберкульозу з МЛУ, нам, можливо, ніколи не вдасться зупинити її.» [3].

Основними орієнтирами у боротьбі з туберкульозом у світі, за рішенням ВООЗ, є виявлення не менше 70 % хворих, в мокротинні яких мікобактерії туберкульозу виділяються за даними бактеріоскопії мазків, а також вдале лікування (ліквідація бактеріовиділення) 85 % із них. Досягнення цих показників планувалося вже в 2005 р. Однак однієї базисної стратегії DOTS виявилось недостатньо. Стандартний режим хіміотерапії в основному наблизив результати лікування хворих до орієнтирів, намічених ВООЗ, але виявлення нових випадків захворювання на ТБ серед деяких груп населення лишилося незадовільним. Стала очевидною необхідність перегляду стратегії в бік розширення та інтенсифікації заходів щодо контролю за туберкульозом, зокрема, точне і швидке виявлення лікарської стійкості збудника туберкульозу [4].

В умовах розвинутої епідемії ТБ в Україні, зареєстрованої ВООЗ в 1995 р., все ще спостерігається подальше погіршення епідеміологічної ситуації [5–

7]. Захворюваність населення України на всі форми туберкульозу зросла за останні 10 років більш ніж удвічі, становивши в 2005 р. 84,1 на 100 тис. населення. В Миколаївській області захворюваність на туберкульоз збільшилася з 26,7 на 100 тис. в 1990 р. до 110,0 на 100 тис. в 2005 р. [2]. В зв'язку з цим по закінченні дії Указу Президента України від 20 серпня 2001 р. № 643 «Про національну програму боротьби із захворюванням на туберкульоз на 2002–2005 рр.» ІФП (Інститутом фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського) АМН України розроблена «Національна програма боротьби із захворюванням на туберкульоз на 2007–2010 рр.» [2].

Останніми роками спостерігається синтез результатів фундаментальних досліджень як у самій фтизіатрії, так і в деяких суміжних областях науки, і, перш за все, у фармакології, молекулярній біології, генетиці, на стику яких виникли фармакогенетика і фармакогеноміка.

Аналіз даних літератури про виникнення і розповсюдження лікарської стійкості МБТ у різних країнах світу показує головну сучасну проблему фтизіатрії: збільшення частоти зустрічальності стійких штамів МБТ — інтернаціональна проблема [3]. Сьогодні публікуються вибірккові дані про рівні первинної та набутої ЛС (лікарської стійкості) *Mycobacterium tuberculosis* до ПТП, які є надзвичайно важливими для розуміння причин епідеміологічної ситуації та прогнозування її розвитку [3; 9–12]. За останні 30 років не було створено жодного нового протитуберкульозного препарату [2]. Сьогодні «золотим стандартом» в лабораторній діагностиці туберкульозу є бактеріологічні методи, рекомендовані, в тому числі, Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 [20].

Сучасний туберкульоз розширив контингент інфікованих людей, в епідеміологічній ситуації, що змінилася, необхідно застосовувати анкетування пацієнтів для створення бази даних груп ризику і отримання вихідних даних перед вибором терапії [8,25].

Актуальність теми

Особливістю сучасного туберкульозу є значна питома вага штамів, резистентних до одного або кількох протитуберкульозних препаратів (ПТП), що значною мірою обмежує можливості хіміотерапії і потребує найшвидшого впровадження сучасних методів лабораторної діагностики лікарської чутливості (ЛЧ) збудника туберкульозу [6; 7]. Цілісна картина частоти і географії хіміорезистентного туберкульозу в Україні відсутня [7; 8]. У зв'язку з розвитком високої резистентності до всіх протитуберкульозних препаратів для лікування ТБ стали застосовувати препарати з антимікобактеріальними властивостями, наприклад фторхінолони. В умовах неможливості проведення монотерапії фармакологи розробляють комбінації ПТП для підвищення ефективності лікування. Вивчення розвитку резистентності до фторхінолонів і використовуваних комбінацій антимікобактеріальних препаратів є важливим для стратегії лікування хворих на ТБ.

Для виконання діагностики ЛЧ мікобактерій туберкульозу бактеріологічними методами потрібно не менше 8–10 тиж, що може призводити до невиправданого призначення препаратів, до яких штам мікобактерій, виділений від пацієнта, є резистентним. Наслідком цього є неефективність терапії, а також прогресивна селекція і розповсюдження лікарсько-стійких штамів МБТ.

Сучасні молекулярно-генетичні методи, що базуються на ідентифікації мутацій в ряді генів, відповідальних за розвиток ЛС, значно скорочують терміни визначення резистентності *M. tuberculosis* до ПТП і характеризуються високою чутливістю та специфічністю. Впровадження їх в Україні нині стримується економічними причинами і відсутністю у деяких випадках нормативних документів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана в межах теми науково-дослідної роботи Одеського державного медичного університету «Імуногенетичні, епідеміологічні, фармакогенетичні й клініко-мікробіологічні аспекти взаємовідношень в системі "Паразит–хазяїн" при туберкульозній інфекції в умовах захворюваності на туберкульоз» (№ державної реєстрації 0104U010501).

Мета і завдання дослідження: підвищення ефективності фармакотерапії туберкульозу (на прикладі Миколаївської області) на підставі вивчення молекулярно-генетичних особливостей розвитку резистентності мікобактерій до лікарських препаратів.

Для досягнення мети необхідно було вирішати наступні задачі

1. Провести ретроспективні дослідження і встановити поширеність первинної і набутої резистентності мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів першого і окремих препаратів другого ряду в Миколаївській області.

2. Провести порівняльний аналіз і дати об'єктивну оцінку молекулярно-генетичним і бактеріологічним методам дослідження діагностики первинної і набутої стійкості *M. tuberculosis* до широко застосовуваних у Миколаївській області протитуберкульозних препаратів.

3. Вивчити молекулярно-генетичні основи розвитку резистентності мікобактерій туберкульозу в процесі лікування різними комбінаціями антимікобактеріальних препаратів.

4. Порівняти поширеність мікобактерій туберкульозу, резистентних до препаратів першого і окремих препаратів другого ряду (фторхінолонів), і виявити можливість розвитку перехресної стійкості.

5. Розробити практичні рекомендації щодо діагностики резистентності мікобактерій туберкульозу і використання різних комбінацій

протитуберкульозних препаратів у лікуванні туберкульозу, викликаного лікарсько-стійкими штамми.

Об'єкт дослідження – молекулярно-генетичні механізми розповсюдження резистентних до протитуберкульозних препаратів штамів збудника туберкульозу.

Предмет дослідження – молекулярно-генетичні особливості розповсюджених в Миколаївській області штамів *M. tuberculosis* та їх роль в розвитку первинної і вторинної стійкості до сучасних протитуберкульозних препаратів.

Методи дослідження – бактеріологічні, молекулярно-генетичні, статистичні, анкетування.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше вивчено рівні поширеності резистентних штамів мікобактерій туберкульозу в Миколаївській області України, динаміка їхнього росту в період 2000–2005 рр. і роль резистентних штамів у епідеміологічній ситуації з туберкульозу. Вперше вивчено рівні первинної і набутої стійкості *M. tuberculosis* до препаратів першого, окремих препаратів другого ряду і фторхінолонів. Вперше вивчено молекулярно-епідеміологічні особливості первинної і вторинної резистентності МБТ в досліджуваному регіоні. Вперше проведена порівняльна характеристика бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів діагностики хіміорезистентного туберкульозу в конкретній епідеміологічній ситуації. Представлена картина частоти поширення резистентних штамів *M. tuberculosis* до окремих ПТП в Миколаївській області дозволяє орієнтуватися в чутливості МБТ до призначуваних препаратів до отримання даних бактеріологічних досліджень. Вперше розроблена і апробована анкета для отримання вихідних даних перед вибором хіміотерапії, визначення категорії хворих, аналізу епідеміологічної ситуації і створення банку даних груп ризику. Вперше проведено аналіз ефективності терапії туберкульозу, викликаного лікарсько-стійкими штамми

МБТ й визначено препарати та їхні комбінації, придатні для терапії туберкульозу при виникненні вторинної стійкості в Миколаївській області.

Практичне значення одержаних результатів

На основі застосування сучасних високоспецифічних і чутливих методів діагностики резистентних форм туберкульозу рекомендовано призначення адекватної хіміотерапії в режимі реального часу. Аналіз результатів лікування дозволив обґрунтувати та розробити рекомендації щодо застосування найефективніших комбінацій ПТП. Виявлена частота мутацій в генах популяції *M. tuberculosis* в Миколаївській області України надала можливість розробити рекомендації щодо застосування окремих препаратів I–II ряду. Визначення рівнів поширеності резистентних штамів мікобактерій дозволяє з'ясувати їхній внесок в епідеміологічну ситуацію з туберкульозу в Миколаївській області. Використання розробленої та апробованої в ході досліджень анкети для отримання вихідних даних при призначенні ПТП дозволяє аналізувати епідеміологічну ситуацію і створювати бази даних груп ризику. На основі вивчених рівнів резистентності штамів МБТ і динаміки її зростання в період 2000–2005 рр. можна дати прогноз розвитку епідеміологічної ситуації з туберкульозу і завчасно вирішувати питання забезпечення адекватної хіміотерапії.

Особистий внесок здобувача. Автор особисто відпрацювала новий підхід до вивчення розвитку резистентності мікобактерій туберкульозу, використання сучасних методів діагностики лікарської стійкості. Особисто розробила рекомендації щодо використання комбінацій протитуберкульозних препаратів для підвищення ефективності лікування хворих на туберкульоз, брала участь в розробці анкети пацієнтів МОПТД, особисто брала участь в проведенні бактеріоскопічних, бактеріологічних, молекулярно-генетических досліджень та анкетуванні пацієнтів МОПТД. Дослідження проводилися в поліклінічному відділенні МОПТД, Референс-лабораторії МОПТД, лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ОДМУ і Національній Референс-лабораторії з діагностики туберкульозу

Великобританії (Лондон). Робота виконана в межах комплексної програми Одеського державного медичного університету «Імуногенетичні, епідеміологічні, фармакогенетичні й клініко-мікробіологічні аспекти взаємовідношень в системі "паразит–хазяїн" при туберкульозній інфекції в умовах захворюваності на туберкульоз», виконавцем якої був здобувач. Молекулярно-генетичні дослідження проводилися у відповідності з Договором між Національною Референс-лабораторією з діагностики туберкульозу Великобританії (Лондон) і Одеським державним медичним університетом. Автором самостійно оброблені результати роботи, підготовлений текст дисертаційної роботи, зроблено узагальнення та висновки, підготовлені публікації. Співучасть співробітників ОДМУ відмічено в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації були представлені у вигляді доповідей і дістали позитивні оцінки спеціалістів на VII з'їзді Всеукраїнського лікарського товариства (м. Тернопіль, 2003), на 14-му Європейському Конгресі з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб (Прага, Чеська Республіка, 2004), на Міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток наукових досліджень 2005» (Полтава, 2005), на Міжнародній науково-практичній конференції «Наукові дослідження — теорія та експеримент' 2006» (Полтава, 2006), конференції “Біофізичні стандарти та інформаційні технології в медицині” (Одеса, 2006)

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 наукових робіт, із них 4 — наукові статті в передових спеціальних виданнях ВАК України, 5 — тези доповідей на наукових конференціях, з'їздах, конгресі.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Протягом тисячолітньої історії співіснування з мікобактерією туберкульозу людство безуспішно шукає шляхи боротьби з цим унікальним мікроорганізмом. Патоморфологічні зміни туберкульозного характеру було знайдено при археологічних розкопках в кісткових залишках людей кам'яного віку і мумій Єгипту [9,26; 27]. Туберкульоз розповсюджений в усіх кліматичних поясах і вражає людей усіх рас [2]. Людство оплатило свій досвід жертвами, що не піддаються обчисленню, але достатньо добре знайоме з туберкульозом. Як нозологічна одиниця він був виділений на підставі клінічних спостережень ще Гіппократом, Авіценна продовжив подальше вивчення цього захворювання [10,21]. В ХХ ст. захворюваність на туберкульоз досягла загрозливих масштабів, половина населення земної кулі інфікована туберкульозом, і з 1993 г. Всесвітня організація охорони здоров'я проголосила туберкульоз глобальною небезпекою [1; 3]. Дана ситуація послужила причиною інтенсивного дослідження в багатьох наукових лабораторіях світу відсутності очікуваного ефекту вакцинації та антибіотикотерапії [2;11,28]. Цьому сприяли досягнення в галузі молекулярної генетики, імунології та імунофармакогенетики. Новітні методи молекулярної біології дозволили ретельно вивчити геном мікобактерій, у тому числі й збудників туберкульозу, а також дослідити білкові та інші компоненти бактеріальних клітин, що визначають вірулентність, стійкість до антибіотиків, латентність та інші біологічні властивості [12-26,29–32].

Останніми роками розроблено чутливі, доступні для лабораторій практичної охорони здоров'я методи діагностики, виявлення чутливості МБТ до різних антибіотиків, що дозволяє створювати досить ефективні схеми лікування туберкульозної інфекції [33–35].

1.1. Короткі відомості про систематику та біологію патогенних мікобактерій

Mycobacterium tuberculosis належить до роду *Mycobacterium* сімейства *Actinomycetos* порядку *Actinomycetales* [36,42].

Завдяки численним біохімічним і генетичним дослідженням, мікобактерії є однією з найкраще вивчених груп мікроорганізмів. Рід *Mycobacterium* надзвичайно різноманітний і містить понад 85 різних видів.

Практично кожного року описуються нові види мікобактерій і кількість їх, скоріше за все, зростатиме [37,43; 44].

Загальноприйнята класифікація мікобактерій, що задовольняє як клініцистів, так і мікробіологів, до сьогодні остаточно не розроблена. Клініко-патогенетична класифікація, запропонована К. Smith в 1997 р., передбачає поділ мікобактерій на три основні групи:

- непатогенні сапрофіти (*M. aurum*, *M. gadium* та ін.);
- потенційно-патогенні (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis* та ін.);
- облигатно-патогенні (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. leprae*).

На найбільшу увагу, з точки зору мікробіологів, заслуговує класифікація, запропонована в 1959 р. Runyon, згідно з якою мікобактерії підрозділяються за групами залежно від здатності до утворення каротиноїдних пігментів, швидкості росту й патогенності. Відповідно до неї виділяють такі групи мікобактерій:

1. Фотохромогенні, що повільно ростуть (утворюючи каротиноїдні пігменти на світлі — *M. kansasii*, *M. marinum* та ін.).
2. Скотохромогенні, що повільно ростуть (формує каротиноїдні пігменти в темряві) — *M. gordonae*, *M. szulgai* та ін.

3. Нескотохромогенні, що повільно ростуть (не утворюючи пігменту) — *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis* та більшість інших найбільш розповсюджених патогенних видів.

4. Які швидко ростуть — *M. chelonii*, *M. fortuitum*, *M. paratuberculosis* та ін.

5. Мікобактерії, що не ростуть на штучних живильних середовищах, — *M. leprae*, *M. lepraemurium*.

Грунтуючись на секвенуванні РНК (16S), РНК-полімерази (RpoB) або *hsp 65* генів, види можуть бути швидко ідентифіковані й побудоване філогенетичне дерево, що ілюструє різноманіття світу мікобактерій [21].

Ця генотипна класифікація впливає з філогенетичної класифікації культивованих штамів швидко зростаючих і повільно зростаючих видів *in vitro*.

Значна частина видів мікобактерій є вільноіснуючими в навколишньому середовищі сапрофітами. Мікобактерії адаптувалися до різних умов середовища і ростуть в землі та воді різних регіонів світу [38,45]. Тільки деякі види мікобактерій, такі як *M. tuberculosis* і *M. bovis*, вперше ідентифіковані у хворих людей і великої рогатої худоби відповідно, але обидва види здатні інфікувати інші види тварин і ніколи не виділялися з навколишнього середовища [39,42].

Всі люди схильні до контакту з мікобактеріями, що знаходяться у воді й повітрі, наприклад з антропонозними бактеріями *M. tuberculosis* і *M. leprae*, які знаходяться у повітрі. Бактерії часто контактують зі шкірою й слизовими оболонками (переважно дихальної і травної систем). До того ж, більшість дітей світу (85 %) прищеплена живою вакциною БЦЖ [40,46].

Патогенні для людини мікобактерії

M. tuberculosis комплекс складається з *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. microti*, які є близькоспорідненими організмами. Між

окремими видами мікобактерій спостерігаються перехідні форми. Вони більш як на 99 % ідентичні на рівні послідовності нуклеотидів для деяких ділянок, однак значно відрізняються за морфологічними та біохімічними ознаками, діапазоном організмів-носіїв, перебігом захворювання, яке вони викликають у експериментальних тварин [41,42].

Важливим тестом для ідентифікації мікобактерій людського і бичачого видів є ніациновий тест (проба Конті), оснований на властивості людських мікобактерій продукувати значно менше ніацину, ніж мікобактерії бичачого виду [20].

На думку Я. А. Благодарного (1972), достовірні дані про приналежність мікобактерій до того чи іншого виду можна отримати лише за допомогою комплексного дослідження. Мікобактерії людського і бичачого видів можуть спричинити захворювання на туберкульоз не лише у людини, але й у великої рогатої худоби, овець, кіз, свиней, верблюдів, рідше у коней, собак і кішок.

Серед відомих нині антропонозів найрозповсюдженішим є туберкульоз. Назва хвороби походить від латинського слова *tuberculum* — горбик. Захворюють на нього практично всі хребетні тварини. Відомо 54 види ссавців, у яких діагностувався туберкульоз [42].

Основною видовою ознакою мікобактерій туберкульозу є патогенність, тобто здатність жити і розмножуватися у тканинах живого організму й спричинювати специфічні реакції-відповіді, що призводять до певної нозологічної форми патології — туберкульозу. Найсприйнятливішими до зараження вважаються морські свинки, яких використовують як модель для біологічної проби при діагностиці туберкульозу [20].

Високовірулентні мікобактерії туберкульозу в чутливих до них тварин швидко розмножуються в організмі, не руйнуються фагоцитами, викликають прогресуюче утворення туберкульозних осередків, що призводить в подальшому до неминучої загибелі тварин. Слабовірулентні мікобактерії також можуть розмножуватися в організмі, але вони захоплюються фагоцитами і руйнуються ними. Утворені специфічні осередки піддаються

зворотному розвитку, тварина не гине. Вірулентність не є постійною властивістю [48; 49]. Вона може змінюватись у окремих штамів [50; 51]. Для оцінки вірулентності були запропоновані біологічний метод (класичний) і біохімічні тести. Останні ґрунтуються на встановленому факті взаємозв'язку корд-фактора мікобактерій та їх вірулентності, тобто цитохімічних реакціях [21].

Експериментально інфекційну природу туберкульозу довів англійський лікар Віллемен (1865). Прищеплюючи кроликам матеріал, взятий з горбиків, осередків і каверни, Віллемен заразив тварин і викликав у них туберкульоз. Збудник туберкульозу був відкритий в 1882 р. Паулем Баумгартемом і Робертом Кохом (незалежно один від одного). Однак першовідкривачем вважається Р. Кох (1843–1910), оскільки Баумгартен лише «бачив» збудника, а Кох виділив збудника в чистій культурі з ураженої туберкульозом тканини людини і тварин. 24 березня 1882 р. в доповіді Фізіологічному товариству в Берліні Кох надав переконливі дані про відкриття ним збудника туберкульозу. Застосований ним метод забарвлення метиленовим синім забезпечував чітку диференціацію збудника туберкульозу від інших мікроорганізмів. Р. Кох незаперечно довів також, що виділені ним мікроорганізми знаходяться в мокротинні, інших виділеннях й органах людей і тварин, хворих на різні форми туберкульозу, й не виявляються при інших захворюваннях, можуть бути отримані у вигляді чистої культури на живильних середовищах та викликати при зараженні експериментальних тварин специфічний процес [27].

Mycobacterium tuberculosis — дуже стійка у зовнішньому середовищі кислото-лужно-спиртостійка тонка паличка. У зовнішньому середовищі паличка туберкульозу зберігається роками. Так, у ґрунті паличка Коха життєздатна і вірулентна до 2 років, у воді — до 5 міс, у приміщеннях — до 1,5 міс, у фекаліях на пасовиськах — до 1 року, в маслі й сирах при збереженні їх у холодильнику — до 10 міс. При температурі -20°C паличка Коха зберігає життєздатність до 7 років. Вона витримує нагрівання до $+80^{\circ}\text{C}$

і охолодження до $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ [42]. Температуру звичайно вважають основним лімітувальним фактором середовища для росту патогенних мікроорганізмів. Температурний оптимум організмованої фази популяції мікобактерій відповідає умовам організму основного хазяїна [45]. Незважаючи на стійкість до багатьох фізичних факторів, ультрафіолетові промені вбивають туберкульозну паличку протягом 2–3 хв.

Mycobacterium tuberculosis має довжину 1,4–5 мкм і товщину 0,2–0,5 мкм, може бути прямою, трохи зігнутою, стовщеною на одному або двох кінцях. Паличка Коха вкрай мінлива і під впливом лікування може галузитися, набувати кокоподібної, зернистої форми (зерна Муха), трансформуватися в лікарсько-стійку L-форму, що тривало персистує в організмі [20].

В бактеріальній клітині диференціюються клітинна мембрана, цитоплазма з окремими органоидами і ядерна субстанція.

До складу клітини входять вода (85,9 %), білки, вуглеводи, ліпіди і мінеральні солі. Ліпіди становлять від 10 до 40 % сухої речовини. Вони розчинні в спирту, ефірі та хлороформі. Білковий компонент — різні туберкулопротеїни — становлять 56 % сухої речовини клітини. До складу туберкулопротеїнів входять майже всі відомі амінокислоти. В мікобактеріях туберкульозу міститься до 15,3 % вуглеводів здебільшого у вигляді полісахаридів, вільних і в сполуках з фосфатидами та білками. Мінеральні речовини мікобактерій туберкульозу становлять близько 6 % маси клітини. Це кальцій, фосфор, магній, калій, залізо, цинк і марганець переважно у вигляді сполук [21].

Для нормального розвитку мікобактерій туберкульозу потрібні спеціальні живильні середовища, що містять вуглець, азот, водень, кисень, фосфор, магній, калій, а також залізо, хлор, натрій, сірку. Крім того, для повноцінного розвитку мікобактерій туберкульозу необхідна наявність факторів росту. Вони не входять до складу ферментних систем клітини, але використовуються для їх побудови. Відомі фактори росту, споріднені за

своєю природою з вітамінами групи В, деякі амінокислоти, органічні кислоти і ліпіди. Всі ці фактори містяться в повноцінних середовищах: яєчних, кров'яних, картопляних.

Первинні культури мікобактерій, виділених із патологічного матеріалу, особливо чутливі до відсутності факторів росту. Можливо, при вегетуванні в тканинах організму вони втрачають здатність самостійно синтезувати такі речовини.

При культивуванні мікобактерій на живильних середовищах велике значення має концентрація в середовищі водневих іонів (рН). Найкращий ріст культур відмічається при рН 6,8–7,02 [20].

Як відомо, внутрішньоклітинне дихання мікобактерій здійснюється оксидоредуктазами. До цієї групи окисно-відновних ферментів належать дегідрогенази, оксидази, а також каталаза і пероксидаза, оскільки з ними тісно пов'язані такі біологічні властивості мікобактерій туберкульозу, як вірулентність і лікарська стійкість до препаратів групи гідразидів ізонікотинової кислоти. У всіх аеробних мікроорганізмів завершальним продуктом окисно-відновних процесів є перекис водню [21].

Для нормального розвитку мікобактерії туберкульозу потребують кисню, тому їх відносять до аеробів. Більшість дослідників вважали збудника туберкульозу абсолютним аеробом. Роботи Л. М. Моделя (1952) та ін. показали можливість росту мікобактерій туберкульозу при браку або відсутності кисню. Ця обставина дозволяє розглядати мікобактерії туберкульозу як факультативні аероби [20].

Розмноження мікобактерій відбувається повільно. Цикл простого поділу материнської клітини на дві дочірні потребує від 20 до 24 год, мікроскопічний видимий ріст мікроколоній на рідких середовищах можна виявити на 5–7-й день, видимий ріст колоній на поверхні твердого середовища — на 12–20-й день.

Для *M. tuberculosis* людина — єдиний природний організм-хазяїн, хоча нею можна заражати деяких тварин, спричинюючи експериментальні моделі

туберкульозу. *M. bovis*, навпаки, мають широке коло природних хазяїв, включаючи й людину. У людини патологічний процес і клінічна картина захворювання, викликаного *M. tuberculosis*, *M. bovis* і *M. africanum*, аналогічні. BCG, отримана з *M. bovis* і *M. microti*, однаково ефективна як жива туберкульозна вакцина [42].

Характеристика геному мікобактерій

Геном *Mycobacterium tuberculosis* містить $4,4 \cdot 10^6$ пар нуклеотидів і нараховує приблизно 4000 генів [52]. Загальні відомості про геном *M. tuberculosis* представлені в табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Геном *M. tuberculosis*

Функція	Кількість генів	% загальної кількості генів	% загальної кодуючої здатності
Обмін ліпідів	225	5,7	9,3
Процеси реплікації і дихання	207	5,2	6,1
Клітинна стінка і процеси в клітині	517	13,0	15,5
РНК	50	1,3	0,2
Інсерційні послідовності	137	3,4	2,5
PE і PPE білки	167	4,2	7,1
Клітинне дихання	877	22,0	24,6
Регуляторні білки	188	4,7	4,0
Вірулентність, адаптація та детоксикація	91	2,3	2,4
Консервативні функції	911	22,9	18,4
Білки з відомими функціями	607	45,3	9,9

Очевидно, що геном мікобактерій характеризується низкою незвичайних рис. Перш за все, це стосується значно збільшеної, порівняно з іншими прокаріотами, кількості генів, що відповідають за метаболізм жирних кислот. По всій видимості, це може бути пов'язано зі здатністю патогену персистувати в тканинах макроорганізму, де жирні кислоти використовуються як найважливіше джерело вуглецю.

Іншою своєрідною особливістю геному мікобактерій туберкульозу є наявність двох ділянок, що кодують сімейства PE і PPE білків, які характеризуються наявністю амінокислотної послідовності Пролін-Гліцин (PE) або Пролін-Пролін-Гліцин (PPE) в кінцевих регіонах. У цих білків 174 гени становлять 4 % всього геному збудника туберкульозу, що значно перевищує їх вміст у решті представників роду *Mycobacterium*. Білки зазначених сімейств зосереджені головним чином у клітинній стінці та плазматичній мембрані бактерій. Функції їх невідомі, однак їхнє різноманіття та антигенні властивості свідчать про можливу роль в антигенній варіабельності мікобактерій в процесі інфекції.

В решті геном мікобактерій подібний до геномів більшості прокаріот. Зокрема, значна подібність спостерігається в будові та функціонуванні генів, які відповідають за регуляцію транскрипції, кодують транспортні й регуляторні білки [21].

1.2. Сучасні уявлення про фармакотерапію туберкульозу

Основні принципи фармакотерапії туберкульозу

Історія становлення й розвитку протитуберкульозної фармакотерапії, по суті, являє собою історію розвитку антибактеріальної терапії в мініатюрі. Однак, приблизно до 40-х рр. XX ст., проблема хіміотерапії туберкульозу здавалася нерозв'язною через відсутність лікарських препаратів, які

проникають через кислотостійку багату на ліпіди клітинну стінку мікобактерій [21].

Переломним моментом в історії хіміотерапії туберкульозу стало відкриття протитуберкульозної дії стрептоміцину і парааміносаліцилової кислоти [3]. Протягом наступних років були відкриті й впроваджені в клінічну практику препарати похідних ізонікотинової кислоти (1952), етамбутол (1966), рифампіцин (кінець 60-х рр.), які й нині залишаються основними антимікобактеріальними препаратами [21].

Протягом приблизно 20–30-річного періоду, починаючи з відкриття протитуберкульозної дії стрептоміцину, ізоніазиду й піразинаміду, в більшості розвинутих країн світу спостерігалось значне зниження захворюваності на туберкульоз і розвитку стійкості практично не відмічалось. Більше того, до початку 80-х рр. в багатьох країнах було поставлено питання про повну ліквідацію туберкульозу [36].

Однак з середини 80-х – початку 90-х рр. відмічено зростання кількості резистентних і мультирезистентних штамів, частка яких до сьогодні досягла загрозливих показників [3]. І якщо в деяких країнах Західної Європи частка резистентних штамів не перевищує 4–5 %, з яких не більше половини є мультирезистентними, то в Росії та інших державах — республіках колишнього СРСР показники стійкості значно вищі і нерідко досягають величин 40–50 % і більше [21; 37]. В Україні поширеність резистентних і мультирезистентних штамів *M. tuberculosis* вивчена недостатньо. За нечисленними оцінками, вона коливається от 14 до 40 % і більше, причому в останні роки відмічається швидке зростання кількості полірезистентних штамів [5; 12].

На жаль, розвиток стійкості до антибактеріальних препаратів є неминучою платою за їхнє використання. Як було дуже точно зазначено S. В. Levy, питанням при цьому є не «як» і «за яких умов», а «коли — раніше чи пізніше» розвинеться стійкість. І сьогодні, як ніколи, актуальною є думка відомого мікробіолога і біохіміка Канетті, висловлена ним ще понад 30 років

тому в доповіді з проблем стійкості мікобактерій: «Лікарська стійкість мікобактерій — це надзвичайно широке поле діяльності. В цьому питанні є над чим подумати і клініцисту, і патологу, і фармакологу, біохіміку, епідеміологу, генетику...» [21].

Хіміотерапія — основний компонент лікування туберкульозу — передбачає застосування комбінацій протитуберкульозних препаратів (не менше 3), до яких чутливі МБТ, і приймають їх тривалий час (не менше 6 міс), при цьому добову дозу одного препарату, за незначним винятком, вводять в один прийом. Комбінацію препаратів, які приймають в день, називають добовою дозою хіміотерапії [16]. Монотерапія при лікуванні туберкульозу недопустима [17].

В 1950 р. в Центрі з хіміотерапії туберкульозу в м. Мадрасі (Індія) були проведені клінічні випробування оцінки ефективності лікування одним ізоніазидом і комбінацією ізоніазид + ПАСК. У всіх хворих, що лікувалися тільки ізоніазидом, збереглося бактеріовиділення і розвинулася лікарська стійкість МБТ. Таким чином, комбінована хіміотерапія необхідна для ефективного впливу на бактеріальну популяцію, що складається з мікобактерій, чутливих до окремих хіміопрепаратів, і стійких мутантів [17].

Основний курс протитуберкульозної хіміотерапії поділяють на два етапи.

Перший етап — інтенсивне лікування (інтенсивна фаза). Його проводять для призупинення розмноження мікобактерій туберкульозу і значного зменшення бактеріальної популяції в організмі хворого, при цьому вщухають гострі прояви хвороби, припиняється бактеріовиділення і у більшій частині хворих закриваються каверни в легенях. Інтенсивна терапія може стати етапом підготовки до хірургічного лікування.

Другим етапом лікування є підтримуюче лікування (підтримуюча фаза), яка проводиться для закріплення досягнутих результатів лікування. Метою другого етапу є забезпечення стійкого клінічного ефекту і запобігання загостренню процесу [38].

Методика лікування хворих на туберкульоз залежить від морфологічних змін у легенях і виділення МБТ у мокротинні. У хворих з деструктивним процесом і бактеріовиділенням хіміотерапія більш інтенсивна порівняно з хронічними хворими без бактеріовиділення і деструктивних змін у легенях [16].

Клінічна ефективність ПТП і різних режимів хіміотерапії визначається багатьма факторами, основними з яких є: наявність і вираженість бактерицидної або тільки бактеріостатичної дії щодо МБТ, їх різних популяцій і при їх різних локалізаціях, створювана бактеріостатична активність крові, дифузія в зони ураження, взаємодія між препаратами, здатність індукувати лікарську стійкість збудника і здатність запобігати її розвитку до сполучуваного препарату, переносність препарату хворими [39].

Важливим показником ефективності ліків є їхня дифузійна здатність. До препаратів, що мають високу дифузію, тобто здатність проникати в різні уражені ділянки, в том числі труднодоступні товстостінні каверни, казеозні осередки, туберкуломи, ділянки цирозу та ін., належать піразинамід, рифампіцин, рифабутин, ізоніазид, етамбутол, етіонамід та протіонамід [40]. Між тим, стрептоміцин, канаміцин, амікацин, віоміцин і капреоміцин в такі зони ураження дифундують погано. Тому їхній лікувальний ефект обмежений переважно регресією інфільтративних, а також свіжих осередкових і деструктивних уражень в легенях та інших органах [17]. Вилікування хворих на туберкульоз залежить від двох взаємопов'язаних факторів: пригнічення мікобактеріальної популяції, що розмножується, а також персистує, за допомогою хіміотерапевтичних препаратів і регресії туберкульозних змін в уражених органах з розвитком репаративних процесів, що настає внаслідок абацилювання. При цьому стійкість вилікування залежить від вираженості стерилізації туберкульозних уражень, особливо від мікобактерій, що персистують і повільно ростуть [16].

Сьогодні існує дві класифікації протитуберкульозних препаратів: за показаннями до застосування (1-го і 2-го ряду) і за антимікобактеріальною активністю.

Протитуберкульозні препарати I ряду (ізоніазид, рифампіцин, стрептоміцин, етамбутол, піразинамід) призначають хворим, які виділяють чутливі *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) (хворі 1–4 категорії). До протитуберкульозних препаратів II ряду належать канаміцин, амікацин, офлоксацин (ципрофлоксацин), етіонамід (протіоамід), ПАСК, циклосерин, капреоміцин, тіоацетазон. За існуючими стандартами лікування їх використовують тільки в індивідуальних схемах хіміотерапії для хворих 4 категорії, у яких визначають медикаментозну резистентність МБТ до ПТП I ряду, а також для хворих інших категорій при резистентності МБТ до препаратів I ряду або при їх поганій переносності. Розподіл протитуберкульозних препаратів на препарати I і II ряду забезпечує можливість дотримуватися стандартних схем хіміотерапії туберкульозу для профілактики розвитку медикаментозної резистентності МБТ.

За активністю протитуберкульозні препарати поділяють на три групи: найбільш ефективні (ізоніазид, рифампіцин), помірно ефективні (стрептоміцин, канаміцин, амікацин, етамбутол, піразинамід, офлоксацин, ципрофлоксацин, етіонамід, протіонамід, капреоміцин, циклосерин), менш ефективні (ПАСК, тіоацетазон). [21; 39].

Механізми дії основних протитуберкульозних препаратів

Ізоніазид — препарат групи ГІНК (гідрозид ізонікотинової кислоти). Впливає на компоненти клітинної стінки МБТ, мішенню дії є еноїл-редуктаза, інгібує синтез міколових кислот та їх похідних, крім того, токсичність ізоніазиду пов'язана з реакцією перекисного окислення ліпідів, яке каталізує каталаза-пероксидаза. Ізоніазид має найбільш виражену суто специфічну дію на МБТ, чинить бактерицидну дію на весь спектр

мікобактеріальної популяції, в менших концентраціях справляє потужну й широку бактеріостатичну дію. Є проліками і повинен бути активізований всередину мікробної клітини для прояву антибактеріальної активності. Зберігає туберкулостатичну концентрацію в крові від 6 до 24 год, ефективний при свіжих випадках захворювання на туберкульоз. Є одним із основних туберкулостатиків, що зумовлює високу питому вагу резистентних до нього штамів [3; 21; 41].

Рифампіцин — напівсинтетичний антибіотик широкого спектра дії, є похідним рифаміцину. Блокує біосинтез білка (процеси транскрипції), мішенню дії є РНК-полімераза. Справляє бактерицидну дію на весь спектр мікобактеріальної популяції, але на популяції, що персистують і повільно ростуть, діє більшою мірою, ніж ізоніазид. Має гіпофільні властивості й легко проникає через гідрофобну клітинну стінку. В менших концентраціях має меншу, ніж ізоніазид, бактеріостатичну дію. При застосуванні рифампіцину до нього швидко розвивається стійкість штамів МБТ. Близько 80–90 % рифампіцинрезистентних клінічних штамів (ізолятів) стійкі й до ізоніазиду, тобто рифампіцин є непрямим маркером мультирезистентності [17; 36].

Стрептоміцин — аміноглікозид широкого спектра дії. Порушує біосинтез білка в клітині МБТ за рахунок зв'язування з компонентом рибосомальної РНК (компонентом 16S), при цьому порушується читання генетичного коду і пригнічується процес трансляції. Чинить бактерицидну дію тільки на МБТ, що активно розмножуються і позаклітинно розташовані [17].

Етамбутол — декстро-2,2(етилдііміно)-ди-лонол — протиміко-бактеріальний засіб. Діє бактерицидно лише при високих дозах, механізмом дії є порушення синтезу компонентів клітинної стінки. Мішень дії — арабінозил-трансфераза, що бере участь в біосинтезі компонента клітинної стінки арабіногалактану. Має високу ефективність в комбінації з рифампіцином у хронічних хворих [39].

Піразинамід — амід піразинкарбонової кислоти. Механізмом дії є блокування реплікації ДНК. Як і ізоніазид, є проліками, чутливі штами продукують ензим піразимідазу, що перетворюється в клітині на піразинову кислоту, яка інгібує ферменти біосинтезу жирних кислот. Має стерилізуючий ефект щодо персистуючих форм, особливо у кислому середовищі, яке превалює в казеозних масах, стінках каверн і туберкулом. Вирізняється переважною внутрішньоклітинною активністю [40].

Апробовані й впроваджені в практику сучасні режими або схеми хіміотерапії основані на дії на позаклітинно і внутрішньоклітинно розташовані МБТ, на різні їх популяції — які активно розмножуються, повільно ростуть і персистують (перебувають в стані метаболічного спокою) [17].

Поліморфізм мікобактерій туберкульозу, що виявляється при проведенні хіміотерапії

Мікобактеріям туберкульозу властивий значний поліморфізм. Його прояву сприяє хіміотерапія, на фоні якої виявляються різні форми збудника: типові, L-форми (Light) і наддрібні, що фільтруються. Здатність типових мікобактерій трансформуватися в L-форми і форми, які фільтруються, — це процес формування високорезистентних варіантів бактерій [53,54]. L-форми зберігають основні тинкторіальні, ферментативні властивості, притаманні типовим мікобактеріям. L-форми (без клітинної стінки або з різного роду дефектами клітинної стінки — L-трансформація) можуть бути в стабільному і нестабільному стані. Нестабільні реверсують в типові вихідні форми після одного–трьох пасажів на живильних середовищах або при зараженні тварин, зберігаючи патогенність. Стабільні або умовно стабільні не реверсують, частково втрачають патогенність. При дослідженні цього явища нестабільні L-форми МБТ становили 73,1 % і реверсували після одного–трьох пасажів *in vitro* в типову бактеріальну форму збудника [55,56]. Існує популяції виділяють від 10 до 10 000 мутантів, резистентних до

ізоніазиду, від 10 до 1000 — резистентних до етамбутолу, від 10 до 1000 — резистентних до стрептоміцину, від 1 до 100 — резистентних до рифампіцину. Ці мутанти не мають практичного значення, але по мірі зменшення бактеріальної популяції під впливом ПТП змінюється співвідношення між кількістю лікарсько-стійких і чутливих штамів [17].

При неадекватних режимах хіміотерапії і сполучення ПТП, неоптимальних дозах при розрахунку в мг на 1 кг і розподілі добової дози на 2–3 прийоми основними механізмами у формуванні лікарської стійкості є селекція та адаптація МБТ, тобто поступовий відбір і звикання МБТ до ПТП, що при тривалій дії веде до зміни геному мікобактеріальної клітини без оборотності чутливості. За цих умов відбувається розмноження головним чином стійких МБТ [21].

1.3. Лікарська стійкість мікобактерій і причини її виникнення. Первинна і вторинна стійкість

Види стійкості

Хіміорезистентний туберкульоз (ХРТБ), DRTB (пер. з англ. "drug resistant tuberculosis") — це туберкульоз, при якому виділяються мікобактерії туберкульозу (МБТ), резистентні до одного або більшої кількості протитуберкульозних препаратів.

Мультирезистентний туберкульоз (МРТБ), MDRTB (пер. з англ. "multidrug resistant tuberculosis") — це туберкульоз, при якому виділяють МБТ, резистентні як мінімум до комбінації найбільш активних протитуберкульозних препаратів — ізоніазиду + рифампіцину.

Первинна резистентність (пер. з англ. "primary resistance") — це резистентність, виявлена у вперше діагностованих хворих, які ніколи не лікувалися протитуберкульозними препаратами.

Початкова резистентність (пер. з англ. "initial resistance") — це резистентність, виявлена у вперше діагностованих хворих, які лікувалися протитуберкульозними препаратами не більше 4 тиж, або у хворих при відсутності даних про попереднє лікування.

Вторинна, або набута резистентність (пер. з англ. "secondary/acquired resistance") — це резистентність, виявлена у хворих, які лікувалися протитуберкульозними препаратами більше 4 тиж.

Монорезистентність (пер. з англ. "monoresistance") — резистентність до 1 з 5 препаратів I ряду (ізоніазид, стрептоміцин, рифампіцин, етамбутол, піразинамід).

Полірезистентність (пер. с англ. "poliresistance") — резистентність до двох і більше препаратів I ряду.

Мультирезистентність (пер. з англ. "multidrug resistance") — підгрупа полірезистентності — резистентність до комбінації ізоніазид + рифампіцин та інших препаратів 1-го ряду.

Деякі дослідники виділяють окремо множинну резистентність мікобактерій туберкульозу [3; 53].

Молекулярні механізми розвитку стійкості до протитуберкульозних препаратів

Розвиток стійкості до препаратів — одна з основних причин зростання захворюваності й зниження ефективності лікування, оскільки ефективною щодо мікобактерій є досить обмежена кількість хімічних сполук [17]. Молекулярні механізми розвитку стійкості мікобактерій до антитуберкульозних препаратів до сьогодні вивчені аж ніяк не достатньо. Встановлено, однак, що у формування стійкості до основних препаратів залучено не менше 11 генів, виникнення мутацій в яких сприяє розвитку медикаментозної резистентності у мікобактерій туберкульозу [3].

Ізоніазид та етіонамід

Незважаючи на більш як п'ятдесятирічну історію застосування ізоніазиду та етіонаміду як протитуберкульозних препаратів, до сьогодні відсутня остаточна думка щодо їхнього механізму дії. Останніми дослідженнями встановлено, що він полягає в інгібуванні синтезу компонентів клітинної стінки мікобактерій, перш за все міколових кислот. Відсутність цих компонентів у оболонці робить мікобактерії вразливими при дії вільних радикалів та інших несприятливих компонентів зовнішнього середовища.

Дуже важливо зазначити, що, по суті, ізоніазид являє собою проліки, що активізуються в організмі людини *in vivo* за допомогою ферменту каталаз-пероксидази — продукту експресії гена *kat G*. Однією з мішеней активованої сполуки є ген *inh A*, відповідальний за синтез еноїл-редуктази, що бере участь в синтезі компонентів клітинної стінки. Численними дослідженнями доведено, що виникнення мутацій в обох вказаних генах може спричинити розвиток стійкості до ізоніазиду за рахунок експресії мутантних білків. При цьому не відбувається активації препарату або його зв'язування з мішенню. Стійкість до ізоніазиду кодується в кількох генах МБТ.

Найчастіше стійкі до ізоніазиду штами мікобактерій володіють міссенс-мутаціями (заміни нуклеотидів, що спричинюють заміну амінокислот) в гені *kat G*, причому найчастіше зустрічаються мутації в 315-му кодоні (Сер-Тир) й значно рідше — в 275-му (Тре-Про) і 463-му кодонах (Арг-Лей). В цілому мутації в гені *kat G* мають не менше 70 %, а за деякими оцінками — не менше 85 % стійких до ізоніазиду штамів.

Проте, у деяких випадках резистентність розвивається і за відсутності мутацій в гені *kat G*. Нерідко при цьому резистентність до ізоніазиду була асоційована зі стійкістю до етіонаміду. Виявилось, що близько 10 % фенотипічно стійких до ізоніазиду штамів мікобактерій мають мутації в гені *inh A*, що експресується при синтезі білків клітинної стінки. У більшості

випадків при цьому відбувається заміна серину на аланін в 94-му кодоні. Низкою досліджень доведено участь гена *ahp C* в розвитку стійкості до ізоніазиду; він змінює детоксикацію неорганічних і органічних пероксидів (алкілпероксиредуктаза). Крім того, стало відомо [3], що ген *oxy R* контролює експресію генів *kat G* і *ahp C*. Частота розвитку мутацій становить 10^{-7} – 10^{-9} на один клітинний поділ. За даними Інституту фтизіатрії та пульмонології ім. Ф. Г. Яновського, у 31,9 % хворих на туберкульоз з негативними результатами лікування діагностувалася резистентність штамів МБТ до ізоніазиду [17].

Рифампіцин

Під час інтенсивних досліджень вже до кінця 70-х – початку 80-х рр. було встановлено механізм дії рифампіцину, а також визначено підходи до вивчення питання про швидкий ріст рифампіцин-стійких штамів мікроорганізмів [57,58]. Зокрема, McClure і Cech в експериментах з кишковою паличкою було доведено, що специфічною мішенню рифампіцину є β -субодиниця РНК-полімерази мікобактерій. Пізніше Levin і Hatfull довели, що аналогічну дію рифампіцин чинить і на *M. tuberculosis*. Таким чином, при дії рифампіцину на бактеріальну клітину порушуються процеси транскрипції, а саме — елонгації РНК, що перериває процес біосинтезу білка. Резистентність до рифампіцину кодується в єдиному гені — *rpo B* [3].

Дослідження початку 1980-х рр. продемонстрували, що у більшості штамів мікобактерій, стійких до рифампіцину, наявні мутації в гені *rpo B*, який кодує β -субодиницю РНК-полімерази. Наявність мутацій веде до змін конформації ферменту, що спричинює неможливість приєднання препарату і, таким чином, до резистентності.

Переважає більшість мутацій, що зумовлює стійкість до рифампіцину, зосереджена у відносно короткій висококонсервативній ділянці гена *rpo B* довжиною 81 п. н., що кодує амінокислоти 511–533. Найчастішими типами

мутацій (93 % від загальної кількості) є поодинокі заміни нуклеотидів, які ведуть до заміни амінокислот, тобто міссенс-мутації. Набагато рідше зустрічаються вставки (3 %) і делеції (4 %). Найчастіше, за даними багатьох дослідників, заміни нуклеотидів спостерігалися в позиціях 526 (гістидин) і 531 (серин) амінокислот. Таким чином, понад 95 % фенотипічно стійких до рифампіцину штамів *M. tuberculosis* є мутантами за геном *rpo B*. Частота виникнення мутацій становить 10 на один поділ МБТ. Резистентні до рифампіцину штами МБТ значно знижують ефективність лікування хворих на ТБ: 21 % штамів *M. tuberculosis*, виділених у невдало лікованих хворих, були стійкі до рифампіцину [57-59]. Природа виникнення резистентності у штамів дикого типу (тобто позбавлених мутацій), які становлять, за різними оцінками, від 4 до 12 %, залишається невідомою.

Слід зазначити, однак, що географічна поширеність і частота мутацій в різних регіонах світу відрізняється. Так, російські дослідники вказують, що за результатами дослідження в 52 резистентних до рифампіцину штамів в 98 % випадків було виявлено мутації гена *rpo B*, причому поряд з широко розповсюдженими мутаціями триплетів 526 і 531 була виявлена висока частота мутації 516-го триплету, а в одному з стійких штамів мутацій виявлено не було. В цілому, слід зазначити, що в цьому відношенні штами мікобактерій туберкульозу на території країн СНД і, зокрема, України залишаються мало вивченими або невивченими [21].

Піразинамід

Піразинамід, як й інші похідні ізонікотинової кислоти, сам по собі антимікробною активністю не володіє і є проліками, тобто потребує активації при потраплянні в організм людини шляхом гідролізу за участі специфічної амідази мікобактерій, що було встановлено досить давно. Амідаза є результатом експресії гена *prt A*, при цьому піразинамід під впливом амідази

гідролізується до активної щодо мікобактерій сполуки — піризинової кислоти [40].

Цікаво зазначити, що однією з відправних точок у розумінні механізму виникнення стійкості *M. tuberculosis* до піразинаміду стала саме природна резистентність інших видів мікобактерій до цього препарату. З'ясувалося, що у *M. bovis* та інших видів мікобактерій в гені *rnc A* наявна крапчаста міссенс-мутація, що приводить до заміни гістидину на аспарагін у позиції 57. Таким чином, ці види позбавлені піразинамідазної активності, що робить неможливою активацію піразинаміду *in vivo* й зумовлює їх природну резистентність до цього препарату.

Механізм розвитку резистентності мікобактерій людського виду до *Z*, проте, залишався неясним досить довго. Лише останнім часом було показано, що у 72–97 % стійких до піразинаміду штамів спостерігаються мутації в гені *rnc A*, при цьому найчастіше зустрічаються поодинокі заміни нуклеотидів у кодонах 138, 141, 162 і 288, а також, набагато рідше, — вставки і делеції нуклеотидів. Продуктом мутантного гена є неактивний фермент — піразинамідаза, який нездатний до гідролізу та активації піразинаміду.

Слід зазначити ще й той факт, що досі невідома мішень дії піразинаміду в клітинах мікобактерій. Близькість хімічних структур *Z* і нікотинаміду дозволяє припустити, що він впливає на біосинтез піридинових нуклеотидів. Більшість дослідників тому вважають, що існують й інші, невідомі нині молекулярні механізми виникнення стійкості до цього препарату [21].

Стрептоміцин

Виявилось, що природа резистентності до стрептоміцину в збудників туберкульозу докорінно відрізняється від такої у решти мікроорганізмів. Справа в тому, що у переважної більшості прокариот в геномі є кілька копій оперонів рРНК (у кишкової палички — *сім*), тимчасом як мікобактерії, що ростуть повільно, до яких належить і *M. tuberculosis*, містять одну, рідко —

дві (*M. smegmatis*) копії цього оперона. Зрозуміло, що мутації в одній з численних копій гена 16S РНК у кишкової палички не приводять до розвитку резистентності, тоді як мутація в єдиній копії даного гена (*rrs*) у мікобактерій зумовлює зміни структури 16S РНК і, таким чином, їх нечутливість до стрептоміцину. Було також виявлено, що в механізмі виникнення резистентності до стрептоміцину певну роль відіграє рибосомальний білок S12, стабілізуючий структуру рРНК, при цьому виникає міссенс-мутація в гені *rps L* [21].

Дослідженнями Douglass і Steyn, Finken та інших було доведено, що принаймні в 60 % випадків стійкість до стрептоміцину у *M. tuberculosis* зумовлена саме мутаціями в генах *rps L* і *rrs*. Найчастішими мутаціями, як і у випадку стійкості до інших препаратів, є міссенс-мутації — поодинокі заміни нуклеотидів у позиціях 491, 512, 513, 516, 903 і 904 гена *rrs* і в позиціях 43 і 88 гена *rps L*.

Проте, близько 40 % випадків резистентності до STR у мікобактерій поки що не знайшли свого пояснення. Можливо, у механізм її виникнення залучений ще ряд генів, над виявленням яких сьогодні ведеться інтенсивна робота. Опубліковані дані про виділення 28,5 % штамів МБТ, стійких до стрептоміцину, у невдало лікованих від туберкульозу хворих [59].

Етамбутол

До сьогодні механізм дії етамбутолу практично невідомий. Дослідженнями Такаюма et al. в 1989 р. була доведена здатність етамбутолу інгібувати синтез арабіногалактанів, що порушує утворення клітинної стінки мікобактерій, веде до підвищення її проникності і, як наслідок, до загибелі мікроорганізму. Останніми дослідженнями встановлено, що в розвитку стійкості до етамбутолу беруть участь гени комплексу *emb*, залучені у синтез ферментів — арабінозилтрансфераз, при цьому у різних видів мікобактерій, зокрема, *M. Tuberculosis*, *M. avium*, ці гени мають відмінності в будові. За

даними Ramaswamy et al., понад 68 % стійких до етамбутолу штамів мають поодинокі заміни нуклеотидів у гені *emb B*. Ризик мутацій становить $1,0 \cdot 10^{-7}$. Можливо, існують й інші механізми розвитку стійкості [21].

Фторхінолони

Високі темпи росту стійкості мікобактерій до препаратів першого і другого ряду змусили лікарів і дослідників шукати нові антимикобактеріальні засоби. В зв'язку з цим з середини 80-х рр. як протитуберкульозні препарати обмежено застосовуються фторхінолони. Слід, проте, зазначити, що стійкість до цих препаратів виявляється значно сильніше й швидше, ніж до решти ПТП.

При потраплянні в бактеріальну клітину фторхінолони викликають порушення суперспіралізації ДНК, однак досі точно не встановлено, чи діють вони на саму молекулу ДНК або на ферменти ДНК-гірази (топоізомерази ДНК II типу). Сьогодні більшість дослідників віддає перевагу другому припущенню. ДНК-гіраза складається з чотирьох субодиниць (двох А- і двох В-), кодованих, відповідно, генами *gyr A* і *gyr B*. В розвитку стійкості до фторхінолонів найважливішу роль відіграють мутації в гені *gyr A*, тимчасом як мутації в гені В-субодиниці обумовлюють, як правило, низькі рівні резистентності. У більшості (понад 90 %) стійких штамів у кодонах 88, 91, 94 і 122 гена *gyr A* спостерігаються міссенс-мутації, що приводять до заміни амінокислот при синтезі А-субодиниці ДНК-гірази і, внаслідок цього, неефективності антибіотика. Цікаво зазначити, що мутації в кодоні 95 спостерігаються як у стійких, так і у чутливих штамів мікобактерій [21].

Механізми розвитку стійкості до препаратів 2–3-го рядів, до яких належать, зокрема, аміноглікозиди, з'ясовані недостатньо.

Таким чином, можна вважати встановленим, що найважливішим механізмом виникнення стійкості до протитуберкульозних препаратів у мікобактерій є наявність мутацій в різних генах бактеріальної хромосоми. В

цьому виявляються значні відмінності мікобактерій від багатьох інших мікроорганізмів, у яких розвиток стійкості пов'язаний з плазмідами та іншими позахромосомними елементами.

Методи діагностики лікарської стійкості

Повсюдне поширення первинно резистентних форм МБТ вказує на можливий розвиток у деяких країнах епідемії мультирезистентного туберкульозу, що не піддається лікуванню. В зв'язку з цим, актуальним завданням фтизіатрії є своєчасна діагностика лікарської стійкості туберкульозу, і першим кроком в його розв'язанні є прискорене визначення лікарської чутливості у щойно виявлених хворих [60–62].

Бактеріологічні методи діагностики лікарської стійкості

Нині існує кілька методів визначення ЛС мікобактерій туберкульозу: метод абсолютних концентрацій (мінімальні інгібуючі концентрації), метод співвідношення резистентності й метод пропорцій [60-63; 64].

Метод абсолютних концентрацій на яєчному живильному середовищі Левенштейна — Йенсена досить точний і дозволяє дослідити діагностичний матеріал, який містить будь-яку кількість МБТ, оскільки для визначення ЛС використовуються штами, попередньо виділені на щільних живильних середовищах [20; 65]. Оскільки терміни виділення МБТ на живильних середовищах становлять не менше 1–1,5 міс, то результати визначення резистентності вказаним методом зазвичай отримують не раніше як через 2–2,5 міс після взяття матеріалу. Цей метод визначення ЛС після виділення культури МБТ дістав назву непрямого методу.

Метод пропорцій, при якому застосовують єдиний стандарт бактеріальної каламутності з трьома контрольними розведеннями, стає все популярнішим як найоб'єктивніший серед культуральних методів.

Перевагами методу є: точне титрування первинної бактеріальної суспензії, використання 3 контрольних пробірок з різним відсотком вихідної бактеріальної популяції (100 %, 10 %, 1 %).

Молекулярно-генетичні методи виявлення стійкості до протитуберкульозних препаратів

Виявлення стійкості до антимікробних препаратів відіграє величезну роль у клінічній мікробіології, в першу чергу для призначення оптимальної терапії, а також для виявлення поширеності стійких штамів мікроорганізмів. У зв'язку з повільним ростом мікобактерій на середовищах традиційні бактеріологічні методи виявлення їхньої чутливості потребують не менше 10–12 тиж, тому в останні 8–10 років саме мікобактерії стали основним об'єктом розробки і застосування молекулярно-генетичних методів, основаних на вивченні нуклеїнових кислот [3; 65- 67].

Для виявлення мутацій, які обумовлюють резистентність мікобактерій, розроблені молекулярно-генетичні методи, що ґрунтуються на кількох різних підходах:

1. Методи, основані на секвенуванні ділянок генів.
2. Методи, основані на ампліфікації специфічних ділянок генів (різні модифікації ПЛР).
3. Методи, основані на гібридизації.
4. Інші підходи.

Відкриття поліморфних сайтів у повторюваних послідовностях нуклеотидів у геномі туберкульозної палички надало змогу вивчення «молекулярних відбитків пальців» — генотипу мікобактерій, при цьому отримана інформація може бути використана для розуміння проблем патогенезу туберкульозної інфекції і шляхів її розповсюдження [84; 85].

Генотипування ізолятів, виділених від пацієнтів, може бути інформативним у випадках виявлення або розвитку лікарської стійкості, коли

необхідно розв'язати питання про те, чи є стійкість виниклою в результаті неадекватної терапії, або відбулася реінфекція новим стійким штамом. Якщо генотипові патерни мікобактерій до й під час лікування збігаються, то мова йде про виникнення стійкості в процесі лікування. Причинами її можуть бути недостатні дози препарату або несумлінність пацієнта. У випадку збігу патернів мова йде, очевидно, про реінфекцію іншим штамом, що потребує виявлення профілю його лікарської стійкості й призначення відповідної терапії [86; 87].

Генотипування може надати неоціниму допомогу і в клініко-епідеміологічних дослідженнях, коли необхідно розв'язати питання про рецидив відповідного захворювання внаслідок активації персистуючих мікобактерій, або загострення пов'язано з інфікуванням новим штамом. Обов'язковим у випадку виявлення реінфекції є ідентифікація джерела зараження і обстеження його оточення [88].

Генотипування є найважливішим інструментом при дослідженні епідемічного осередку. Якщо епідеміологічні дані дають підставу припускати існування осередку інфекції, генотипування виділених штамів з високою точністю допоможе відповісти на запитання, чи є даний випадок реальним осередком, тобто джерелом зараження служила певна особа, або даний спалах є випадковим поєднанням кількох або великої кількості епідеміологічно не зв'язаних випадків туберкульозу. Виявлення ідентичних або подібних генотипів дозволяє зробити висновок про єдине джерело зараження. Причому, наявність великої кількості штамів у кластері свідчить про відносно недавню трансмісію інфекції [32]. Навпаки, наявність окремих неклассифікованих генотипів пов'язана, як правило, з реактивацією інфекції, зараження якою сталося в далекому минулому. На підставі молекулярно-епідеміологічних даних, таким чином, можна розробити заходи для найшвидшої локалізації осередку і запобігання розповсюдженню хвороби [25]. Генотипування відіграє важливу роль у визначенні факторів ризику захворювання на туберкульоз й ідентифікації груп ризику. Молекулярно-

епідеміологічні дослідження дозволяють з високою точністю ідентифікувати популяції і групи всередині популяцій, в яких швидкість трансмісії інфекції найвища — знову ж таки на основі порівняння генотипів штамів мікобактерій, виділених від хворих із відповідних груп. Визначення груп ризику дозволяє цілеспрямовано й «адресно» проводити профілактичні, лікувальні й інші заходи, спрямовані на боротьбу з туберкульозом [89-100; 101].

Таким чином, генотипування мікобактерій має величезні перспективи в діагностиці, лікуванні й профілактиці туберкульозу [102].

Все методи молекулярного генотипування мікобактерій можна поділити на дві основні групи: основані на «класичних» молекулярно-генетичних технологіях блотингу і гібридизації, а також основані на використанні ПЛР, найчастіше в поєднанні з іншими методичними підходами.

При використанні ПЛР для дослідження достатньо незначних кількостей ДНК у вигляді клітинних лізатів мікобактерій, що різко скорочує витрати праці, часу й матеріалів для аналізу. На особливу увагу серед методів генотипування, основаних на ПЛР, за інформативністю, простотою і високим ступенем виявленого поліморфізму заслуговують методи типування за кількістю варіабельних тандемних повторів (VNTR-локусів), випадково ампліфікованих послідовностей (RAPD), подвійних повторюваних елементів (DRE-PCR) і споліготипування [103- 107].

Споліготипування (спейсер-олігонуклеотидне типування) основане на детекції наявності і кількості спейсерів у так званому DR-регіоні, або регіоні прямих повторів мікобактеріальної хромосоми. Було виявлено, що в даній ділянці геному мікобактерій комплексу *M. tuberculosis* наявна послідовність повторюваних елементів (прямих повторів), розділених спейсерними ділянками. Важливою особливістю, яка й була використана при розробці методу споліготипування, є те, що порядок розташування спейсерів однаковий для всіх штамів, при цьому, однак, деякі спейсери можуть бути відсутні. Всього у мікобактерій було виявлено 43 типи спейсерів, з яких 37 є

характерними для дикого штаму *M. tuberculosis*, а ще 6 додатково характеризують *M. bovis* BCG. Поліморфізм, реєстрований при споліготипуванні, характеризує наявність або відсутність певних типів спейсерів у DR-регіоні мікобактерій.

Метод дозволяє ефективно і з високою достовірністю диференціювати людський і бичачий види туберкульозу, а також виявити подібність і розбіжності досліджуваних штамів з метою проведення епідеміологічних досліджень.

Як зазначає багато авторів [25], дані споліготипування уточнюють і доповнюють дані, отримані за допомогою інших методів, що дозволяє рекомендувати його як необхідний метод при проведенні молекулярно-епідеміологічних досліджень. За допомогою споліготипування виявлені особливості епідеміології й географічні шляхи розповсюдження штамів *M. tuberculosis* в США, Великобританії, багатьох країнах Європи, деяких областях Росії. Цікаво зазначити, що за допомогою споліготипування в сукупності з іншими методами ДНК-діагностики було доведено приналежність ДНК, виділеної з середньовічних кісткових останків людини, до виду *M. tuberculosis* і проведено її генетичний аналіз [26]. Нині розроблена універсальна міжнародна методологія споліготипування і створюються всесвітні бази даних споліготипів мікобактерій [21].

Особливо ефективним є застосування споліготипування для виявлення циркуляції певних сімейств штамів, наприклад "Beijing", для яких була доведена асоційованість з високими рівнями лікарської стійкості [25].

Поширеність лікарсько-стійких штамів мікобактерій у різних регіонах, їхня роль у клініці та епідеміології туберкульозу

Сьогодні ситуацію з туберкульозом визначають як третинну епідемію. Першу становило збільшення захворюваності на типовий туберкульоз. Друга епідемія, зумовлена хіміорезистентним туберкульозом, розповсюджується

швидкими темпами і створює значну небезпеку. Третя зумовлена туберкульозом на фоні СНІДу у ВІЛ-інфікованих.

За даними ВООЗ, частота первинної медикаментозної резистентності до протитуберкульозних препаратів 1-го ряду становить в середньому 10,4 %, до чотирьох протитуберкульозних препаратів — 0,2 %. Первинна мультирезистентність визначається в усіх країнах, крім Кенії, де її частота дорівнює в середньому 1,4 %. Частота вторинної медикаментозної резистентності до протитуберкульозних препаратів 1-го ряду значно вища і становить в середньому 36 %, до всіх чотирьох протитуберкульозних препаратів — 4,4 %, частота мультирезистентності — 13,0 % (діапазон від 0 % в Кенії до 54,0 % в Латвії) [3]. Спалахи мультирезистентного туберкульозу відмічалися і відмічаються в різних країнах світу, в тому числі в США, Західній Європі та Японії [68,71–73].

Лікарська стійкість штамів мікобактерій, що циркулюють в Україні

В Україні визначається висока частота первинної медикаментозної резистентності — 23–25 %, що вдвічі перевищує середні показники ВООЗ, є випадки первинної мультирезистентності — 1,4–2 %. Вторинна медикаментозна резистентність до протитуберкульозних препаратів 1-го ряду становить 55–56 %, що перевищує середній показник ВООЗ у 1,5 разу. Частота вторинної мультирезистентності в окремих районах України надзвичайно висока — 45–46 %, що в 3,6 разу перевищує середній показник ВООЗ, це свідчить про надзвичайну актуальність проблеми хіміорезистентного туберкульозу в Україні [2; 53; 60].

Розповсюдження медикаментозної резистентності відображає якість хіміотерапії хворих з вперше діагностованим туберкульозом легень. Первинна медикаментозна резистентність МБТ — показник неякісного лікування хворих на туберкульоз в минулому, вторинна — на даний момент [16].

Однією з найважливіших причин тривожної ситуації щодо туберкульозу в Україні є, мабуть, зростання кількості штамів мікобактерій, резистентних до одного або кількох антимікобактеріальних препаратів. Як було зазначено вище, спектр ефективних протитуберкульозних препаратів сьогодні досить вузький. Виникнення стійкості до одного, а тим більше кількох препаратів значно знижує ефективність лікування хворого, при цьому набагато збільшуються витрати часу й фінансів [16; 17].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика ретроспективних і проспективних методів дослідження

З метою вивчення рівнів поширеності резистентних штамів *M. tuberculosis* було проведено ретроспективний аналіз даних бактеріологічних досліджень резистентності до лікарських засобів, виконаних в лабораторії Миколаївського протитуберкульозного диспансеру (МОПТД) протягом 2000–2005 рр. Всього проаналізовано данні про 15607 культур МБТ, з них 10100 культур, які виділені від вперше виявлених хворих на ТБ и 5507 культур від хворих з хронічним перебігом ТБ (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Обсяг і характеристика проведених ретроспективних досліджень (2000–2005 рр.) з вивчення резистентності популяції МБТ до ПТП I і II ряду в м. Миколаєві та Миколаївській області України (3794 резистентних штамів)

Контингент обстежених	Кількість виділених резистентних штамів		
	Всього	від жителів м. Миколаєва	від жителів Миколаївської області
Від первинних хворих	606	227	379
Від хронічних хворих	3188	1283	1905

Згідно з діючим до 2002 р. на території України Наказом Міністерства охорони здоров'я СРСР № 558 від 8 червня 1978 р., всі виділені культури *M. tuberculosis* тестувалися на резистентність до 6 препаратів: ізоніазиду, стрептоміцину, канаміцину, етамбутолу, рифампіцину та етіонаміду в таких концентраціях:

стрептоміцин — 5 і 50 мкг/мл;

ізоніазид — 1 і 5 мкг/мл;

етіонамід — 30 мкг/мл;
канаміцин — 30 мкг/мл;
етамбутол — 2 і 5 мкг/мл;
рифампіцин — 20 мкг/мл.

Дослідження лікарської стійкості проводилися методом абсолютних концентрацій із використанням аптечних таблетованих або рідких лікарських форм.

З лютого 2002 р. на території України набув чинності новий Наказ Міністерства охорони здоров'я № 45 від 6 лютого 2002 р. [20]. Згідно до цього Наказу передбачається поступовий перехід до тестування чутливості виділених штамів мікобактерій до лікарських препаратів методом пропорцій з використанням хімічно чистих субстанцій лікарських препаратів, що відповідає вимогам міжнародних стандартів. Але в лабораторії Миколаївського обласного протитуберкульозного диспансеру, як і в більшості лабораторій України, через відсутність відповідних умов тестування лікарської стійкості проводилося методом абсолютних концентрацій на живильному середовищі Левенштейна — Йенсена з вищезазначеними концентраціями аптечних таблетованих препаратів.

Слід підкреслити, що важливе клінічне та епідеміологічне значення мають показники окремо первинної і вторинної, або набутої, лікарської стійкості. Як відомо, в лабораторних журналах ця інформація була відсутня до 2005 р. Тому нами було проведено детальний аналіз і порівняння даних лабораторної служби з картотеками й історіями хвороби пацієнтів з метою з'ясувати, чи лікувався раніше пацієнт від туберкульозу, або захворювання у нього виявлено вперше. Таким чином, нам вдалося з повною достовірністю визначити показники первинної і набутої резистентності.

Було проведено аналіз динаміки загальних показників моно- і полірезистентності в 2000–2005 рр. і виявлено тенденції зміни цих показників.

Показовими були результати аналізу резистентності штамів до окремих препаратів, як першого ряду (стрептоміцин, ізоніазид, рифампіцин, етамбутол), так і другого (канаміцин, етіонамід). Підтвердилися очікувані результати показників вторинної резистентності до всіх препаратів по відношенню до первинної резистентності.

Велику увагу було приділено вивченню динаміки зміни рівнів резистентності до комбінацій протитуберкульозних препаратів, які використовуються для лікування хворих на туберкульоз в МОПТД (Миколаївському обласному протитуберкульозному диспансері).

На підставі отриманих даних було визначено загальні тенденції формування стійкості мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів, які виявляються при аналізі бактеріологічних досліджень, проведених у період 2000–2005 рр. в МОПТД.

З метою вивчення молекулярно-генетичних особливостей розвитку резистентності мікобактерій туберкульозу до лікарських засобів було проведено проспективний аналіз рівнів лікарської стійкості штамів *Mycobacterium tuberculosis*, які були виділені у хворих у Миколаївському обласному протитуберкульозному диспансері в період травень–липень 2003 р., до основних протитуберкульозних препаратів першого ряду за допомогою мікробіологічних і молекулярно-генетичних методів. Дослідження було проведено на матеріалі мокротиння, чистих культур МБТ, ізолятів ДНК, отриманої від хворих на різні форми туберкульозу легенів. Характеристика штамів МБТ представлено у додатку А.

Обсяг і характеристика проведених проспективних досліджень з вивчення підвищення ефективності лікування хворих на туберкульоз в МОПТД представлено у табл. 2.2.

Обсяг і характеристика проведених проспективних досліджень з вивчення підвищення ефективності лікування хворих на туберкульоз в МОПТД (травень–червень 2003 р.)

Предмет, об'єкт дослідження	Кількість зразків	Проведені дослідження	Отримані результати
Мокротиння	146	Мікроскопія із забарвленням за Цилем — Нільсоном	88 БК(+) 58 БК (-)
		Бактер. Метод	81 чиста культура
Чиста культура	64	Виділення ДНК	38 ізолятів
Ізоляти ДНК	38	Детекція мутацій з використанням олігонуклеотидних зондів	gro B 14 kat G 17 Inh A 6
		Споліготипування для виявлення представників МБТ генетичного сімейства Beijing	7
Пацієнти МОПТД	146	Анкетування, (збір анамнестичних даних для підвищення ефективності лікування, виділення груп ризику)	146 анкет

Планування дослідження з використанням методу «поперечного зрізу» (cross-sectional study) [25] дозволило отримати необхідну епідеміологічну інформацію для призначення адекватного лікування і виявити нові випадки захворювання. Для збору анамнестичних та епідеміологічних даних на кожного хворого лікарем або медичною сестрою була заповнена анкета, до якої увійшли дані про місце постійного проживання, вік, інформація про

перебування в місцях позбавлення волі, БЦЖ вакцинації, дату встановлення діагнозу і форму туберкульозного процесу, а також відомості про призначене лікування і дату початку протитуберкульозної терапії. Анкету представлено в додатку Б.

Характеристика контингентів обстежених відображено у табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Характеристика контингенту обстежених пацієнтів

Контингент обстежених пацієнтів		Кількість	
		абс.	%
Хворі на туберкульоз всього		146	100
у тому числі:			
Перебіг захворювання	Вперше виявлені	97	66,0
	Хронічний перебіг ТБ	49	34,0
Характеристика МБТ	Резистентні до ПТП	17	11,6
	Чутливі до ПТП	71	48,6
	Абацилярні форми	58	39,7
Місце проживання	Жителі міста	53	36,3
	Жителі області	93	63,6
Вік	до 28 років	52	36,0
	після 28 років	94	64,0
Хворі з соціальних груп ризику	Особи без певного місця мешкання	5	3,4
	Особи, що прибули з установ пенітенціарної системи	26	17,8
	Хворі на туберкульоз водночас з ВІЛ/СНІД	4/2	2,8/1,4
Стать	Чоловіки	110	75,3
	Жінки	36	24,6
Діагноз	Інфільтративний ТБ	60	41,3
	Дисемінований	39	26,8
	Фіброзно-кавернозний	15	10,4
	Вогнищевий	22	15,2
Кінець захворювання	Одужання	58	39,7
	Клініко-рент. стабілізація	8	5,6
	Прогресування захворювання	32	21,9
	Летальний кінець	20	13,4

Бактеріоскопічні й бактеріологічні дослідження мокротиння проводилися у відповідності з Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р.

[20]. Мокротиння хворого збирали тричі протягом трьох днів. Кожна порція матеріалу ділилася на дві частини, з першої готували мазки для бактеріоскопії, другу використовували для культуральних досліджень. Мазки забарвлювали за методом Циля — Нільсона і мікроскопували з використанням імерсійної системи. Бактеріологічні (культуральні) дослідження проводили шляхом посіву мокротиння, обробленого 12%-м стерильним розчином Na_3PO_4 , на щільне живильне середовище Левенштейна — Йенсена. Ідентифікацію *Mycobacterium tuberculosis* проводили з використанням ніацинового тесту.

Визначення чутливості мікобактерій до рифампіцину (20,0 мкг/мл), стрептоміцину (5,0 мкг/мл), ізоніазиду (1,0 мкг/мл) і етамбутолу (5,0 мкг/мл) проводили з використанням методу абсолютних концентрацій на щільному живильному середовищі. При визначенні результатів використовували критерії, наведені у відповідних розділах Наказу № 45 [20].

Молекулярно-генетичні дослідження стійкості виділених ізолятів мікобактерій були проведені у відповідності з Договором між Національною Референс-лабораторією з діагностики туберкульозу Великобританії (Лондон) і Одеським державним медичним університетом від 25.04.2003 р. в молекулярно-генетичному відділі Національної Референс-лабораторії діагностики туберкульозу Великобританії (керівник професор Франсіс А. Дробнієвський).

Для виявлення циркуляції сімейства штамів Weijing використовували метод споліготипування.

Споліготипування здійснювали шляхом ампліфікації усього DR-регіону мікобактеріальної хромосоми з наступною гібридизацією продуктів ампліфікації з олігонуклеотидними пробами 43 спейсерів, іммобілізованими на мембрані. Ампліфікацію DR-регіону проводили за допомогою біотин-мічених праймерів, що дозволило отримати мічені біотином продукти ампліфікації і в подальшому візуалізувати результати гібридизації. При

цьому з високим ступенем точності визначали наявність тих чи інших спейсерів у досліджуваного штаму.

З метою вивчення ефективності використання препаратів з групи фторхінолонів для лікування хворих на туберкульоз було досліджено 809 культур, виділених у хворих, які перебували на лікуванні в МОПТД у другій половині 2003 р. (табл. 2.4).

Таблиця 2.4

Характеристика контингентів обстежених пацієнтів при проведенні проспективних досліджень з вивчення підвищення ефективності лікування хворих на туберкульоз в МОПТД при використанні препаратів з групи фторхінолонів у 2003 р.

Контингент обстежених пацієнтів	Кількість	%
Хворі на туберкульоз	809	100
Вперше виявлені	529	65,3
Хронічний перебіг	280	34,6

З використанням рекомендованих МОЗ України бактеріологічних методів було вивчено виникнення і розвиток резистентності МБТ до препаратів групи фторхінолонів (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

Результати проведених проспективних досліджень мокротиння (n=809) при використанні препаратів з групи фторхінолонів у 2003 р.

Варианти резистентності штамів МБТ до окремих фторхінолонів	абс	%
Резистентність до ципрофлоксацину штаму МБТ	19	2,3
Резистентність до левофлоксацину	11	1,4
Резистентність одночасно до ципрофлоксацину і левофлоксацину	8	1,0

2.2. Бактеріоскопічні та бактеріологічні методи, використані для вивчення резистентності мікобактерій

Для виявлення в досліджуваному матеріалі *Mycobacterium tuberculosis* застосовували метод прямої бактеріоскопії з використанням забарвлення за Цилем — Нільсоном у відповідності з Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 «Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції». Принцип методу оснований на здатності *M. tuberculosis* після забарвлення фуксином при нагріванні утримувати барвник після тривалого перебування в сірчаній кислоті або в солянокислому спирті.

Реактиви:

1. 1,0%-й розчин основного фуксину (1,0 г основного фуксину розтирають з 2–3 краплями гліцерину, додають по краплях 10,0 мл 96%-го етилового спирту і 90,0 мл 5,0%-го розчину фенолу (5,0 г кристалічного фенолу або карболової кислоти в 100,0 мл дистильованої води)). Розчин залишали на добу, потім фільтрували через паперовий фільтр, зберігали в темному місці при кімнатній температурі в добре закритому посуді.

2. Знебарвлювальні розчини: 20%-на сірчана кислота, 3,0%-й солянокислий спирт.

3. Дозабарвлювальний розчин: 0,25%-й розчин метиленового синього.

4. Фільтрувальний папір.

Всі розчини маркували і зберігали в темному посуді при кімнатній температурі протягом 6–12 міс.

Спеціальне обладнання: мікроскоп з імерсійним об'єктивом, спиртовий пальник, предметні скла, дерев'яна паличка.

Приготування мазка мокротиння:

Брали нове чисте предметне скло і з одного боку вказували шифр пацієнта, на нього переносили необхідну кількість досліджуваного матеріалу за допомогою аплікатора або бактеріологічної петлі. Для приготування мазків використовували непрозорі сіруваті або жовтуваті сироподібні маси,

присутні в мокротинні. Матеріал розподіляли на предметному склі тонким шаром приблизно 1,0 см на 2,0 см. Мазок готували достатньо тонким, щоб його можна було легко мікроскопувати. На кожне предметне скло вміщували не більше одного мазка і залишали для висихання на 15 хв. Нагрівання при цьому не застосовувалося. Фіксування препаратів проводили проведенням скла, при цьому мазок знаходився зверху, через полум'я спиртівки 3–4 рази, перегріву не допускали, перед забарвленням мазок охолоджували.

Забарвлення мазків:

Маркіровані предметні стекла вміщували на підставку «полозки» групами до 12 штук, щоб не торкалися один одного. На кожне скло наливали розчин Циля — Нільсона (карбол-фуксин), профільтрований перед використанням. Препарат обережно нагрівали до появи пари, кипіння не допускалося, розчин повністю не випарювали. Стекла промивали під струменем води до повного видалення барвника. На 3 хв наносили знебарвлювальний розчин і ретельно промивали стекла водою, залишки води видаляли. На предметні стекла наносили дозобарвлювальний розчин на 30–60 с, потім їх ретельно промивали водою, залишки видаляли і мазок висихав на повітрі без промокання препарату.

Оцінка результатів:

Препарат мікроскопували з використанням імерсійної системи протягом 15 хв, оглядали не менше 300 полів зору.

Кількість мікобактерій в мазку в процесі антимікобактеріальної терапії є орієнтиром її ефективності або непрямим свідченням розвитку стійкості мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів (табл. 2.6).

**Оцінка результатів бактеріоскопії при забарвленні за Цилем —
Нільсоном**

Кількість КСП паличок в мазку	Кількість полів зору	Результат	Оцінка ступеня обсіменіння і форма відповіді
Відсутні	300	Негативний	КСП не виявлені в 300 п/зору
1–3	300	Негативний	КСП не виявлені в 300 п/зору
4–9	100	Позитивний (недостатня кількість)	Вказати точну кількість виявлених КСП (4–9 на 100 п/зору)
10–99	100	Позитивний	1 + (от 10 до 99 КСП на 100 п/зору)
1–10	В полі зору	Позитивний	2 + (1–10 КСП в п/зору в 50 п/зору)
Більше 10	В полі зору	Позитивний	3 + (більше 10 в п/зору в 20 п/зору)

Примітка:

1. КСП — кислотостійкі палички.
2. П/зору — поле зору.

Бактеріологічний метод виявлення мікобактерій туберкульозу

Цей метод має переваги перед методом бактеріоскопії, оскільки дозволяє виявити *M. tuberculosis* в досліджуваному матеріалі при наявності більше 100 мікобактерій в 1 мл. Виявленні культури можуть бути ретельно досліджені та ідентифіковані, можна визначити їхню чутливість до антимікобактеріальних препаратів, вивчити вірулентність та інші властивості. Виділені бактеріологічним методом мікобактерії свідчать про їхню високу життєздатність і вегетування в організмі хворого.

Для зниження супровідної мікрофлори досліджуваний матеріал піддавали спеціальній обробці тризаміщеним фосфорнокислим натрієм. Цей

реактив не впливає на життєдіяльність мікобактерій туберкульозу, допускає тривалу експозицію патологічного матеріалу й гомогенізує його.

Посіви оглядали кожного тижня. Ріст *M. tuberculosis* спостерігали на 3–6-й тиждень у вигляді сухих непігментованих або блідо-кремових R-колоній. Після курсу антимікобактеріальної терапії в деяких випадках виділялися культури з гладким вологим ростом (S-колонії). Позитивну відповідь давали тільки після мікроскопії культур.

Результат посіву відображав не тільки якісну характеристику (позитивний або негативний), а й кількісну оцінку (кількість колоній). Для оцінки результатів посіву керувалися таблицею, рекомендованою ВООЗ (Національна протитуберкульозна програма, 2000) (табл. 2.7).

Таблиця 2.7

**Схема ВООЗ для оцінки результатів культурального дослідження
на *M. tuberculosis***

Кількість колоній, що виросли	Оцінка результатів	Характеристика
Немає росту	Негативний	
1–19 колоній	Позитивний	Поодинокі колонії (невелике бактеріовиділення; при бактеріоскопії патологічного матеріалу мікобактерії, як правило, не виявляють)
20–100 колоній	1+	Помірне бактеріовиділення; при бактеріоскопії патологічного матеріалу знаходять поодинокі мікобактерії в кожному полі зору або поодинокі — в препараті, але не менше п'яти
100–200 колоній 200–500 колоній (майже суцільний ріст) Більше 500 колоній (суцільний ріст)	2+ 3+ 4+	Масивне бактеріовиділення; бактеріоскопічно — 10 і більше паличок у кожному полі зору
Заріст банальною мікрофлорою	Заріст — посів повторити	

Більшість посівів дає ріст *M. tuberculosis* протягом двох місяців, тому інкубували посіви до двох з половиною місяців. За відсутності росту до цього терміну посів вважався негативним.

Визначення чутливості мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів.

Визначення спектра і ступеня стійкості мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів має суттєве значення для тактики хіміотерапії хворих, для контролю ефективності лікування і визначення прогнозу хвороби. Зміна чутливості мікобактерій відмічається до всіх антимікобактеріальних препаратів, але відрізняється за ступенем, частотою і швидкістю появи стійких варіантів. Чутливими до антимікобактеріальних препаратів вважаються ті мікобактерії туберкульозу, на які препарат в концентрації, що досягається в осередку інфекції, чинить бактеріостатичну або бактерицидну дію, незалежно від розташування їх поза- або внутрішньоклітинно.

Залежно від цього критерії чутливості мікобактерій туберкульозу залежать від концентрації медикаментозного препарату в осередку інфекції, величини максимальної терапевтичної дози препарату, його фармакокінетики. Чутливість мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів корелює з мінімальною концентрацією препарату, яка затримує (інгібує) ріст мікобактерій при стандартних умовах дослідження. Поділ мікобактерій туберкульозу на чутливі та стійкі проводили на основі встановлених критеріїв клініко-лабораторних досліджень (табл. 2.8).

**Критерії оцінки медикаментозної стійкості *M. tuberculosis*
на яєчних живильних середовищах, мкг/мл**

Препарати	Метод пропорцій	Метод абсолютних концентрацій
Стрептоміцин	4,0; 8,0	5,0
Ізоніазид	0,1; 0,2; 1,0	1,0
Етіонамід або протіонамід	20,0; 40,0	30,0
Етамбутол	1,0; 2,0; 3,0	5,0
Рифампіцин	20,0; 40,0	20,0
Канаміцин	-	30,0
Піразинамід	1,0; 2,0; 4,0	-
Фторхінолони (ципрофлоксацин)	4,0	10,0
Циклосерин	16,0	16,0
ПАСК	0,5	1,0

Визначення медикаментозної чутливості виділених культур *M. tuberculosis* у вперше виявлених хворих обов'язково проводили до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу, рифампіцину. У випадку появи стійкості до цих препаратів проводився рекомендований тест визначення чутливості до етіонаміду (або протіонаміду), канаміцину і фторхінолонів. У хворих з хронічною формою туберкульозу визначення медикаментозної чутливості *M. tuberculosis* проводили до всіх препаратів з урахуванням попередніх досліджень.

Для визначення чутливості *M. tuberculosis* до антимікобактеріальних препаратів використовували середовище Левенштейна — Йенсена, прийняте як міжнародний стандарт ВООЗ [16].

Принцип методу визначення медикаментозної чутливості полягає у вирощуванні мікобактерій, виділених у хворих, на щільному живильному середовищі, що містить «критичні» концентрації препаратів (критерії резистентності).

Вирощену на щільному живильному середовищі культуру знімали змоченим у стерильному розчині NaCl тампоном, потім тампон вміщували в пробірку з 2,0 мл стерильного розчину 0,9%-го NaCl, змивали культуру в

розчин, попередньо розтираючи по внутрішніх стінках пробірки. Пробірку залишали при кімнатній температурі для осадження крупних часточок культури.

Суспензію культури стандартизували за бактеріальним стандартом каламутності 5 ОД, для чого суспензію (без осаду) обережно, не торкаючись дна пробірки, переносили піпеткою в іншу пробірку і розводили її в 10 разів у ізотонічному розчині NaCl.

У флакони з яєчним живильним середовищем Левенштейна — Йенсена до наповнення додавали розведення антимікобактеріальних препаратів. Розведення препаратів готували, створюючи в середовищі їх «критичні» концентрації. Розрахунки розведення антимікобактеріальних препаратів готували на 50 і 100 мл середовища і після внесення відповідного препарату розливали приблизно по 5,0 мл. Таким чином отримували середовище з препаратом для визначення чутливості відповідно до 10–20 культур мікобактерій. Для розведення всіх препаратів використовували стерильну дистильовану воду.

Живильне середовище з різними концентраціями антимікобактеріальних препаратів розливали в пробірки приблизно по 5,0 мл і в скошеній формі 30 хв витримували при 85 °С в апараті для згортання крові.

Пробірки з приготовленим середовищем з медикаментозними препаратами і одну контрольну пробірку з середовищем без препаратів засівали приготовленою сумішшю культури по 0,2 мл в кожену пробірку. Пробірки вміщували в нахиленому стані в термостат при 37 °С, наступного дня парафінували для запобігання висиханню середовища і ставили вертикально. Посіви оглядали кожного тижня, через 2–3 тиж реєстрували отримані результати. При бідному рості в контролі пробірки залишали ще на тиждень в термостаті, після цього давали остаточну відповідь.

Оцінка результатів: культура вважалася чутливою, якщо в пробірці, яка містить середовище з препаратом, нараховували менше 20 колоній при

суцільному рості в контролі. Тільки за наявності більше 20 колоній культура розцінювалася як стійка до концентрацій препарату в середовищі.

За своєю доступністю, відносною простотою та відтворюваністю метод бактеріоскопії та бактеріологічні дослідження є найбільш прийнятними для лабораторій спеціалізованих лікувально-профілактичних установ України. Однак очевидні їх значні недоліки:

1. Бактеріоскопія є швидким, але мало чутливим і недостатньо специфічним методом, оскільки збудник виявляється лише при наявності більш ніж 10 000 мікобактерій в 1 мл досліджуваного матеріалу. При цьому неможливе диференціювання видів мікобактерій [21].

2. Бактеріологічні методи дослідження є на порядок більш чутливими, однак їхня діагностична цінність багато в чому нівелюється через довготривалість аналізу. Оскільки мікобактерії туберкульозу і більшість збудників мікобактеріозів є такими, що повільно ростуть, відповідь може бути отримана не раніше як через 4–6 тиж і багато в чому є ретроспективною [20]. Розроблені до нинішнього часу і застосовувані за рубежом системи автоматизованого прискореного культивування мікобактерій (ВАСТЕС-960 та інші) забезпечують високоефективну діагностику й ідентифікацію мікобактерій, однак дуже дорогі та недоступні для лабораторій туберкульозних лікарень і диспансерів [78].

Слід сказати і про деякі інші проблеми діагностики захворювань, спричинених мікобактеріями: останнім часом під впливом антибактеріальної терапії нерідко спостерігається трансформація мікобактерій в L-форми, дефектні за клітинною стінкою або взагалі позбавлені її, а також наддрібні форми. Бактеріоскопічні й рутинні бактеріологічні методи непридатні для їх виявлення. Між тим, багато авторів відмічають клінічну значущість L-форм, оскільки вони можуть ще тривалий час виділятися від хворих після закінчення курсів терапії, зберігаючи здатність до зворотної трансформації в нормальні форми. Таким чином, в групі обліку хворих, які не виділяють

мікобактерії, можуть опинитися бактеріовиділювачі L-форм, що являє собою незаперечну епідеміологічну небезпеку [79; 80].

2.3. Молекулярно-генетичні методи, використані для вивчення медикаментозної стійкості мікобактерій туберкульозу

Сьогодні одним із найбільш високоспецифічних, достовірних, швидкісних методів діагностики інфекційних захворювань є генодіагностика методом полімеразної ланцюгової реакції. Численні дані літератури [23; 81; 82] свідчать про високу ефективність цього методу при діагностиці туберкульозу різних форм і локалізацій, а також мікобактеріозів людини. Створено комерційні тест-системи зарубіжного виробництва для діагностики туберкульозу.

У зв'язку з цим для удосконалення методики виявлення *M. tuberculosis* в досліджуваному матеріалі була створена контрольна група хворих, що перебували на лікуванні в Миколаївському обласному протитуберкульозному диспансері в період серпень-вересень 2001 р. Проводили дослідження мокротиння та операційного матеріалу паралельно з традиційними бактеріологічними методами в лабораторії Миколаївського протитуберкульозного диспансеру і методом ПЛР в умовах лабораторії молекулярно-генетичних досліджень ОДМУ.

Проведення реакції здійснювали в спеціальній буферній суміші з певними концентраціями іонів калію, хлору і точним значенням рН. ПЛР — циклічний процес: на першій стадії (денатурації, або плавлення) відбувався розрив водневих зв'язків, що з'єднують дві нитки ДНК, потім — на другій стадії — олігонуклеотидні праймери комплементарно з'єднувались з матричною ДНК (відпал), а на стадії синтезу ДНК-полімераза добудовувала нитку нуклеотидів комплементарно матричній ДНК. При цьому праймер включався до складу щойно синтезованої ділянки нуклеїнової кислоти.

В подальшому відбувалось чергування стадій плавлення, відпалу й синтезу. Після 30–35 циклів ампліфікації в реакційній суміші наявні 2^{30} – 2^{35} щойно синтезованих фрагментів вихідної ДНК. Процес ПЛР-діагностики складався з трьох етапів: виділення ДНК з біологічного матеріалу, ампліфікації ДНК, електрофорезу й обліку отриманих результатів.

При плануванні й обладнанні приміщень для проведення лабораторних досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції застосовували основні принципи організації роботи, викладені в інструкції «Про дотримання протиепідемічного режиму в клініко-діагностичних лабораторіях» від 22.04.1997 р., Одеса.

Пряма експрес-діагностика мікобактерій туберкульозу в клінічних зразках

1. Взяття матеріалу

Взяття матеріалу здійснювали в стерильний скляний посуд. Зберігання біологічного матеріалу допускалося при температурі не вище $+40$ °С протягом доби. Доставляння матеріалу в лабораторію проводили з дотриманням температурного режиму в термосі. Кожен біологічний зразок супроводжувався направленням, в якому зазначалося: прізвище, ім'я, по батькові, стать обстежуваного; вік; діагноз; назва лікувальної установи; прізвище лікаря; найменування матеріалу (мокротиння і т. ін.)

2. Обробка матеріалу, пробопідготовка, виділення ДНК

Однією з найважливіших переваг методу ПЛР є його відносно невисокі вимоги до ступеня очищення ДНК-матриці. У зв'язку з цим використовували найбільш розповсюджені способи виділення ДНК із клінічного матеріалу: лізис матеріалу для руйнування оболонок клітин і їх ядер, сорбція ДНК на іонообмінних смолах або пористих носіях, наступне очищення. Наявність великої кількості слизу, білків, підвищена в'язкість мокротиння

обумовлюють необхідність застосування спеціальних методів обробки матеріалу. З іншої сторони, важливою умовою високоефективної діагностики є максимальна концентрація бактеріальних клітин у мінімальному об'ємі. У зв'язку з цим процедуру виділення ДНК мікобактерій проводили таким чином:

1. Мокротиння або інший біологічний зразок в кількості близько 5 мл вміщували в пластмасову або скляну пробірку об'ємом не менше 15 мл.

2. До зразку додавали рівний об'єм 2 N розчину NaOH і 100 мг ацетилцистеїну.

3. Після ретельного перемішування і розрідження мокротиння до розчину додавали по краплях розчин Tris-HCl, pH=6,8 з індикатором феноловим червоним (розчин оранжевого кольору), контролюючи кислотність суміші. При переході кольору розчину від інтенсивно-рожевого до жовтого додавання розчину припиняли.

4. Для максимальної концентрації мікобактерій використовували метод імуносорбції мікобактерій за допомогою поліклональних антитіл до роду *Mycobacterium*, що дозволяє виділити з суміші бактеріальні клітини. Антитіла сорбували на найдрібніших частинках магнітного порошку заліза. Для цього в підготовлений зразок вміщували магнітний устрій та інкубували на гойдалці протягом однієї години. Магнітний устрій вилучали з пробірки і змивали адсорбовані магнітні частинки 0,5 мл буфера TE в промарковану пробірку «Еппендорф» об'ємом 1,5 мл.

5. Виділення ДНК із мікобактерій здійснювали методом лізису в 2%-му розчині детергенту Тритон X-100 при температурі 95 °C в мікротермостаті протягом 45 хв. Потім вміст пробірки центрифугували при 9000 об/хв протягом 15 хв. Надосадову рідину, що являє собою клітинний лізат із ДНК, використовували як матрицю для ПЛР в кількості 2,5 мкл на реакцію об'ємом 25 мкл.

Постановка реакції ампліфікації ДНК

Для постановки реакції використовували одноразові пластмасові пробірки типу «Еппендорф» об'ємом 0,5 мл. Найкращими за якістю та властивостями теплопровідності є пробірки фірми "QSP" (США).

Необхідну кількість пробірок (по числу зразків плюс по одній пробірці для позитивного й негативного контролів) маркували, в робочий журнал вносили відповідні записи. Тест-системи для постановки реакції та інші реактиви розморожували. Реактиви, які необхідно зберігати при негативних температурах, вміщували в льодяну баню.

Потім реактиви згідно з черговістю, вказаною в описах до тест-систем, вносили в пробірки. При постановці реакції із застосуванням окремих компонентів використовували такий порядок роботи:

1. Розраховували загальний об'єм реакційної суміші, виходячи з кількості зразків. Проводили розрахунки, і в робочий журнал записували необхідну кількість кожного з компонентів реакції.

2. В одну з пробірок за допомогою мікропіпеток вносили розраховані кількості реактивів у такій послідовності:

- воду бідистильовану деіонізовану;
- буфер для ПЛР десятикратний;
- розчин дезоксинуклеотидтрифосфатів;
- при необхідності розчини бичачого сироваткового альбуміну, хлорид магнію;
- суміш прямого і зворотного праймерів для діагностики відповідних видів мікобактерій;
- термостабільну ДНК-полімеразу.

3. За допомогою мікропіпетки суміш ретельно перемішували і вносили в решту пробірок.

4. В кожен пробірку окремим наконечником додавали зразок ДНК, включаючи позитивний і негативний контролі. Як позитивний

використовували зразок ДНК відповідного виду мікобактерій, виділений з чистої культури, як негативний — аналогічну кількість води.

5. В кожен пробірку поверх реакційної суміші нашаровували краплю мінеральної олії, після чого пробірки вміщували в комірки ампліфікатора.

6. Ампліфікація проводилася у відповідності з програмою зміни часу і температури для детекції даного виду збудників.

7. Після ампліфікації пробірки вміщували в штатив і розпочинали наступний етап — електрофорез.

Електрофорез і облік результатів

Облік результатів реакції проводили шляхом електрофорезу продуктів ампліфікації в 1,5%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Гель готували у відповідності з інструкцією до тест-систем для ПЛР-діагностики. В лунки гелю вносили по 10–15 мкл суміші після ампліфікації. Електрофорез проводили при густині струму 5–7 В/см протягом 30–40 хв.

Для обліку результатів гель переглядали в ультрафіолетовому світлі на транслюмінаторі. Результат реакції вважався позитивним за наявності світної смуги оранжевого кольору на рівні смуги позитивного контрольного зразка відповідного виду мікобактерій. За відсутності смуги на доріжці позитивного контролю або за наявності смуг на доріжці негативного контролю результати реакції вважали недійсними, при цьому проводили повторну постановку реакції.

В сучасних тест-системах (Muc-Test, Україна; НПФ «Літех», Росія) для підвищення специфічності діагностики і запобігання хибнопозитивним і хибнонегативним результатам використовуються так звані внутрішні контролю. При цьому результат реакції вважали позитивним тільки за наявності двох смуг — смуги внутрішнього контролю (зазвичай більшої молекулярної маси) і смуги ампліфікованого фрагмента.

Для документування результатів дослідження проводили запис за допомогою відеосистеми, підключеної через спеціальний інтерфейс до

комп'ютера. При цьому результат реакції записували у вигляді графічного файлу і використовували для подальшого аналізу й архівування.

Проведені дослідження дозволили зробити висновок про переваги використання ПЛР для виявлення *M. tuberculosis* в досліджуваному матеріалі: використання для дослідження мінімальних кількостей ДНК у вигляді клітинних лізатів мікобактерій, що різко скорочує витрати праці, часу і матеріалів для аналізу, й висока чутливість методу.

Генотипування

Як було зазначено вище, штами *M. tuberculosis*, циркулюючі на території України, практично не досліджені з позицій молекулярної епідеміології. Нами були проведені дослідження молекулярно-епідеміологічних характеристик штамів мікобактерій, отриманих під час проспективного дослідження, виділених від хворих на туберкульоз в Миколаївській області України.

Для проведення досліджень застосовували метод споліготипування, який є, з одного боку, високовідтворюваним і достовірним, а з другого — який дозволяє працювати з відносно невеликими кількостями ДНК мікобактерій.

Споліготипування здійснювали шляхом ампліфікації всього DR-регіону мікобактеріальної хромосоми з подальшою гібридизацією продуктів ампліфікації з олігонуклеотидними пробами 43 спейсерів, іммобілізованими на мембрані. Ампліфікацію DR-регіону проводили за допомогою біотинмічених праймерів, що дозволило отримати мічені біотином продукти ампліфікації і надалі візуалізувати результати гібридизації. Препарати ДНК були отримані шляхом нагрівання водної суспензії бактеріальних клітин з подальшою депротейнізацією хлороформом. Ампліфікацію фрагменту регіону прямих повторів геному *M.tuberculosis* проводили за допомогою праймерів DRa та DRb, помічених біотином (Isogen, Нідерланди). Реакційна суміш обсягом 25 мкл складалася з 1 мкл препарату ДНК, по 2 мкл

праймеров DRa та DRb, 2 мкл суміші dNTRs (2,5 мМ); 2,5 мкл ПЛР-буферу; 0,5 мкл Tag-полімерази (BioLine, Велика Британія) та 15 мкл очищеної води.

Гібридизацію починали з денатурації продуктів ПЛР у розчині 2x SSPE/0,1% SDS у киплячій водяній бані протягом 10 хвилин. Денатуровані продукти ПЛР гібридизували зі спейсерними ДНК-пробами, імобілізованими на нейлоновій мембрані (Isogen, Нідерланди) у мініблоттері протягом 90 хвилин при температурі +60° С. Після промивки мембрану піддавали обробці (Amersham, США) протягом 1 год., після чого знову двічі промивали у розчині 2x SSPE/0,5% SDS при температурі +42° С. Кінцеву промивку мембрани здійснювали у розчині 2x SSPE при кімнатній температурі. Для візуалізації результатів аналізу використовували хемілюмінесцентне детектування за технологією ECL (Amersham, США), після чого здійснювали експозицію рентгенівської плівки на мембрані. Для подальшої комп'ютерної обробки зображення на плівці сканували та зберігали у вигляді цифрового коду. (Додаток В).

Основними напрямками практичного застосування методів генотипування є внутрішньовидове диференціювання, кластеризація і визначення приналежності циркулюючих штамів мікобактерій до певних сімейств, наприклад, Beijing, Haarlem та ін., що дозволяють прогнозувати розвиток епідемічного процесу і вивчати багато які клінічно важливі властивості штамів, наприклад ступінь стійкості до антибактеріальних препаратів при призначенні схем лікування хворих.

Методи молекулярно-генетического типування мають дуже широкі можливості й можуть (і повинні) бути з успіхом застосовані не тільки в наукових дослідженнях, а й у практичній медицині. В цьому плані першочерговим завданням є збір даних про генотипи штамів *M. tuberculosis*, циркулюючих в різних регіонах України, створення баз даних і їхня інтеграція в міжнародні банки генотипів мікобактерій. Крім того, найважливішою проблемою є розробка і уніфікація методик клініко-діагностичної інтерпретації даних генотипування. На нашу думку, базова

епідеміологічна інформація відносно штамів на території України може бути отримана за допомогою методів споліготипування (для диференціювання штамів сімейства Beijing) і MIRU з використанням, можливо, обмеженої кількості найбільш поліморфних локусів (для ідентифікації інших сімейств штамів і диференціювання всередині сімейства Beijing).

Використання даних молекулярної епідеміології з метою моніторингу епідемічного процесу матиме неабияке важливе значення для боротьби з туберкульозом, особливо в країнах з високими рівнями захворюваності й лікарської стійкості мікобактерій, до яких, на жаль, належить і Україна.

Для виявлення мутацій, асоційованих зі стійкістю до ізоніазиду і рифампіцину, застосовували метод зворотної гібридизації на нейлонових мембранах. ДНК мітили біотином, для візуалізації результатів гібридизації застосовували систему стрептавідин-лужна фосфатаза.

Для отримання препаратів ДНК колонію мікобактерій, зняту з щільного живильного середовища, вміщували в 200 мкл розчину TE, суспендували на вортексі й лізували шляхом нагрівання при 80 °С, проводили депротейнізацію рівним об'ємом хлороформу, після чого охолоджували в льоду. Приготовлений таким чином екстракт ДНК використовувався як матриця для ПЛР.

Для ампліфікації фрагментів генів *rpo B*, *kat G* і *inh A*, в яких найбільш вірогідні мутації, застосовували мультиплексну ПЛР з трьома парами біотинмічених праймерів, фланкуючих відповідні ділянки генів. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл, у тому числі 2 мкл 10-кратного ПЛР-буфера (Bioline, Великобританія), 0,5 од. Taq-полімерази (Bioline, Великобританія), по 0,5 мкл кожного з чотирьох нуклеотидтрифосфатів (2 ммоль, Bioline, Великобританія), по 20 мкмоль кожного з 6 праймерів і 1 мкл препарату ДНК мікобактерій, приготовленого у відповідності з вищеописаним способом. Реакція ампліфікації здійснювалася на ампліфікаторі Perkin Elmer 9700 за такою програмою: 3 хв 95 °С; 30 циклів: 15 с 95 °С; 30 с 65 °С; 60 с 72 °С; 5 хв 72 °С і зберігання при +4 °С. Наявність

ПЛР-продуктів перевіряли шляхом електрофорезу продуктів ампліфікації в 2,0%-му агарозному гелі.

Олігонуклеотидні проби, що відповідають нормальним і мутантним послідовностям вказаних генів, наносили на смужки нейлонової мембрани (Osmonics Inc., USA) у певному порядку (Додаток Г). Після висушування при кімнатній температурі мембрани опромінювали УФ-світлом протягом 1 хв для утворення зшивок між пробами і матеріалом мембрани, промивали в $0,5^x$ розчині SSC і висушували на повітрі. Всього в даному дослідженні нами було використано 10 зондів, шість з яких відповідали нормальним нуклеотидним послідовностям фрагментів гена *pro B*, у яких частіше спостерігаються мутації резистентності до рифампіцину. Два зонди були індикаторами нормальних послідовностей в генах *kat G* і *inh A*, асоційованих з виникненням резистентності до ізоніазиду, і ще два зонди — індикаторами мутацій у вищезазначених генах. Виявлення пурпурного кольору в місцях нормальних зондів свідчило про відсутність мутацій, виявлення кольору в місцях мутантних зондів — про наявність мутацій у відповідних генах, тобто про резистентність досліджуваного штаму до рифампіцину або ізоніазиду.

Гібридизацію продуктів ампліфікації з пробами, нанесеними на мембрани, проводили в пластикових пробірках в розчині 5^x SSPE; 0,5 % SDS при температурі +60 °C протягом 20 хв. Потім мембрани двократно відмивали в розчині $0,4^x$ SSPE, 0,1 % SDS і однократно — в розчині 0,1M трис-0,1M NaCl, pH=7,5 при кімнатній температурі. Після відмивання мембрани інкубували 20 хв в розчині блокуючого реагенту (Roche, USA) з додаванням кон'югата стрептавідин-лужна фосфатаза (BioGenex, USA) в розведенні 1:100. Після двократного промивання в буфері 0,1M трис-0,1M NaCl, pH=7,5 мембрани інкубували в розчині NBT-BCIP 0,075 мг/мл в світлонепроникному контейнері до появи чіткого зображення у вигляді крапок пурпурно-коричневого кольору. Проявлені мембрани промивали водою і висушували при кімнатній температурі.

Обробку результатів дослідження виконували за допомогою методів варіаційної статистики (S.A. Glantz, 1998) за пакетом запропонованих автором програм. Для оцінки достовірності відмінностей в результатах, які виражені в процентах, використовували метод оцінки відмінності між долями (Лакин Д.Ф., 1990).

РОЗДІЛ 3

ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ЛІКАРСЬКОЇ СТІЙКОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ В МИКОЛАЇВСЬКІЙ ОБЛАСТІ В 2000-2005 рр.

3.1. Дані ретроспективного дослідження

Миколаївська область розташована на Південному Сході України і територіально займає 24,6 тис. км², населення становить 1309,9 тис. жителів. Дата утворення — 22 вересня 1937 р. В місті Миколаєві мешкає 512,4 тис. жителів. Географічне положення, унікальні природні умови, розвинута промисловість і пов'язана з цим невелика інтенсивність міграційних процесів населення створили умови для формування популяції мікобактерій туберкульозу, що відрізняється від штамів, виділених від хворих, навіть у сусідній Одеській області.

На фоні зареєстрованої в 1995 р. епідемії туберкульозу в Україні, Миколаївська область характеризується збільшенням захворюваності на туберкульоз з 33,9 випадків на 100 тис. населення в 1990 р. до 110,0 на 100 тис. в 2005 р. [2]. Захворюваність на всі форми туберкульозу в Україні з 2002 по 2005 р. зросла на 11,2 % (з 75,6 на 100 тис. населення в 2002 р. до 110,0 на 100 тис. населення в 2005 р., в Миколаївській області цей показник збільшився в 1,45 разу [2]. Туберкульоз сьогодні розглядається як СНІД-асоційоване захворювання (рис. 3.1). Із 9 млн нових випадків реєстрації захворювання на туберкульоз у світі 10 % захворілих є ВІЛ-інфікованими [2]. Розповсюдження захворювання на туберкульоз у ВІЛ-інфікованих осіб і у хворих на СНІД є істотною проблемою для України. За даними ІФП, на 2005 р. в Україні нараховується 400 тис. ВІЛ-інфікованих людей [2]. Туберкульоз розвивається у 49,5 % хворих на СНІД, причому через рік спостереження помирає 58,0 % хворих. Боротьба з такою патологією дуже складна, оскільки, з однієї сторони, туберкульоз є головною причиною смерті серед людей, які живуть з ВІЛ-інфекцією, з іншої сторони, ВІЛ-інфікування є головним фактором, який сприяє розвитку епідемії туберкульозу в країнах з високим

рівнем розповсюдження ВІЛ-інфекції, до яких належить і Україна. Аналіз результатів лікування хворих на туберкульоз, водночас ВІЛ-інфікованих або хворих на СНІД (контрольна група 2003 р.), показав, що більш як у половини хворих захворювання прогресує на фоні проведення хіміотерапії. Дані про захворюваність на туберкульоз і СНІД в Україні й Миколаївській області, продемонстровані на рис. 3.1, підтверджують цю тенденцію і демонструють асоційований ріст захворюваності на ці інфекції, причому в Миколаївській області ці показники значно перевищують середньостатистичні в Україні (з туберкульозу в 1,3 разу; зі СНІДу — в 5,5 разу), характеризуючи стабільне погіршення епідеміологічної ситуації. Найвищі показники захворюваності на всі форми туберкульозу відмічаються в південних і східних областях України, до яких належить і Миколаївська область.

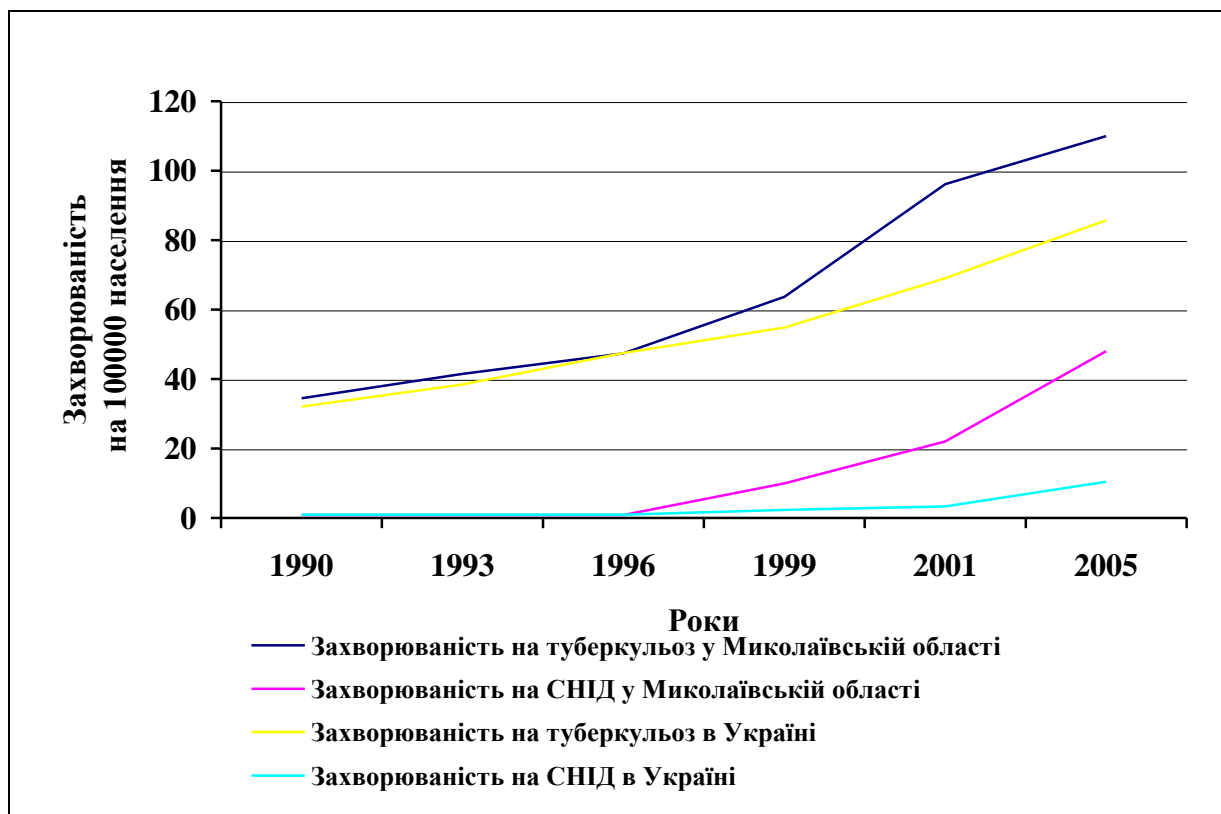


Рис. 3.1 Епідеміологічна ситуація з туберкульозу і СНІДу в Миколаївській області та в Україні

Однією з головних причин цього є розповсюдження штамів мікобактерій, резистентних до лікарських препаратів. На думку академіка М.

I. Перельмана, хіміорезистентний туберкульоз перетворився на самостійну проблему фтизіатрії [62]. Істинний рівень лікарської стійкості МБТ невідомий навіть сьогодні. Експерти ВООЗ і МСБТЗЛ (Міжнародної спілки боротьби з туберкульозом і захворюваннями легенів) докладають величезних зусиль для отримання достовірних даних [3]. Сьогодні спектр використовуваних ефективних протитуберкульозних препаратів обмежений і становить близько 16 [17], із них у Миколаївській області використовуються 10. Резистентність збудника туберкульозу до одного або кількох із них знижує ефективність лікування, при цьому збільшуються час і вартість лікування хворого [16]. До 2005 р. не враховувалися показники резистентності до протитуберкульозних препаратів у звітах протитуберкульозних і місцевих органів охорони здоров'я населення, в результаті чого було неможливо прогнозувати розвиток епідеміологічного процесу і призначення адекватної розвитку резистентності МБТ протитуберкульозної терапії, що є важливим для боротьби з епідемією туберкульозу в нашій країні.

Таким чином, захворюваність на туберкульоз у Миколаївській області характеризується як висока і продовжує збільшуватися, що потребує використання даних профілів і видів медикаментозної резистентності популяції *M. tuberculosis* в Миколаївській області для розробки схем лікування з метою підвищення ефективності лікування хворих на туберкульоз.

Епідеміологічну ситуацію розповсюдження лікарсько-стійких штамів туберкульозу в Миколаївській області демонструють дані табл. 3.1, з якої випливає, що при збільшенні кількості проведених посівів досліджуваного матеріалу (мокротиння хворих) на щільне живильне середовище Левенштейна — Йенсена збільшилася кількість досліджених культур на резистентність до протитуберкульозних препаратів, при цьому значно зріс загальний відсоток резистентних форм — до 28,15 % в 2003 р. і 27,11 % в 2005 р. Кількість виділених резистентних форм МБТ у хронічних і

первинних хворих (табл. 3.1) перевищує середньостатистичні показники в Україні [16]. Картина хіміорезистентного туберкульозу в Україні відсутня [5]. В окремих публікаціях вказується частка виявлених резистентних штамів МБТ в Україні від 14 до 40 %, в країнах СНД до 40–50 %, в західних країнах — 4–5 % [11; 16; 108].

Таблиця 3.1

Динаміка виявлення резистентних форм *M. tuberculosis* в Миколаївській області за період 2000–2005 рр.

Роки		2000	2001	2002	2003	2004	2005	
Всього досліджено культур		2221	1275	2989	3136	2932	3054	
Всього виділено резистентних форм		абс.	444	178	653	884	789	836
		%	19,9	13,9	21,8	28,2	26,9	27,4
У хронічних хворих	всього досліджено культур	абс	762	405	896	1106	1216	1422
	виділено резистентних форм	абс	374	109	510	804	669	711
		%	16,8	8,5	17,1	25,6	22,8	23,3
У первинних хворих	всього досліджено культур	абс	1459	870	2093	2030	1716	2231
	виділено резистентних форм	абс	70	69	143	80	120	125
		%	3,1	5,4	4,7	2,6	4,1	4,1

Дані табл. 3.1 демонструють ріст загальної кількості резистентних штамів МБТ, виділених від хворих на ТБ, за період 2000–2005 рр., і частка їх досягає верхньої межі, зареєстрованої в Україні [21]. Збільшення загальної кількості резистентних штамів, наведене в табл. 3.1, означає, що фактично кожний виділений штам був резистентний хоча б до одного з ПТП I–II ряду.

Таким чином, в ході ретроспективних досліджень крім росту загальної кількості резистентних форм виявлено збільшення кількості резистентних форм ТБ у вперше виявлених хворих. Джерелом інфекції у цієї групи хворих може бути *M. tuberculosis*, що набула ЛС в результаті мутації, хоча частка таких штамів вважається незначною [17], або хворий на туберкульоз, що

виділяє резистентні МБТ. В будь-якому випадку ріст кількості вперше виявлених хворих з 1459 в 2000 р. до 1932 в 2005 р. свідчить про зараження все більшої кількості здорових людей і розширення резервуару туберкульозної інфекції в Миколаївській області України. Кількість хворих з хронічним перебігом туберкульозу менше вперше виявлених хворих, але більш високі рівні порівняно з ними виділення резистентних форм (25,6 і 2,55 % відповідно в 2003 р.) штамів МБТ говорять про неадекватні схеми лікування, використовувані для даної групи хворих, які є джерелами зараження здорових людей.

Ретроспективні дослідження показали, що для тактики хіміотерапії туберкульозу, контролю за ефективністю лікування й визначення прогнозу захворювання істотне значення має визначення спектра і ступеня стійкості мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів.

Критерії чутливості мікобактерій туберкульозу залежать від концентрації медикаментозного препарату в осередку ураження, величини максимальної терапевтичної дози препарату, його фармакокінетики. Чутливість мікобактерій туберкульозу до антимікобактеріальних препаратів корелює з мінімальною концентрацією препарату, інгібуючою ріст мікобактерій при стандартних умовах проведення дослідження [20].

При отриманні позитивних результатів корегувалася схема лікування введенням додатково до призначених S, H, R, Z препаратів другого ряду — канаміцину при виявленні стрептоміцин-резистентних форм і етіонаміду — при виявленні ізоніазид-резистентних штамів МБТ.

Критерієм вторинної стійкості були позитивні результати дослідження резистентності досліджуваних культур хворих, які раніше отримували протитуберкульозні препарати й надійшли в Миколаївський обласний протитуберкульозний диспансер для лікування при погіршенні клініко-рентгенологічних показників; таким хворим додатково до призначених двох-трьох препаратів із K, H, R, E, Et, до яких раніше діагностувалася чутливість МБТ, призначали препарат з групи фторхінолонів.

В результаті проведених ретроспективних досліджень були отримані дані, які характеризують поширеність різних штамів МБТ, виділених від хворих в Миколаївській області за період 2000–2005 рр. Характеризувалися рівні первинної і набутої стійкості МБТ до протитуберкульозних препаратів. Резистентність МБТ аналізувалася до кількості ПТП, комбінацій ПТП, до окремих ПТП у первинних і хронічних хворих, роздільно у хворих на туберкульоз жителів м. Миколаєва і Миколаївської області, що має значення в прогнозуванні епідеміологічної ситуації в Миколаївській області в цілому. Таким чином, в область аналізу потрапили чутливі штами і резистентні форми МБТ; зрозуміло, що проаналізувати абацитарні форми туберкульозу, які становлять високий відсоток загальної кількості хворих на туберкульоз в Миколаївській області України (39,7 % в контрольній групі хворих 2003 р.), можна було тільки в кількісному аспекті (табл. 3.2). До сьогодні залишається неясність щодо епідеміологічної небезпеки хворих на туберкульоз, у яких бактеріовиділення не було підтверджено ані при посіві, ані при бактеріоскопії [25].

Хворих на туберкульоз, в яких не виділений збудник захворювання, відносять за сучасною класифікацією до окремої групи і діагноз туберкульоз ґрунтується у цих хворих лише за даними клінічних та рентгенологічних обстежень [16]. Абацитарні форми туберкульозу виявляються як в групі первинних, так і в групі хронічних хворих на це захворювання. Безсумнівно, що ця група хворих вносить значний вклад в епідеміологічну ситуацію з туберкульозу в Миколаївській області України і становить інтерес в питаннях розробки більш чутливих методів діагностики туберкульозної інфекції, ніж бактеріоскопічні і бактеріологічні, які використовуються на даному етапі боротьби з туберкульозом в лікувальних закладах, у томі числі і в НОПТД.

Таблиця 3.2

**Захворюваність на активний туберкульоз органів дихання в м.
Миколаєві в період 1965–2001 рр. (за 37 років)**

Роки	Захворюваність на тbc органів дихання (показник на 100 тис.)	Захворюваність на бацилярні форми тbc (показник на 100 тис.)	%
1965	94,4	11,9	10,4
1966	86,1	18,2	21,2
1967	84,8	24,7	29,1
1968	83,3	15,3	18,4
1969	65,7	18,5	28,3
1970	66,6	16,1	24,2
1971	59,1	13,9	23,6
1972	51,1	13,2	26,0
1973	47,01	16,0	34,1
1974	61,9	24,1	39,0
1975	48,5	18,0	37,1
1976	47,8	17,6	36,8
1977	32,1	14,1	44,0
1978	50,2	18,5	36,7
1979	43,4	14,0	32,4
1980	38,6	12,6	32,5
1981	38,4	15,1	39,3
1982	42,3	18,2	43,1
1983	42,7	19,3	45,2
1984	39,0	20,4	52,4
1985	46,5	23,4	50,2
1986	34,9	14,2	40,7
1987	37,4	17,4	46,6
1988	30,4	14,2	46,8
1989	27,3	11,9	43,4
1990	26,7	11,4	42,8
1991	27,0	14,6	54,2
1992	36,1	15,0	41,7
1993	43,8	23,1	52,8
1994	45,6	25,8	56,5
1995	43,6	21,3	48,9
1996	49,4	28,3	57,3
1997	44,1	23,4	53,2
1998	70,2	37,8	53,8
1999	71,1	32,1	46,7
2000	82,6	34,9	34,6
2001	96,0	28,6	29,8

Із даних табл. 3.2 випливає, що з 1965 по 2001 рр. абацитарні форми виявлено у значної частини контингенту хворих на туберкульоз — від 10,4 до 57,3 %.

Поширеність резистентних штамів МБТ, виділених у хронічних хворих на туберкульоз - жителів м. Миколаєва, за кількістю ПТП характеризують дані рис. 3.2.

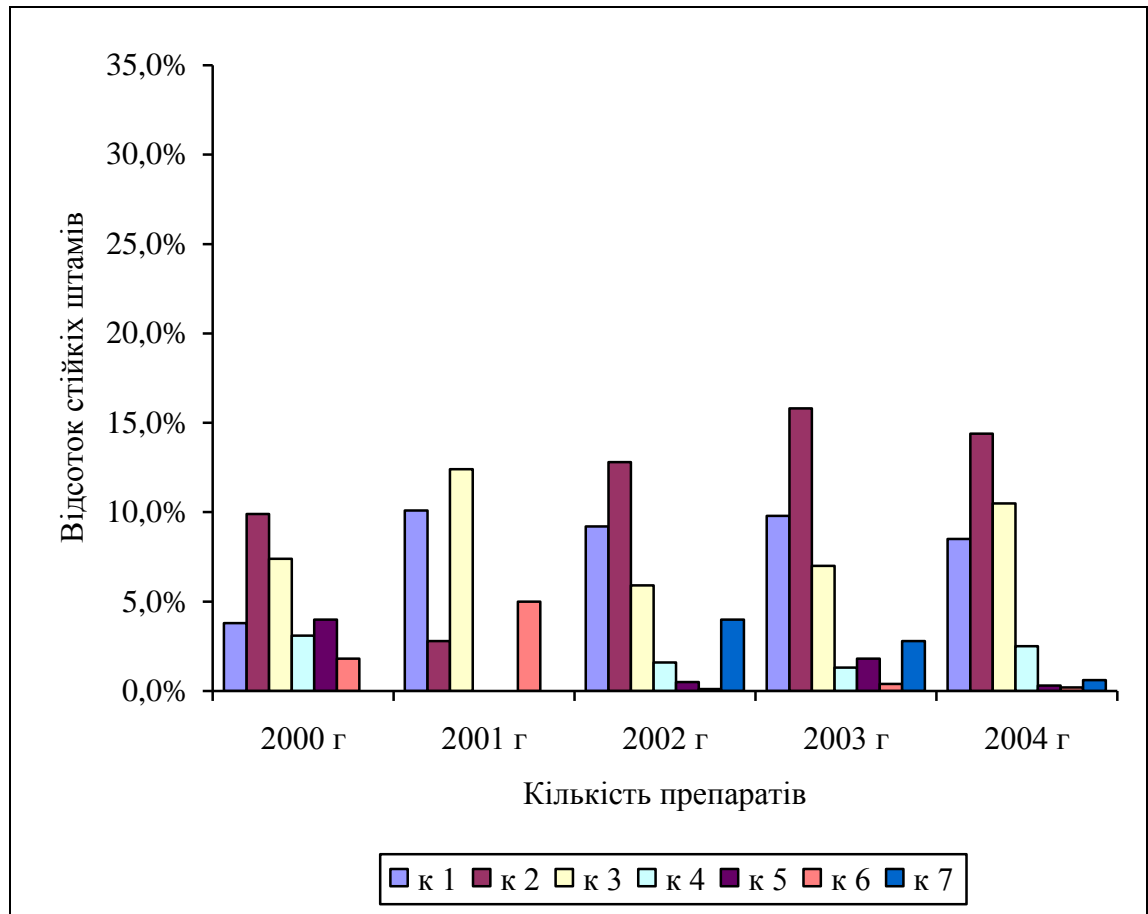


Рис. 3.2 Резистентні штами МБТ (за кількістю препаратів) - м. Миколаїв — хронічні хворі

Поширеність резистентних штамів МБТ, виділених у первинних хворих на туберкульоз - жителів м. Миколаєва, за кількістю ПТП характеризують дані рис. 3.3. Продемонстровані показники рівнів монорезистентних і

полірезистентних штамів значно відрізняються від рівнів різних видів стійких штамів в групі хронічних хворих на туберкульоз.

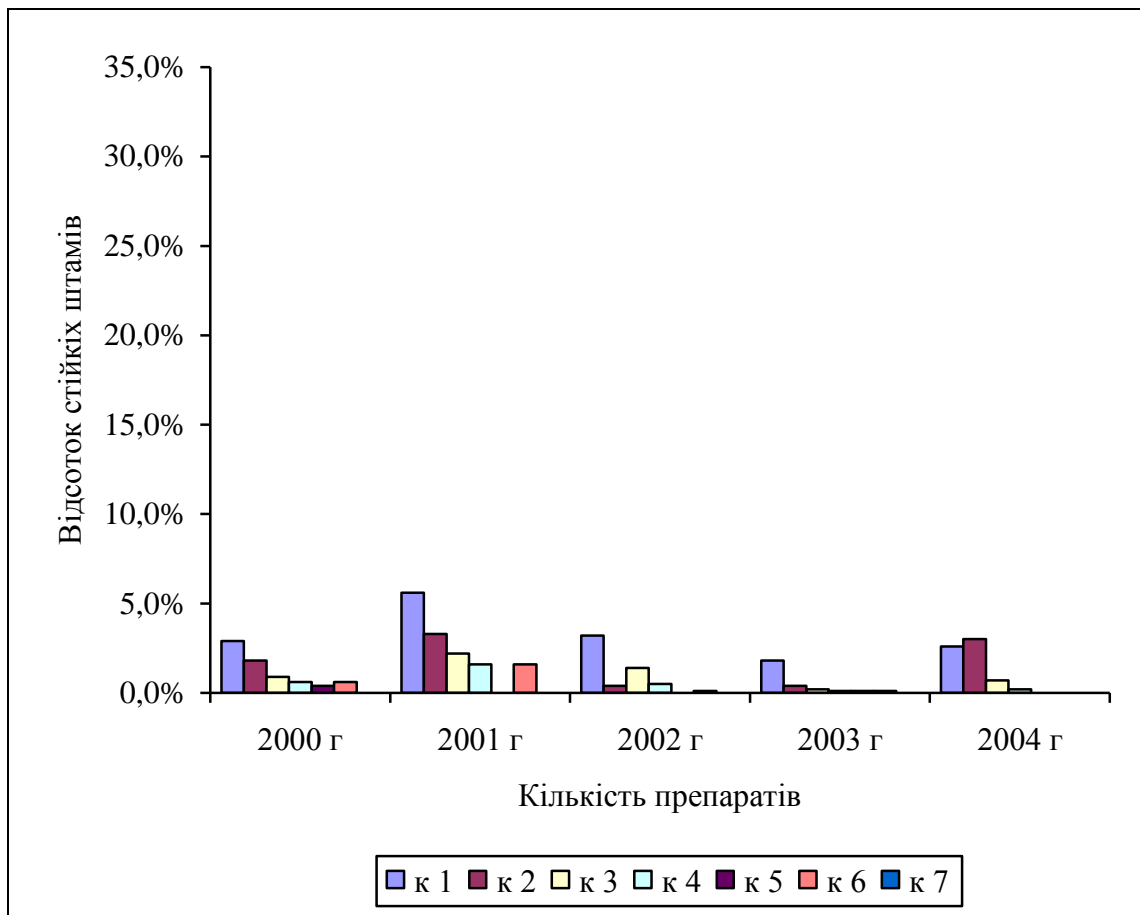


Рис. 3.3 Резистентні штами МБТ (за кількістю препаратів) — м.

Миколаїв — первинні хворі

Монорезистентність можна розглядати як історичний етап прояви властивості *M. tuberculosis* набувати стійкості до антимікобактеріальних препаратів, оскільки з появою ПТП лікування певний час проводилося одним препаратом і, мабуть, закріпилося в спадковому матеріалі МБТ як одна з властивостей. Незважаючи на те, що нині терапія проводиться кількома (мінімум трьома) препаратами, монорезистентні штами продовжують виділятися і навіть селективно змінюватися, як у видовому, так і в кількісному відношенні. За наявними в літературі даними, монорезистентність у світі виявляється рідше, ніж полірезистентність, так, до

ізоніазиду діагностується 47,8 % монорезистентних штамів. Штами МБТ, виділені від хворих в Миколаївській області, мають свої особливості: протягом 2000–2005 рр. монорезистентність переважала над полірезистентністю; серед монорезистентних переважали штами, стійкі до стрептоміцину (Додаток Д). Протягом аналізованого періоду з'явилися монорезистентні штами до етіонаміду, що раніше не виявлялися в Миколаївській області.

Окремо проаналізовано моно-, полірезистентність штамів МБТ виділених від хворих — жителів Миколаївської області.

Поширеність резистентних штамів МБТ, виділених у первинних хворих на туберкульоз - жителів Миколаївській області, за кількістю ПТП характеризують дані рис. 3.4.

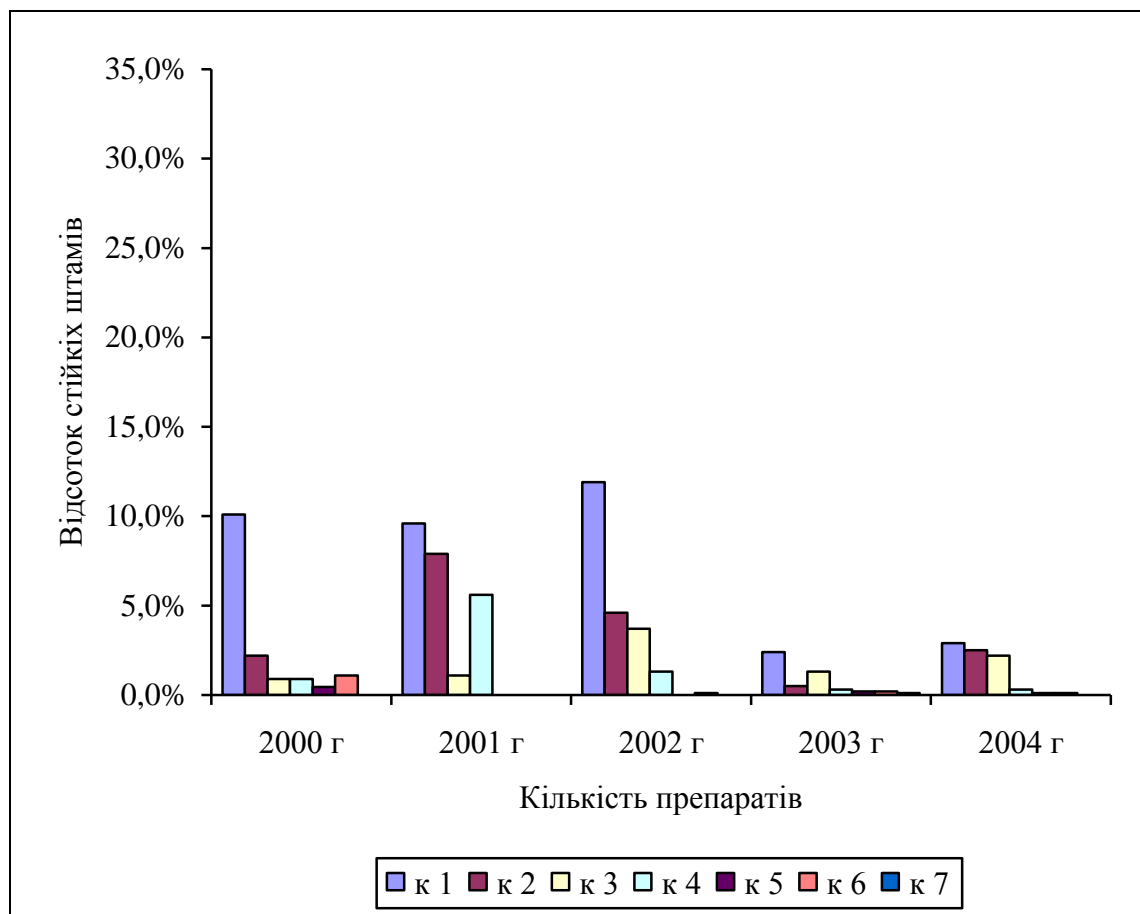


Рис. 3.4 Резистентні штами МБТ (за кількістю препаратів) — Миколаївська область — первинні хворі

Поширеність резистентних штамів МБТ, виділених у хронічних хворих на туберкульоз - жителів Миколаївській області, за кількістю ПТП характеризують дані рис. 3.5.

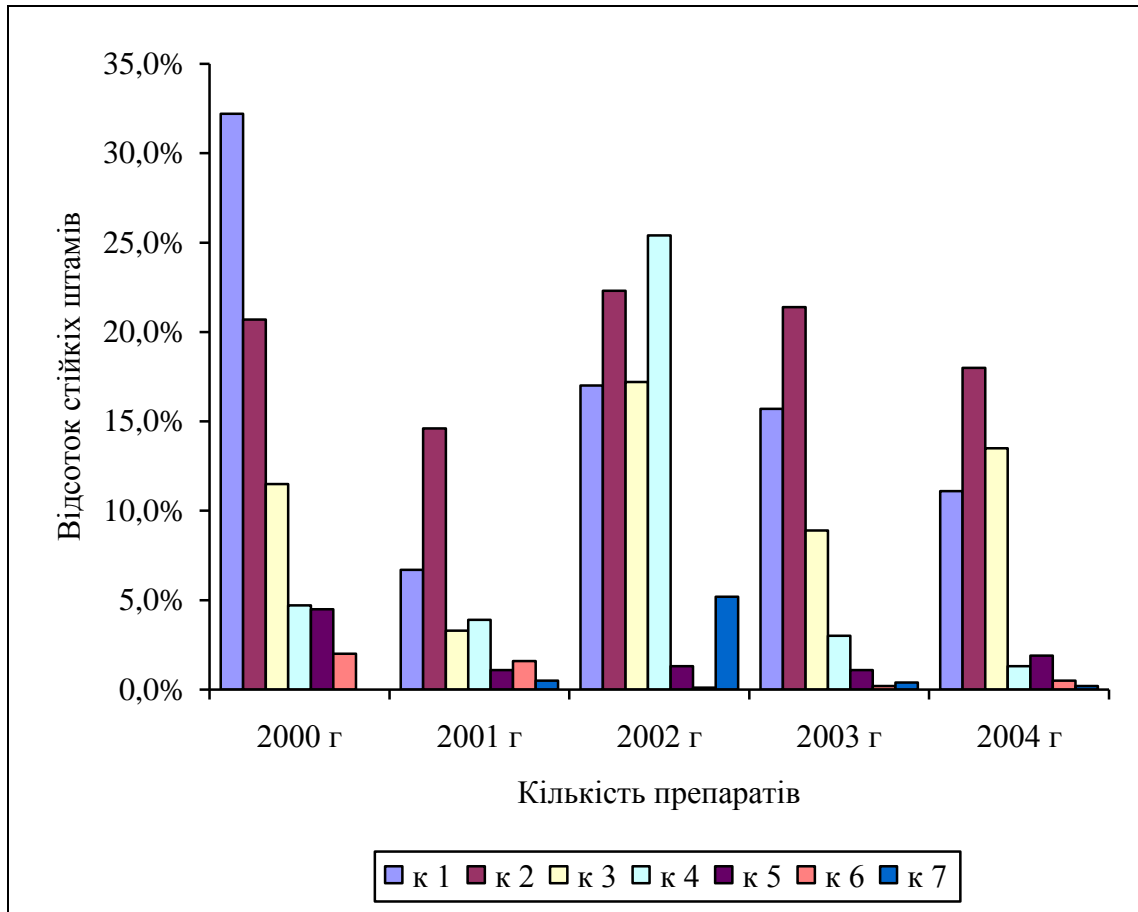


Рис. 3.5 Резистентні штами МБТ (за кількістю препаратів)
(Миколаївська область — хронічні хворі)

Зміни виділених штамів МБТ у Миколаївській області наочно підтверджують індукованість мутацій в генах МБТ проведеною хіміотерапією. Збої в надходженні, недостатнє забезпечення ПТП призвели до появи таких різновидів монорезистентних штамів МБТ, що відрізняються від виділених від хворих — жителів міста Миколаєва. Та сама тенденція спостерігалася й у відмінностях монорезистентних штамів, що викликають туберкульоз у первинних і хронічних хворих (див. рис. 3.6–3.9).

Аналіз рівнів моно- і полірезистентних штамів популяції МБТ у Миколаївській області виявив високий рівень монорезистентних штамів по всіх групах хворих, крім хворих з хронічним перебігом туберкульозу (Додаткі Д-Н).

Протягом досліджуваного періоду спостерігалася тенденція до зниження рівня монорезистентних штамів на фоні проведеної хіміотерапії й збільшення ПТП, до яких одночасно стійкий виділений штам — від 1 до 14 ПТП в 2003р.

На думку академіка Ю. І. Фещенка, полірезистентність — це монорезистентність, піднесена до степеня, що говорить про значення даних штамів *M. tuberculosis* в погіршанні епідеміологічної ситуації з туберкульозу в Миколаївській області.

Узагальнюючи отримані результати, можна констатувати: монорезистентність характерна менш як для 50 % резистентних штамів МБТ, тобто більша кількість штамів *M. tuberculosis* популяції в Миколаївській області стійкі до 2 і більше ПТП. Переважну кількість різновидів полірезистентних штамів виявлено в групі хронічних хворих і хворих — жителів області, що пов'язано з використанням неадекватних рівням резистентності МБТ схем лікування.

3.2. Первинна і набута стійкість мікобактерій до препаратів I і окремих препаратів II ряду

У зв'язку з тим, що в сучасній епідеміологічній ситуації з туберкульозу набуває значення не тільки визначення ЛС, а й ступеня медикаментозної резистентності [98], було проаналізовано розвиток резистентності МБТ до використовуваних антимікобактеріальних препаратів. Проведені ретроспективні дослідження продемонстрували динаміку зміни первинної і набутої стійкості *M. tuberculosis* до препаратів I ряду, які є основою сучасних схем хіміотерапії туберкульозу, і окремих препаратів II ряду.

Аналіз кількості резистентних штамів МБТ до окремих препаратів першого і деяких препаратів другого ряду у первинних хворих на туберкульоз - жителів м. Миколаєва представлено на рис. 3.6.

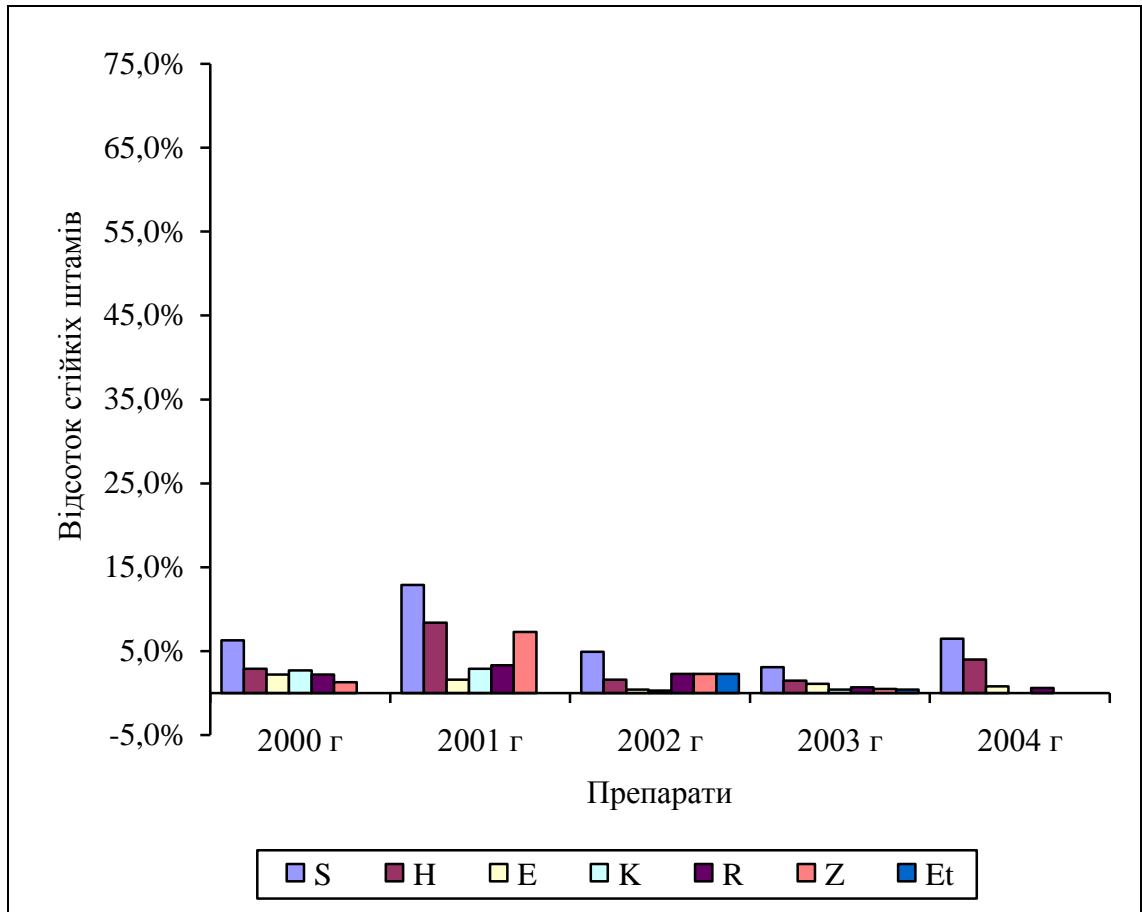


Рис. 3.6 Розвиток резистентності до препаратів першого ряду і окремих препаратів другого ряду (м. Миколаїв — первинні хворі)

Проаналізований рівень виявлених штамів мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів першого та другого рядів в групі первинних хворих жителів міста Миколаєва свідчить, що епідеміологічески значимими являються резистентні штамі МБТ до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу. Доля резистентних штамів МБТ до стрептоміцину змінювалась від 12% в 2001 році до 3% в 2003; до ізоніазиду від 10% в 2001 до 2% 2002; до етіонаміду від 7% в 2002 до 0% в 2004. Первинні хворі на туберкульоз, які

потрапили в досліджувану групу, були інфіцировані резистентними штамми МБТ до цих препаратів. В даній групі хворих на туберкульоз порівняльно з останніми спостерігаються найменші показники рівнів стійкості виділених штамів МБТ до препаратів першого та другого рядів, які використовують для лікування первинних хворих в НОПТД. Рівень виявлених резистентних штамів МБТ до ПТП другого ряду був невисоким.

Аналіз кількості резистентних штамів МБТ до окремих препаратів першого і деяких препаратів другого ряду у хронічних хворих на туберкульоз - жителів м. Миколаєва представлено на рис. 3.7.

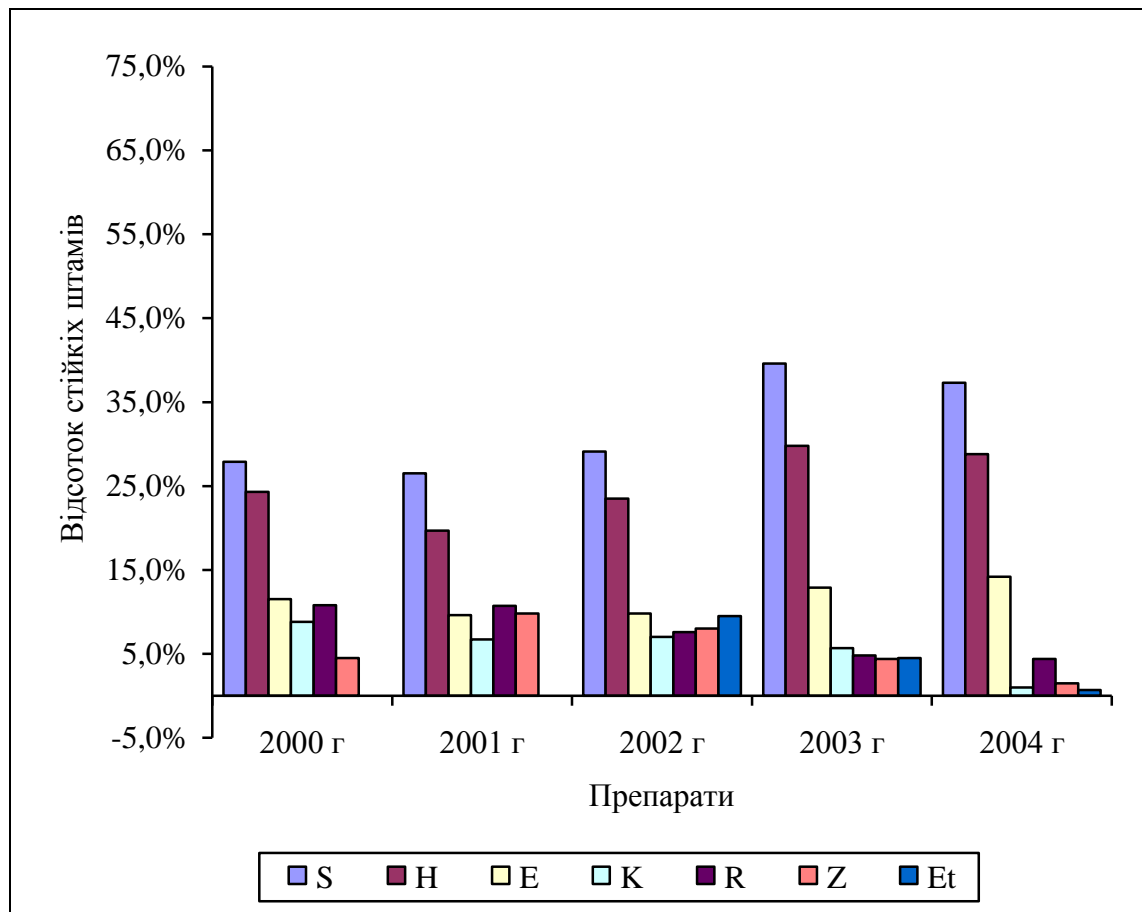


Рис. 3.7 Розвиток резистентності до препаратів першого ряду і окремих препаратів другого ряду (м. Миколаїв — хронічні хворі)

Окремо проаналізовано дані про виділені резистентні штами мікобактерій туберкульозу до окремих протитуберкульозних препаратів I ряду для хворих — жителів Миколаївської області.

Аналіз кількості резистентних штамів МБТ до окремих препаратів першого і деяких препаратів другого ряду у первинних хворих на туберкульоз - жителів Миколаївської області представлено на рис. 3.8.

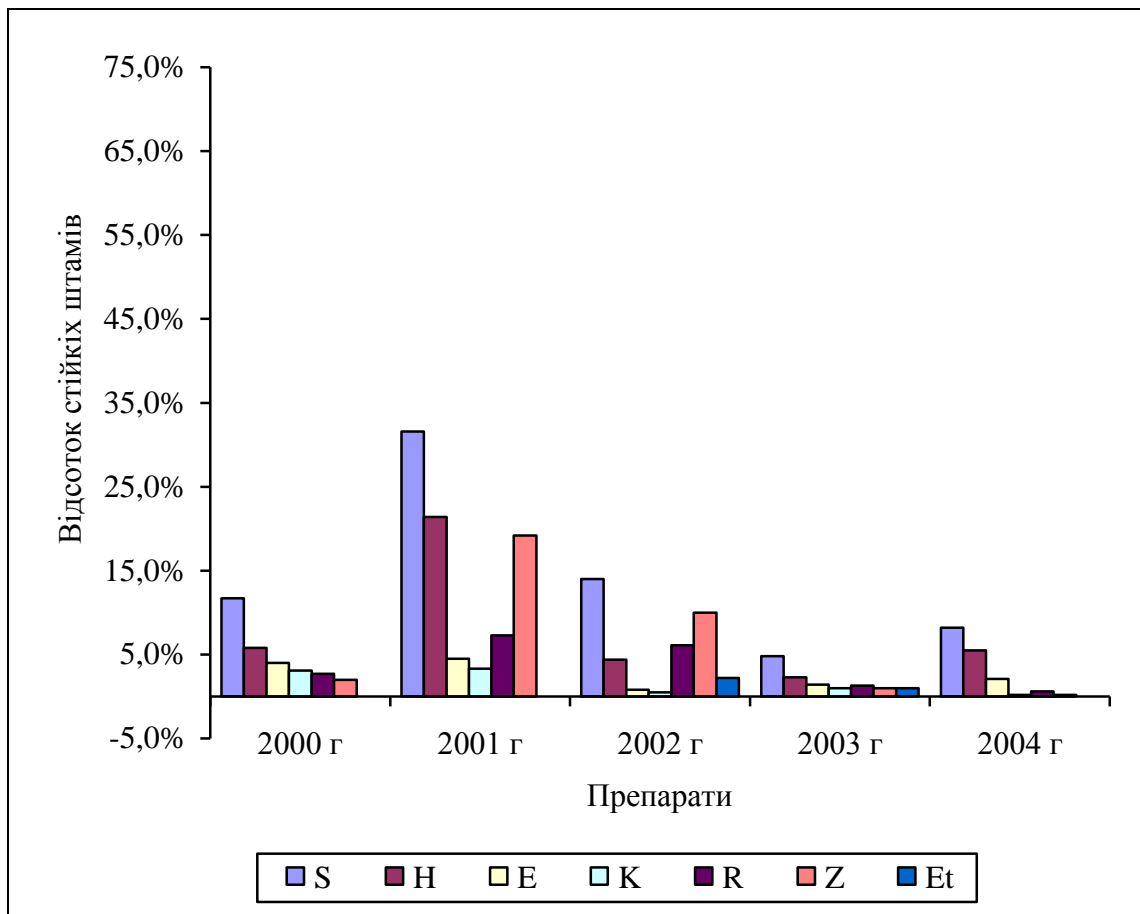


Рис. 3.8 Розвиток резистентності до препаратів першого ряду і окремих препаратів другого ряду (Миколаївська область — первинні хворі)

Аналіз показав, що розвиток стійких штамів при лікуванні хворих цієї групи переважає ці показники, ніж в групі хворих на туберкульоз - жителів м.Миколаєва.

Проаналізовані данні за 5 років свідчать, що за досліджуваний період від первинних хворих на туберкульоз жителів Миколаївській області були

виділені резистентні штами мікобактерій туберкульозу до усіх протитуберкульозних препаратів першого та другого рядів, які використовують в схемах лікування цієї групи хворих. Найвищими були показники виділення стійких штамів МБТ до стрептоміцину.

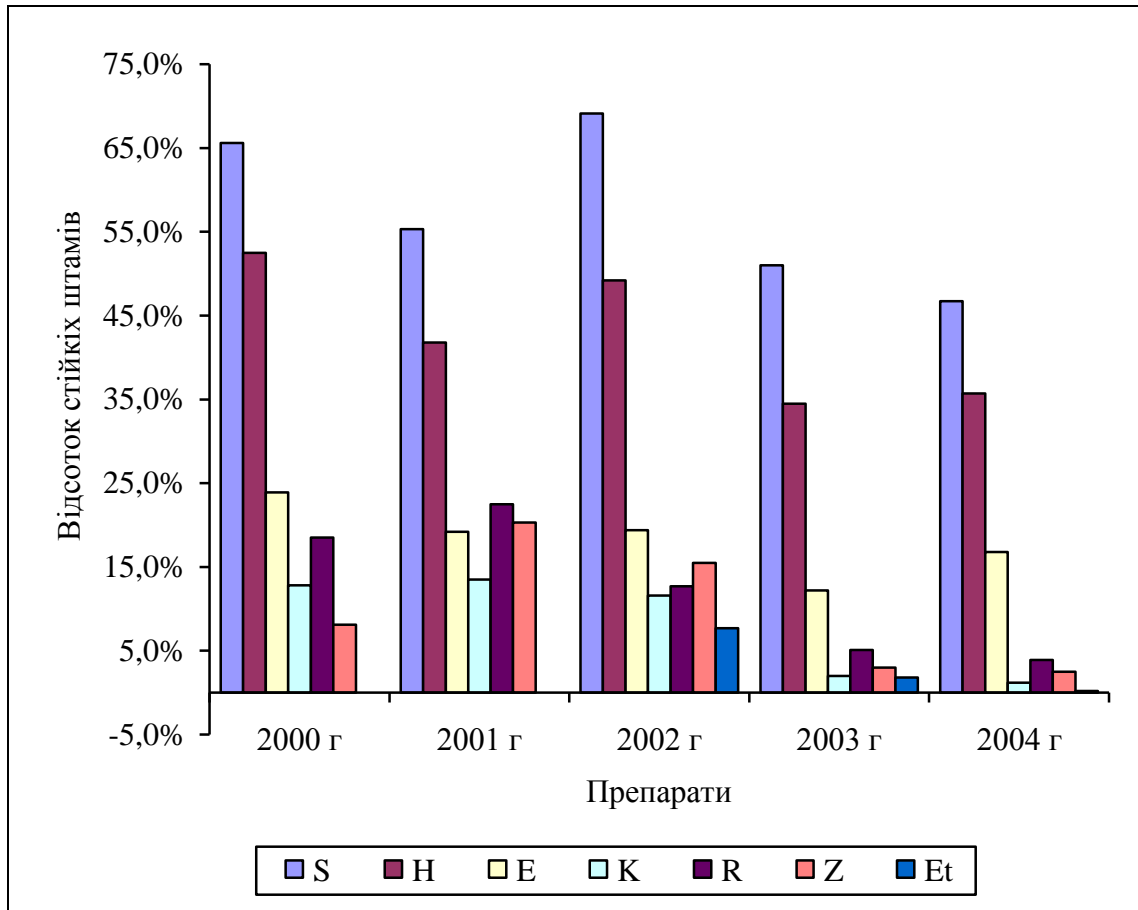


Рис. 3.9 Розвиток резистентності до препаратів першого ряду і окремих препаратів другого ряду (Миколаївська обл. — хронічні хворі)

Дані ретроспективного дослідження за 2000–2005 рр. свідчать про збільшення росту культур, стійких до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу, зменшення росту культур, стійких до канаміцину, певну кількість стійких штамів до рифампіцину, що зберігається, кількість штамів, стійких до піразинаміду, що варіює, наявність стійких штамів к етіонаміду (рис. 3.6–3.9).

Узагальнюючи отримані дані, було виявлено тенденції збільшення росту ЛС штамів МБТ до стрептоміцину в групі первинних хворих — жителів м.

Миколаєва з 28 в 2000 р. до 52 в 2004 р., в групі хворих — жителів Миколаївської області — з 52 до 94; до рифампіцину в 2,5 разу; етіонаміду — в 5,1 разу. Ріст кількості резистентних штамів МБТ в групі хронічних хворих, які представляють вторинну резистентність, перевищує первинну до Н, Et, К в 26,2 разу; 48,3; 43,5 разу відповідно. З 2000 по 2004 рр. спостерігався ріст вторинної резистентності до всіх ПТП, до ізоніазиду збільшився на 20 %. Найвищі рівні резистентності до ПТП I ряду спостерігалися в групі хронічних хворих і хворих — жителів Миколаївської області, що пов'язано з відсутністю рекомендацій використання характеристики профілів медикаментозної стійкості штамів МБТ в популяції Миколаївської області при призначенні комбінацій ПТП у схемах лікування хворих на ТБ, оскільки вид резистентності залежить від тривалості застосування ПТП, традицій проведення терапії в даному регіоні. Про практичне значення визначення рівнів резистентності МБТ свідчать рекомендації про основні принципи лікування хворих на хіміорезистентний туберкульоз, в яких зазначено, що у випадку відсутності своєчасних відомостей про ЛЧ до призначених ПТП можна орієнтуватися на частоту розповсюдження резистентних штамів до тих чи інших препаратів у регіоні проживання хворого.

Мультирезистентність МБТ по суті є різновидом полірезистентності, но внаслідок великої епідеміологічної значущості виділена в особливу категорію. Поява ЛС штамів МБТ до двох найбільш ефективних ПТП — ізоніазиду і рифампіцину — в сучасних схемах лікування ТБ є поганою прогностичною ознакою, оскільки веде до зниження ефективності хіміотерапії туберкульозу, що проводиться, і, як наслідок, прогресування туберкульозного процесу і у великому відсотку — до летального кінця.

Мультирезистентність, за даними ВООЗ, варіює у первинних хворих від 0 % в Кенії до 14 % у Латвії, середній показник — 1,4 %, в Україні цей показник дорівнює 14,9 % [2]. Частка MDR штамів МБТ, виділених від хворих з хронічним перебігом туберкульозного процесу, становить 0 % в Кенії і досягає 54 % в Латвії [108-113], в Росії цей показник становить 68–75

%, причому у 60 % даної групи хворих діагностується і полірезистентність [111], в Україні вона становить від 45 до 65 % (в 3,6 разу вище даних про MDR, наведених ВООЗ, у світі) [2; 74]. Використовуючи наведені порівняльні дані, можна констатувати, що рівень мультирезистентних штамів в популяції МБТ Миколаївської області невисокий, але насторожує ріст загальної кількості MDR штамів з 9,8 % в 2000 р. до 19,5 % в 2004 р. і стабільний ріст кількості даної форми збудника ТБ у групах первинних і хронічних хворих [112].

Кількість мультирезистентних виділених штамів МБТ показано в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

**Розвиток мультирезистентності збудника туберкульозу
протягом 2000–2004 рр.**

Рік	Кількість виділених мультирезистентних штамів, %			RR
	загаль- на	у первин- них хво- рих	у хроніч- них хво- рих	
2000	9,8	1,4	8,4	6,03 (95% CI 4,14-8,78)
2001	9,3	3,1	6,3	2,56 (95% CI 1,79-36,8)
2002	14,6	2,3	12,3	5,24 (95% CI 4,08-6,74)
2003	19,6	1,3	18,3	14,0 (95% CI 10,26-19,11)
2004	19,5	2,6	16,9	6,63 (95% CI 5,23-8,40)

Таким чином, ситуація з мультирезистентним туберкульозом, що розвивається в Миколаївській області, потребує постійного контролю з використанням сучасних молекулярно-генетичних методів діагностики MDR штамів МБТ і своєчасного призначення адекватних схем лікування ТБ.

У зв'язку з тим, що за останні 30 лет не було створено жодного нового ПТП і до 2006 р не було це заплановано [2], фармакологи, крім вивчення антимікобактеріальної активності антибіотиків широкого спектра дії, вивчають найефективніші комбінації вже використовуваних ПТП, тому значний інтерес являють дані про комбінації ПТП, до яких формувалися стійкі штами МБТ, виділені у хворих на туберкульоз в Миколаївській області України протягом 2000–2005 рр. На фоні росту кількості резистентних

штамів змінювалися комбінації ПТП, до яких водночас була стійка виділена культура, особливо в групі хворих, які раніше отримували антимікобактеріальну терапію (Додаток Д).

Отримані дані підтверджують, що хіміотерапія, яка проводилася, формує напрямок розвитку властивості мікобактерій туберкульозу бути стійкими до дії ПТП. В умовах використання в терапії ТБ обмеженої кількості ефективних антимікобактеріальних препаратів, неможливості проведення монотерапії, унікальної здатності збудника туберкульозу протистояти дії всіх ПТП в розроблюваних фармакологами для використання в лікуванні комбінаціях ПТП повинні враховуватися такі явища, як синергізм, антагонізм препаратів, їхня фармакокінетика. Так, одним з принципів фармакотерапії ТБ є заміна препарату I ряду, до якого розвинулася ЛС, препаратом II ряду. Запроваджена ВООЗ спроба використати універсальну схему лікування хворих в режимі DOTS [4; 28; 110] не принесла бажаного результату, при розробці нової стратегії боротьби з туберкульозом "Stop TB" робляться спроби її скоригувати. Вітчизняні фармакологи продовжують дослідження в напрямку індивідуалізації схем лікування [17].

Отримані в ході ретроспективних досліджень протягом 5 років дані про появу ЛС штамів МБТ свідчать про надзвичайне різноманіття профілів медикаментозної резистентності штамів, циркулюючих на території регіону. В ході проспективних досліджень (травень–липень 2003 р.) найбільшу кількість (189) штамів до комбінації H+S виділено в групі хронічних хворих — жителів Миколаївської області (Додаток Д). Різноманітні поодинокі штами були стійкі як до одного, так і до кількох ПТП. Протягом досліджуваного періоду спостерігалися такі тенденції в розвитку резистентності збудника туберкульозу: збільшилася кількість ПТП, до яких водночас виділений штам був стійким (от 2 до 14); виділялися резистентні штами до ПТП, які широко не використовуються в терапії туберкульозу в Миколаївській області (Pas, циклосерин, амікацин, кларитроміцин);

збільшилася кількість різновидів комбінацій ПТП, до яких був резистентний виділений штам (до 29 у групі хронічних хворих — жителів Миколаївської області); більше різноманіття резистентних штамів спостерігалось в групах хронічних хворих і жителів Миколаївської області. Даних для порівняння отриманих результатів у літературі не відмічено, виявлена картина хіміорезистентності штамів МБТ характеризує високий потенціал збудників туберкульозу в Миколаївській області і тенденції, що формуються в розвитку популяції МБТ на фоні проведення антимікобактеріальної терапії. Таким чином, отримані профілі і рівні резистентності МБТ розкривають напрямки розвитку стійкості *M. tuberculosis* до ПТП.

3.3. Порівняльна характеристика ефективності, чутливості й специфічності бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів дослідження

Індивідуалізація хіміотерапії в умовах погіршення епідеміологічної ситуації з ТБ, що не припиняється, потребує своєчасного визначення чутливості МБТ до ПТП. З метою удосконалення методів діагностики резистентних штамів мікобактерій туберкульозу в Миколаївській області проводилося паралельне застосування традиційних методів, рекомендованих Наказом № 45 от 06.02.2002 р. на базі референс-лабораторії Миколаївського протитуберкульозного диспансеру і молекулярно-генетичних методів на базі Референс-лабораторії Лондонського центру молекулярно-генетических досліджень. Отримані дані дозволяють зробити висновок про розбіжність даних, отриманих при проведенні рекомендованих для практичної охорони здоров'я України бактеріологічних методів визначення резистентності до ПТП виділених штамів з отриманими даними молекулярно-генетичного аналізу. Всього в контрольній групі хворих бактеріологічними методами було виявлено 15 резистентних форм, що становило 10,2 %, а молекулярно-генетичними методами — 29 (19,8 %). Так, із отриманих результатів

визначення резистентності до ПТП у 26 випадках спостерігається невідповідність результатів діагностики виявлення резистентних штамів різними методами (рис. 3.10).

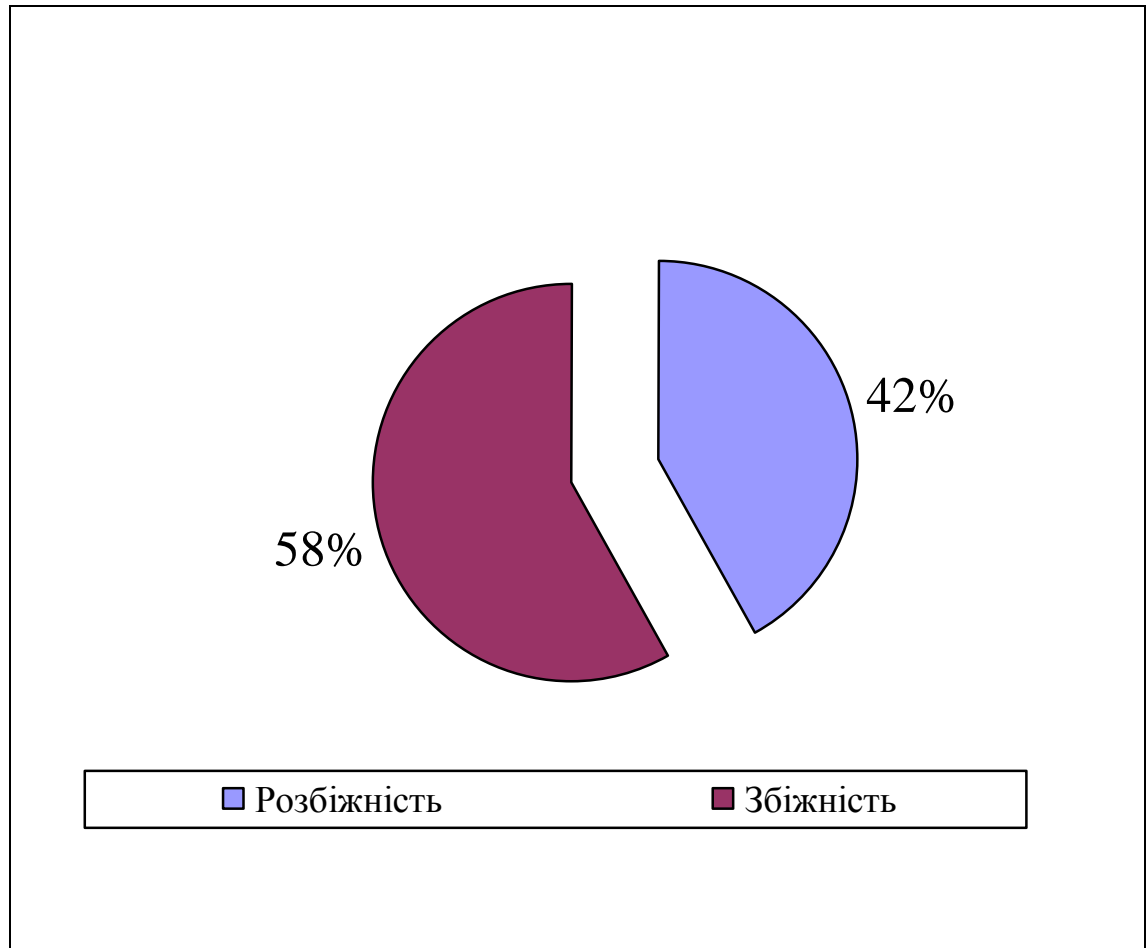


Рис. 3.10 Розбіжність результатів визначення резистентності до протитуберкульозних препаратів по результатам бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів.

Це особливо несприятливо для епідеміологічного прогнозу розповсюдження штамів, резистентних до H і R, які є показниками мультирезистентного туберкульозу, що дає високий рівень переходу туберкульозу в хронічну форму і спричинює летальний кінець (рис. 3.11).

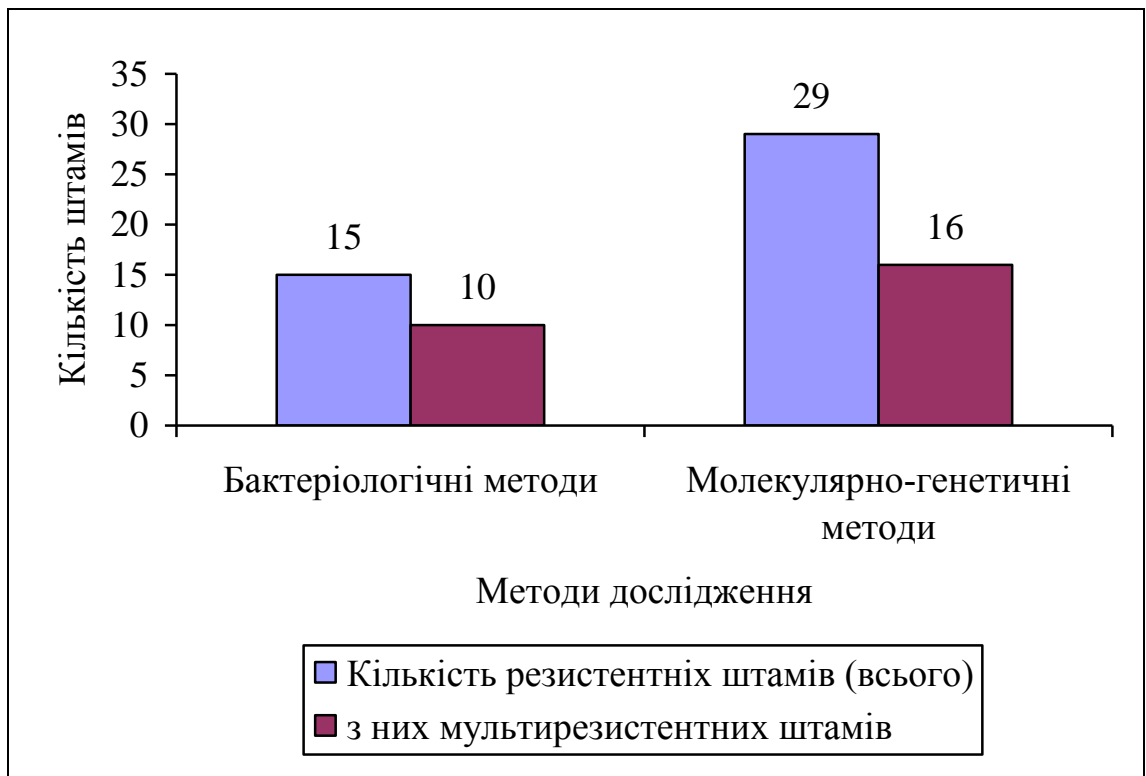


Рис. 3.11 Питома вага мультирезистентних штамів, які спричиняють перехід захворювання на туберкульоз у хронічну форму і летальний кінець (контрольна група хворих)

За результатами бактеріологічних досліджень із 15 виявлених резистентних форм 10 були мультирезистентними; за даними ж, отриманими при молекулярно-генетичних дослідженнях, із 29 резистентних форм 16 були стійкими до H, R. Розбіжність становила 42 %. Серед виявлених 26 випадків розбіжності результатів бактеріологічних і молекулярно-генетичних досліджень в 9 (34,6 %) випадках спостерігався перехід захворювання в хронічну форму, при цьому за даними бактеріологічних досліджень діагностувалася чутливість штамів до протитуберкульозних препаратів, а результати молекулярно-генетичного аналізу свідчили про резистентність досліджуваних штамів до протитуберкульозних препаратів. У 9 (34,6 %) випадках хворі одужали: при негативних результатах бактеріологічних досліджень — у 2 випадках; при результатах, що характеризують досліджувані штами як чутливі, — в 6 випадках, в 1 випадку штам

характеризувався як резистентний до стрептоміцину. Молекулярно-генетичні дослідження показали при цьому наявність стійкості до протитуберкульозних препаратів у 8 випадках (штам, резистентний до стрептоміцину, виявлений бактеріологічними методами, характеризувався за молекулярно-генетичними методами як стійкий до рифампіцину та ізоніазиду). В 1 (3,8 %) випадку діагноз лікувальної установи був «гострий абсцес правої легені» при негативному результаті мікроскопії мокротиння, результати ж молекулярно-генетичних досліджень виявили наявність штамів wt; в 1 (3,8 %) випадку діагноз туберкульозу було знято і поставлено діагноз «саркоїдоз» при негативному результаті мікроскопії, а молекулярно-генетичні дослідження характеризували штам даного хворого як резистентний до рифампіцину та ізоніазиду. В 3 (11,5 %) випадках перебіг захворювання завершився летальним кінцем: в одному випадку — при негативному результаті мікроскопії і при виявленні штаму, що належить до сімейства Beijing і є резистентним до рифампіцину та ізоніазиду; в другому випадку — дані бактеріологічних досліджень характеризували штам як чутливий до протитуберкульозних препаратів при виявленні резистентності його до рифампіцину та ізоніазиду й приналежності до сімейства Beijing молекулярно-генетичними методами; у третьому випадку — бактеріологічно виявлялася резистентність штаму до ізоніазиду і стрептоміцину, а молекулярно-генетичні дослідження характеризували його як чутливий до ПТП.

Вивчення поширеності штамів, виділених від хворих на туберкульоз контрольної групи, що характеризуються як мультирезистентні, засвідчило значну розбіжність результатів, отриманих бактеріологічними методами, з результатами молекулярно-генетичних досліджень (рис. 3.12).

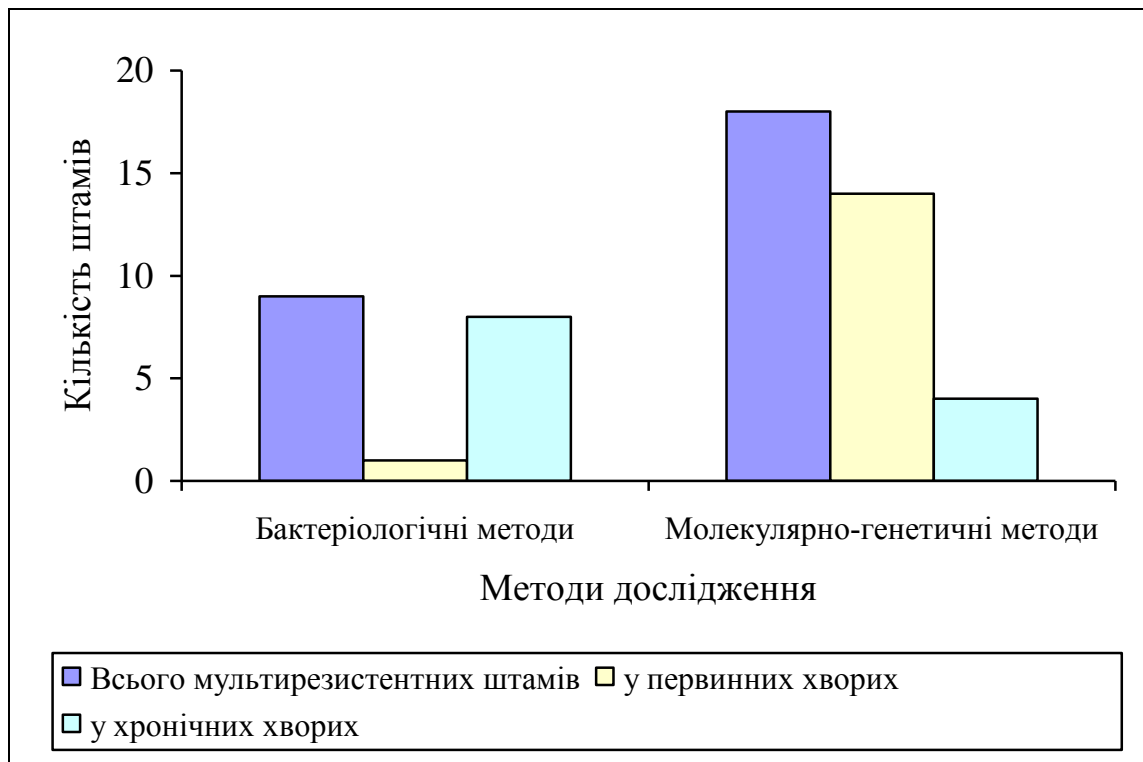


Рис. 3.12 Діагностика мультирезистентних штамів МБТ, виділених у хворих контрольної групи

Відповідно показники у відсотках становили за результатами бактеріологічних досліджень за загальною кількістю мультирезистентних форм 6,16 %, а за даними молекулярно-генетичних досліджень цей показник дорівнює 12,3 %; для первинних хворих — відповідно 0,68 і 9,58 % (перевищує в 14 разів); для хронічних хворих — 4,79 і 3,4 % .

Із 146 пацієнтів в контрольній групі 14 первинних хворих отримували лікування без урахування того, що штами мікобактерій туберкульозу, які спричинили у них захворювання, є мультирезистентними.

У 8 випадках результат лікування хронічних хворих, штами яких і бактеріологічними, і молекулярно-генетичними методами характеризувалися як мультирезистентні, був такий: у 4 (50 %) випадках захворювання прогресувало; в 1 (12,5 %) випадку хворий одужав; у 3 (37,5 %) випадках — летальний кінець.

Таким чином, проведений порівняльний аналіз результатів, отриманих традиційними рекомендованими МОЗ України бактеріологічними методами [20] і молекулярно-генетическими методами, свідчить про необхідність внесення змін у діагностику резистентних форм МБТ. Генотипування штамів МБТ на ранніх етапах розвитку туберкульозного процесу дозволить прогнозувати перебіг специфічного процесу, визначити доцільність застосування високих доз ізоніазиду, використання препаратів резервного ряду з урахуванням їхньої фармакокінетики [9; 114; 115].

3.4. Характеристика контрольної групи хворих

Для вивчення виникнення розвитку стійкості МБТ до ПТП була створена контрольна група хворих, які надійшли на лікування в МОПТД у період травень–липень 2003 р. Створена анкета для кожного, хто надійшов на лікування, передбачала збір анамнестичних і об'єктивних даних, а також результатів бактеріологічних і молекулярно-генетичних досліджень (Додаток Б).

Контрольна група хворих характеризувалася таким розподілом за статтю: чоловіків 110 (75,3 %), жінок 36 (24,7 %); за віком хворі, що надійшли на лікування, були от 16 до 78 років (рис. 3.13), міських жителів — 53 (36,3 %), із Миколаївської області — 93 (63,6 %). У хворих діагностувалися такі форми туберкульозу: дисемінований туберкульоз — у 39 (26,8 %); інфільтративний туберкульоз — у 60 (41,3 %); фіброзно-кавернозний туберкульоз — у 15 (10,45 %). В 3 (2,17 %) було поставлено діагноз плеврит; в 2 (1,4 %) — абсцес легені; не було поставлено діагноз — в 3 (2,17 %); вогнищевий — в 22 (15,2 %). Супровідними діагнозами були: цукровий діабет — в 2 (1,4 %); ВІЛ-інфікування — в 4 (2,8 %); СНІД — в 2 (1,4 %).

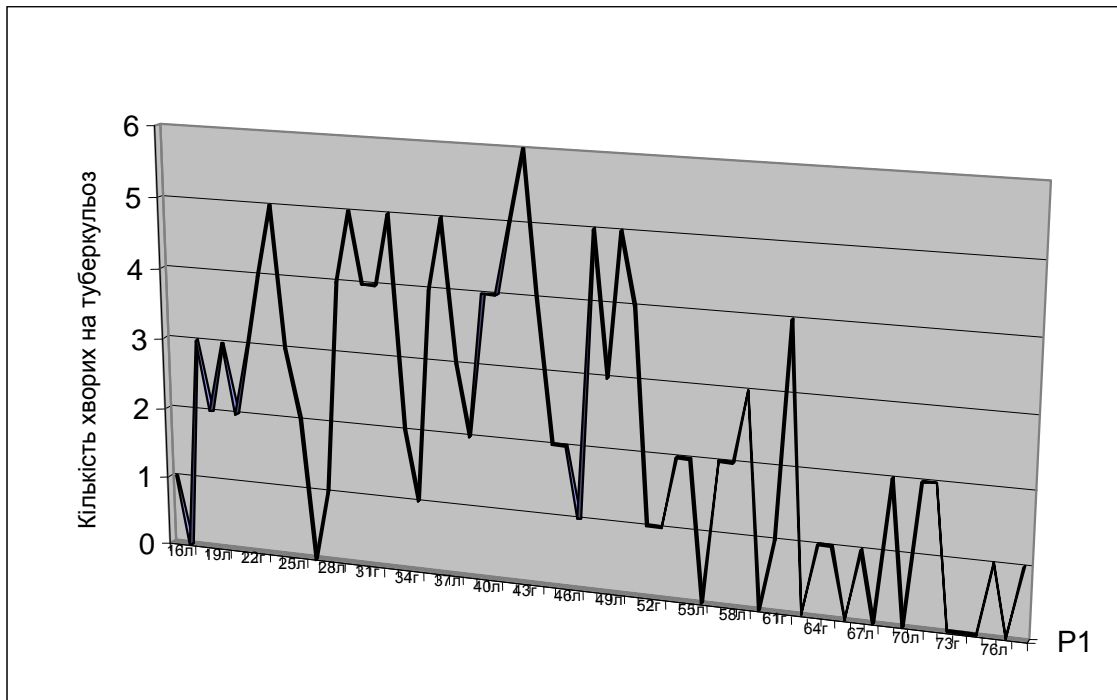


Рис. 3.13 Вікові групи хворих на туберкульоз (контрольна група)

Отримані дані порівнювані з опублікованими в літературі. Так, у м. Києві в 2000 р. спостерігалася група хворих (N=133), в якій чоловіків було 104 (78,2 %) (у Миколаєві — 110 (75,3 %)); особи молодого і середнього віку становили 113 (85,3 %) (в Миколаєві — 93 (64 %). Хворим, що перебували на лікуванні в ІФП (Київ), було поставлено такі діагнози: фіброзно-кавернозний ТБ — в 61 (45,9 %); інфільтративний — в 46 (34,6 %); дисемінований — в 30 (19,5 %) [17].

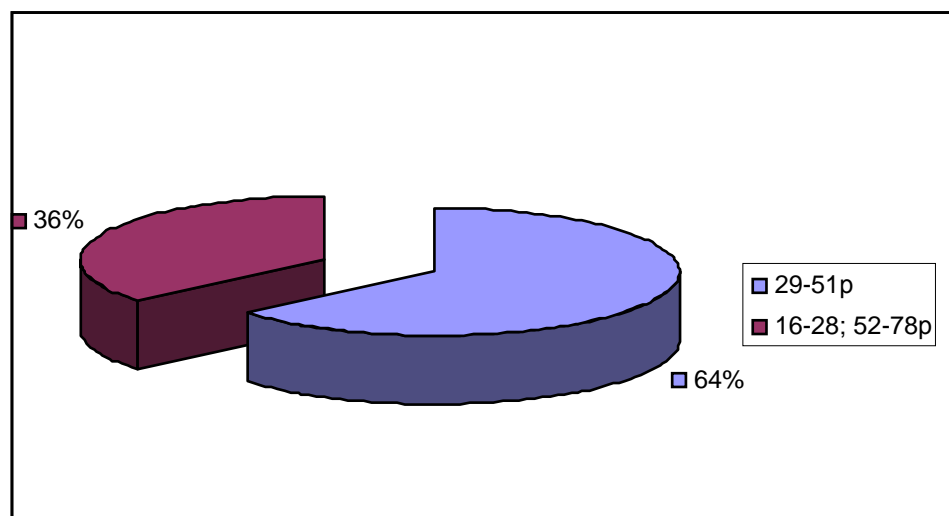


Рис. 3.14 Розподіл хворих на туберкульоз в Миколаївській області по віковим групам (контрольна група хворих 2003 р.)

За даними картотеки МОПТД, на лютий 2005 р. кінець захворювання в контрольній групі хворих був такий: одужання — в 39,70 %; клініко-рентгенологічна стабілізація — в 5,60 %; прогресування захворювання — в 21,90 %; летальний кінець — в 13,47 %; про результати лікування 17,00 % хворих дані відсутні. Діагноз туберкульоз не підтвердився в 2,10 %.

За результатами бактеріологічних досліджень, проведених в лабораторії МОПТД, мікобактерії туберкульозу, які спричинили ТБ в хворих контрольної групи були чутливі до протитуберкульозних препаратів в 48,6 %; резистентні форми становили 11,8 %; абацилярні форми 39,7 %.

РОЗДІЛ 4

МЕХАНІЗМИ РОЗВИТКУ РЕЗИСТЕНТНОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ
ТУБЕРКУЛЬОЗУ ДО ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА
МОЖЛИВІ ШЛЯХИ ЇЇ ПОДОЛАННЯ

4.1 Поширеність мутацій, асоційованих з лікарською стійкістю

Поширеність мутацій, асоційованих з лікарською стійкістю мутації МБТ, асоційовані з лікарською стійкістю, в штаммах, виділених від хворих на туберкульоз, в Миколаївській області характеризуються такими змінами в геномі збудника туберкульозу (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Детекція мутацій МБТ, асоційованих з лікарською стійкістю і наявність в популяції МБТ штамів генетичного сімейства Beijing

№ пацієнтів	rpo B	kat G	Inh A	Spoligotype
012	D2	315 mut	Wt	
013	D2	315 mut	mut	
016	Wt	Wt	wt	
017	Wt	Wt	wt	
018	Wt	Wt	wt	
021	D6+7	315 mut	mut	
026	Wt	315 mut	wt	
027	Wt	Wt	wt	
030	Wt	Wt	wt	
034	D6+7	315 mut	wt	
042	Wt	Wt	wt	
046	Wt	Wt	wt	
047	D6+7	315 mut	wt	Beijing
049	Wt	Wt	wt	
051	Wt	Wt	wt	
052	Wt	315 mut	wt	
053	Wt	Wt	mut	
054	Wt	Wt	wt	
056	D5	315 mut	wt	
057	D5	315 mut	mut	
059	Wt	Wt	wt	Beijing
060	Wt	Wt	wt	Beijing
061	Wt	Wt	wt	

Продовження табл. 4.1

№ пацієнтів	rpo B	kat G	Jnh A	Spoligotype
064	Wt	Wt	wt	
067	Wt	Wt	wt	
069	Wt	315 mut	wt	Beijing
072	D6+7	315 mut	wt	
073	Wt	Wt	wt	
081	Wt	Wt	wt	
089	D2	Wt	wt	
097	D5	315 mut	mut	
120	D5	Wt	wt	
126	D5	315 mut	wt	Beijing
127	D5	315 mut	wt	Beijing
128	Wt	315 mut	wt	
132	Wt	315 mut	wt	
138	D5	315 mut	mut	
146	Wt	Wt	wt	Beijing
Всього 38 штамів	d2=3 d5=7 wt=24 d6+7=4 14 (36,8 %)	wt=21 315 mut=17 17 (44,7 %)	mut=6 wt=32 6 (15,7 %)	7 7 (18,4 %)

Споліготиби мікобактерій, циркулюючих на Півдні України

В ході дослідження нами були отримані споліготиби для 36 штамів *M. tuberculosis* з Миколаївської області. Ізоляти мікроорганізмів були отримані в ході проспективного дослідження із застосуванням анкетування пацієнтів, що дозволило зібрати необхідну епідеміологічну інформацію.

При аналізі отриманих результатів перш за все звертає на себе увагу наявність в досліджуваних групах ізолятів з Миколаївської області штамів сімейства Beijing, що характеризуються наявністю останніх 9 спейсерів із 43 спейсерів в DR-регіоні мікобактерій. В Миколаївській області представництво штамів Beijing незначне і становить 18,4 % (Додаток В).

Згідно з даними літератури, штами сімейства Beijing є високовірулентними, а також у багатьох випадках асоційовані з множинною лікарською стійкістю, особливо зі стійкістю до рифампіцину. Сімейство Beijing розповсюджене, головним чином, у США, країнах Південно-Східної

Азії (в основному, в Китаї — своєю назвою це сімейство завдячує одній з китайських провінцій) і в більшості регіонів Росії, де частка штамів Beijing становить 70 % і більше. Як правило, всі ці регіони характеризуються також високими рівнями захворюваності на туберкульоз і стійкості до протитуберкульозних препаратів [3].

Аналіз даних споліготипування дозволив провести кластеризацію понад 80 % досліджуваних штамів. Відносно низький рівень некластеризованих штамів свідчить, очевидно, про активну трансмісію туберкульозу в поточний момент і про відносно невелику кількість випадків активації латентної інфекції. В цілому, за даними споліготипування, нині на Півдні України циркулює відносно невелика кількість різних генотипів мікобактерій.

Сучасні методи генетичного диференціювання штамів *M. tuberculosis complex* дозволяють вивчати структуру популяцій МБТ [116; 117; 126; 127]. Встановлено, що найбільш розповсюдженим у світі є штам генетичного сімейства Beijing. Домінування мікобактерій цього типу вперше описано в Китаї, де до нього належало 92 % виділених ізолятів [102]. Деякі дослідники висловили припущення про селективну перевагу штамів Beijing перед іншими генотипами, що, можливо, зумовлено їхньою здатністю ухилятися від впливу факторів імунного захисту організму. Крім того, штамми цього генотипу виділяються в основному в осіб молодого віку, більш стійкі до туберкулоstaticів, викликають випадки екзогенної, зокрема нозокоміальної інфекції. Все це свідчить про високу трансмісивність збудника, що являє серйозну епідемічну небезпеку. Картина поширеності штамів генетичного сімейства Beijing у популяції *M. tuberculosis*, які циркулюють на території Миколаївської області, значно відрізняється від представленої в літературі. Питома вага штамів цього генетичного сімейства становила в контрольній групі хворих 18,4 % (в Одеській області 51,9 %). Даний показник порівнюваний з рівнем мутацій, відповідальних за розвиток стійкості до рифампіцину (36,8 %), який значно нижчий за спостережуваний рівень резистентності штамів МБТ до рифампіцину в Одеській області (76,5 %) і в

Росії (70 %). Цей показник демонструє своєрідну картину розвитку резистентності МБТ в умовах несприятливої епідеміологічної ситуації в Миколаївській області і необхідність коригування схем лікування хворих на ТБ з урахуванням отриманих результатів дослідження.

4.2. Вивчення виникнення вторинної стійкості в процесі лікування туберкульозу й визначення препаратів першого–другого рядів і їхніх комбінацій, придатних для терапії лікарсько-стійкого туберкульозу

На підставі вивчених даних були сконструйовані такі схеми розвитку туберкульозного процесу при застосуванні препаратів I і окремих препаратів II ряду в процесі лікування туберкульозу в Миколаївському обласному протитуберкульозному диспансері (табл. 4.2):

Таблиця 4.2

Результати лікування при використанні різних комбінацій ПТП

Характеристика штамів	Комбінація препаратів	Результати лікування	%
Чутливі штами мікобактерій туберкульозу N=71, 49,3 %	S, H, R, Z	Перехід у хронічну форму	20
		Одужання	38,5
		Абацилювання	10
		Розвиток резистентності	2,85
		Летальний кінець захворювання	14,28
		Немає даних про результати лікування	14,28
Резистентні форми мікобактерій туберкульозу N=15, 10,4 %	2–3 препарати з К, H, R, E, Et + фторхінолони	Одужання	20
		Прогресування захворювання	46,6
		Летальний кінець	33,3
Абацилярні форми N=58, 40,2 %	S, H, R	Одужання	50
		Прогресування захворювання	15,5
		Клініко-рентгенологічна стабілізація	3,4
		Летальний кінець	13,7
		Немає даних про результати лікування	17,2

Окремо було проаналізовано розвиток резистентності МБТ у первинних хворих контрольної групи при використанні різних комбінацій ПТП. Результати аналізу представлено у таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Розвиток резистентності МБТ у первинних хворих контрольної групи (2003 р.)

Категорія хворих	Комбінація ПТП	Характеристика штаму	Результат лікування	%
Первинні хворі N=96 65,75 %	S, H, R, Z	Чутливі штами 56,25 %	Одужання	45
			Прогресування захворювання	17,6
			Клініко-рентгенологічна стабілізація	7,8
			Летальний кінець	11,7
			Немає даних о результатах лікування	17,6
	S, H, R, Z, K (Et)	Резистентні форми (за даними бактеріологічних досліджень) 2,08 %	Летальний кінець	50
			Прогресування захворювання	50
	S, H, R	Абацилярні форми 44,7 %	Одужання	65,1
			Прогресування захворювання	4,65
			Летальний кінець	9,3
			Немає даних про результати лікування	20,9

Також було проаналізовано розвиток резистентності МБТ у хронічних хворих контрольної групи при використанні різних комбінацій ПТП. Результати аналізу представлено у таблиці 4.4.

**Розвиток резистентності МБТ у хронічних хворих контрольної групи
(2003 р.)**

Категорія хворих	Комбінація ПТП	Характеристика штаму	Результат лікування	%
Хронічний перебіг захворювання N=49 34,2 %	2–3 препарати з К, Н, R, E, Et	Чутливі штами	Одужання	17,6
			Прогресування захворювання	35,29
			Клініко-рентгенологічна стабілізація	11,7
			Летальний кінець	17,6
			Немає даних про результати лікування	17,6
	К, Н, R, E, Et + фторхінолони	Резистентні форми	Одужання	10
			Прогресування захворювання	60
			Летальний кінець	30
	Н, R, E	Абацилярні форми	Одужання	13,6
			Клініко-рентгенологічна стабілізація	9,09
			Прогресування захворювання	36,36
			Летальний кінець	9,09
			Немає даних про результати лікування	31,8

Аналіз даних розвитку туберкульозного процесу залежно від місця проживання представлено у табл. 4.5 – 4.8.

Таблиця 4.5

Розвиток резистентності МБТ у первинних хворих на туберкульоз — жителів міста Миколаєва (n=33, 64,7%)

Комбінація препаратів	Характеристика штамів	Результат лікування	%
S, H, R, Z	Чутливі до ПТП штамів 45,45 %	Одужання	46,6
		Клініко-рентгенологічна стабілізація	6,6
		Прогресування захворювання	13,3
		Летальний кінець	20
		Немає даних про результати лікування	13,3
S, H, R, Z + додається в схему К/Ет	Резистентні форми 3,03 %	Летальний кінець	100
S, H, R	Абацилярні форми 45,45 %	Одужання	66,66
		Прогресування захворювання	6,6
		Летальний кінець	6,6
		Немає даних про результати лікування	20

Таблиця 4.6

Розвиток резистентності МБТ у хронічних хворих на туберкульоз — жителів міста Миколаєва (n=20, 35,29%)

Комбінація препаратів	Характеристика штамів	Результат лікування	%
2–3 препарати з К, H, R, E, Et + фторхінолони	Резистентні форми 27,7 %	Одужання	20
		Прогресування захворювання	40
		Летальний кінець	40
S, H, R	Абацилярні форми 44,4%	Одужання	25
		Прогресування захворювання	37,5
		Летальний кінець	12,5
		Немає даних про результати лікування	25
2–3 препарати з К, H, R, E, Et	Чутливі до ПТП штамів 27,7 %	Прогресування захворювання	40
		Немає даних про результати лікування	60

Таблиця 4.7

**Розвиток резистентності МБТ у первинних хворих на туберкульоз —
жителів Миколаївської області (n=64, 69,5)**

Комбінація препаратів	Характеристика штамів	Результат лікування	%
S, H, R, Z	Чутливі до ПТП штами 57,8 %	Одужання	48,6
		Клініко-рентгенологічна стабілізація	8,1
		Прогресування захворювання	21,6
		Розвиток резистентних форм	2,7
		Летальний кінець	8,1
		Немає даних	10,8
S, H, R	Абацилярні форми 42,1 %	Не підтвердився DS	3,7
		Одужання	62,9
		Клініко-рентгенологічна стабілізація	7,4
		Летальний кінець	11,1
		Немає даних	14,8

Таблиця 4.8

**Розвиток резистентності МБТ у хронічних хворих на туберкульоз —
жителів Миколаївської області (n=29, 30,4%)**

Комбінація препаратів	Характеристика штамів	Результат лікування	%
2–3 препарати з K, H, R, E, Et + фторхінолони	Резистентні штами 25 %	Одужання	14,28
		Прогресування захворювання	71,4
		Летальний кінець	14,28
2–3 препарати з K, H, R, E, Et	Чутливі до ПТП штами 32,1 %	Одужання	11,1
		Клініко-рентгенологічна стабілізація	33,3
		Прогресування захворювання	22,2
		Летальний кінець	33,3
2–3 препарати з K, H, R, E, Et	Абацилярні форми 42,8%	Одужання	8,3
		Клініко-рентгенологічна стабілізація	8,3
		Прогресування захворювання	33,3
		Летальний кінець	8,3
		Немає даних про результати лікування	41,6

Використовувані схеми лікування хворих на ТБ в Миколаївській області відповідають рекомендованим схемам ВООЗ і ІФП [118–125], однак збої в забезпеченні ПТП призводять до того, що при лікуванні абацилярних форм і хронічних хворих піразинамід не застосовується, спектр препаратів групи фторхінолонів обмежений в основному перфлораксацином і застосовується для лікування тільки резистентних форм ТБ. У контрольній групі хворих (2003 р.) найкращі результати лікування спостерігалися в групі первинних абацилярних хворих, які проживають в м. Миколаєві (одужання в 66,6 % при використанні комбінації Н+R+S), найгірші — в групі хронічних абацилярних хворих — жителів Миколаївської області (одужання в 8,3 % при використанні комбінації із 3 препаратів, що є в наявності, — К, Н, R, E, Et). Прогресування захворювання спостерігалось в групі первинних абацилярних хворих у 4,65 % — Н+R+S, а в групі хронічних хворих — жителів Миколаївської області, які виділяють резистентні форми МБТ, цей показник досягнув 71,4 % при використанні 3 препаратів, що є в наявності, — К, Н, R, E, Et, Q. Клініко-рентгенологічна стабілізація варіювала від 6,6 % в групі первинних хворих із м. Миколаєва, які виділяють ЛЧ штами (S+N+R), до 30,3 % в групі хронічних хворих із Миколаївської області, які виділяють ЛЧ штами, при використанні наявних 2–3 препаратів із К, Н, R, E, Et. Летальний кінець в групі абацилярних первинних хворих із м. Миколаєва спостерігався в 6,6 % (S+N+R), а в групі первинних хворих з резистентними формами ТБ досягав 100 % при використанні 3 препаратів, що є в наявності, — S, Н, R, Z, К (Et).

Таким чином, проголошені ВООЗ заплановані результати лікування хворих на ТБ щодо ліквідації бактеріовиділення в 85 % [4] є недосяжними в умовах хіміотерапії туберкульозу, що проводиться сьогодні в Миколаївській області.

Окремо проаналізовано дані розвитку резистентності МБТ у хворих в соціальних групах ризику. Данні аналізу наведено у табл. 4.9 – 4.10.

Таблиця 4.9

Розвиток резистентності МБТ у хворих, які належать до соціальних груп ризику (особи без певного місця мешкання) (n=5, 3,4%)

Категорія хворих	Комбінація препаратів	Характеристика штамів	Результат лікування	Дані у відсотках
Первинні хворі	S, H, R, Z	Чутливі до ПТП	Немає даних	40 %
Хронічний перебіг	2–3 препарати з К, H, R, E, Et	Чутливі до ПТП	Прогресування захворювання	40 %
			Летальний кінець	20 %

Таблиця 4.10

Розвиток резистентності МБТ у хворих, які належать до соціальних груп ризику (особи, які прибули з установ пенітенціарної системи) (n=26, 17,8%)

Комбінація препаратів	Характеристика штамів	Результат лікування	Дані у відсотках
2–3 препарати з К, H, R, E, Et + фторхінолони	Резистентні штами 9,2 %	Одужання	3,8 %
		Прогресування хвороби + ВІЛ	11,5 %
		Летальний кінець	3,8 %
2–3 препарати з К, H, R, E, Et	Абацилярні форми 19,2 %	Одужання	11,5 %
		Прогресування хвороби + ВІЛ	7,6 %
		Немає даних про результати лікування	3,8 %
2–3 препарати з К, H, R, E, Et	Чутливі до ПТП 61,5 %	Одужання	11,5 %
		Прогресування хвороби	15,6 %
		Летальний кінець	11,5 %
		Немає даних про результати лікування	19,1 %

Примітка. Варіювання комбінацій ПТП для лікування хронічних хворих із переліку К, H, R, E, Et пов'язане з наявністю цих ПТП;

К/Et — при розвитку резистентності до стрептоміцину в схему лікування додається К, до ізоніазиду — Et.

Символи препаратів, прийняті в Україні: Ізоніазид — H, Піразинамід — Z, Рифампіцин — R, Етіонамід — Et, Стрептоміцин — S, Канаміцин — K, Етамбутол — E.

Наведені показники результатів лікування хворих на ТБ із асоціальних груп демонструють високий відсоток летального кінця туберкульозного процесу — 35,5 %, прогресування процесу — в 74,7 %. Отримані дані про результати лікування хворих на туберкульоз асоціальних груп збігаються з даними, опублікованими в літературі [128–141] і свідчать про необхідність використання сучасних методів діагностики ЛС форм туберкульозу, що спричинюють у хворих на ТБ даної соціальної групи тяжкий перебіг захворювання [142–144], а також доцільність анкетування для створення бази даних груп ризику.

Критерії ефективності лікування

Одужання — припинення бактеріовиділення, загоєння каверни, зникнення інфільтрації і туберкульозних вогнищ (або їх ущільнення) у пацієнтів, які завершили повний курс антимікобактеріальної терапії (в тому числі після хірургічного лікування).

Припинення бактеріовиділення — це його відсутність, підтверджена методом мікроскопії і не менш як двократним посівом на живильне середовище без загоєння каверни.

Клініко-рентгенологічна стабілізація — зникнення або зменшення клінічних проявів хвороби (зберігається незначний кашель з помірним виділенням мокротиння, нормалізація показників периферичної крові, майже повне розсмоктування інфільтративних і вогнищевих змін у легенях (понад 70 %), регресія каверн (зменшення розмірів, стоншення їхніх стінок, загоєння не всіх каверн). Зберігається бактеріовиділення.

Прогресування захворювання — розповсюдження туберкульозного процесу в легенях в результаті неефективного лікування — поява нових фокусів інфільтрації і ділянок розпаду легеневої тканини, вогнищ дисемінації, збільшення розмірів каверн і стовщення їхніх стінок.

Летальний кінець — смерть хворого протягом основного курсу антимікобактеріальної терапії або після неефективного лікування [74].

Дані табл. 4.3 і 4.4 демонструють результати лікування хворих з ЛС і ЛЧ формами ТБ (хворі контрольної групи 2003 р.). Більш низькі показники ефективності лікування хворих з резистентними формами туберкульозу порівняно з показниками лікування хворих з лікарсько-чутливими формами ТБ у Миколаївській області вказують на необхідність корекції схем лікування хворих з ЛС формами ТБ. Опубліковані результати лікування хворих з ЛС формами ТБ за даними ІФП (м. Київ) при використанні рекомендованих схем лікування ТБ, які застосовуються і в Миколаївській області, значно відрізняються (за даними ІФП, абацилювання в м. Києві досягає 80, загоєння каверн — до 53,3 %) [16; 17] і, можливо, пов'язані з відмінністю штамів МБТ в Миколаївській області та необхідністю урахування цих особливостей при лікуванні туберкульозу.

4.3. Перехресна стійкість препаратів першого ряду

Отримані в ході проспективних досліджень в 2003 р. результати дозволили виявити наявність перехресної стійкості ПТП I ряду (табл. 4.11).

Таблиця 4.11

Перехресна стійкість *M. tuberculosis* до протитуберкульозних препаратів I ряду

Назва препаратів (кількість штамів)	Кількість штамів МБТ, також резистентних до:						
	S	H	E	R	Z	Et	K
Стрептоміцин (N = 15)	-	11	1	1	1	2	1
Ізоніазид (N = 11)	11	-	1	1	1	2	1
Рифампіцин (N = 1)	1	1	-	-	1	1	1
Піразинамід (N = 1)	1	1	-	1	-	1	1
Етіонамід (N = 2)	2	2	-	1	1	-	1
Етамбутол (N = 1)	1	1	-	-	-	-	-
Канаміцин (N = 1)	1	1	-	1	1	1	-

Порівняно з даними ІФП [16], в Миколаївській області співпадають дані про наявність перехресної стійкості до S і K, але відрізняються дані у групах S і H, S і E, R, Z, Et, K; K і H, R, Z, Et.

Таким чином, дані про перехресну стійкість виділених штамів МБТ у Миколаївській області свідчать про особливості циркулюючих штамів у даному регіоні. Дані результатів лікування хворих на туберкульоз, що відрізняються, порівняно з даними ІФП (м. Київ) при використанні рекомендованих для України схем лікування, свідчать про необхідність підвищення ефективності лікування ТБ на основі урахування особливостей збудника туберкульозу в Миколаївській області.

4.4. Показники стійкості мікобактерій туберкульозу до окремих препаратів другого–третього рядів

Із препаратів другого ряду для лікування хворих на туберкульоз в Миколаївському протитуберкульозному диспансері використовується канаміцин у випадках розвитку резистентності у первинних хворих до стрептоміцину, етіонамід — при розвитку резистентності у первинних хворих до ізоніазиду; ці препарати входять до переліку протитуберкульозних препаратів для лікування хронічних хворих [129; 130; 132; 133].

Із аналізу ретроспективних даних випливає, що до канаміцину протягом досліджуваного періоду розвивається стійкість у всіх групах хворих (рис. 3.6–3.9). Відсутність даних про формування механізму стійкості до аміноглікозидів, до яких належить канаміцин, робить неможливим дати характеристику штамам, стійким до цього препарату на молекулярно-генетичному рівні.

До канаміцину спостерігається монорезистентність, а також він входить у такі комбінації протитуберкульозних препаратів, до яких резистентні штами, виділені у хворих на туберкульоз в Миколаївській області за період 2000–2004 рр. (табл. 4.12).

Таблиця 4.12

Різновиди штамів, резистентних до канаміцину

Комбінації	м. Миколаїв		Миколаївська область	
	Первинні хворі	Хворі з хронічною формою ТБ	Первинні хворі	Хворі з хронічною формою ТБ
1 препарат		К	К	К
Із 2	KS	KS KR	KS	KS
Із 3	KSH KSR	KSH KSR	KSH	KSEt KSH KHR KSE
Із 4	KSHE KSHR	KSHE KSER KSRZ KSHR	KSER KSRZ KSHR	KSHE KSER KSHZ KSRZ
Із 5	KSHER	KSHER KSHEEt	KSHEZ	KSHER KSERZ
Із 6	KSHERZ KSHEREt	KSHERZ KSHEEtR	KSHERZ KEtCfCCIRb	KSHERZ KSHEEtR
Із 7		KSHEEtRZ KSHERZEt	KSHEEtRZ	KSHEEtRZ
Із 8				
Із 9	KSHERZEtPas A			KSHEEtRZCfR b
Із 10		KSHEEtRZACf Cf	KSHERZLCCf Rb	
Із 11			KSHEtZLACf C CfRb	
Із 12			KSHEEtRZAP asCfCRb	Див. примітку
Із 13		KSHEEtRZACf CCfRb		
Із 14	KSHERZEtLA PasCfCCfRb	KSHEEtRZLAP asCfCCfRb		KSHEEtRZLA PasCfCCf
Всього комбінацій	10	18	13	19

Примітка: KSHERZAPasCfCCfRb; KSHERZEtACfCCfRb

Як видно з даних табл. 4.12, різновиди штамів, резистентних до канаміцину представлені більшою кількістю варіантів у хворих з хронічною

формою захворювання, причому більше різновидів серед штамів спостерігається у хворих — жителів Миколаївської області.

Другим протитуберкульозним препаратом II ряду, широко використовуваним у лікуванні хронічних хворих і хворих з резистентними формами туберкульозу, є етіонамід — похідна ізонікотинової кислоти (тінамід-2 етилпіридин-4 — карбонової кислоти), що має нижчу антимікобактеріальну активність порівняно з ізоніазидом. В дослідженнях показано, що стійкість до етіонаміду асоціюється з резистентністю до ізоніазиду [145–148]. Виявилося, що близько 10 % фенотипічно стійких до ізоніазиду штамів мікобактерій мають мутації в гені *inh A*, що експресується при синтезі білків клітинної стінки. В більшості випадків при цьому відбувається заміна серину на аланін в 94-му кодоні. Резистентність до етіонаміду до 2002 р. в МОПТД не визначалася. Молекулярно-генетичні дослідження підтвердили, що в Миколаївській області з'явилися штами мікобактерій туберкульозу з мутаціями в ділянці *inh A* гена, відповідального за розвиток стійкості до етіонаміду (табл. 4.1). Починаючи з 2002 р. бактеріологічні дослідження дозволили виявити наявність резистентних штамів до етіонаміду в усіх групах хворих (рис. 3.6–3.9, табл. 4.13).

Таблиця 4.13

**Різновиди штамів, резистентних до етіонаміду, виділених
за період 2002–2004 рр.**

Комбінації	м. Миколаїв		Миколаївська область	
	Первинні хворі	Хворі з хронічною формою	Первинні хворі	Хворі з хронічною формою
1 препарат	Et	Et	Et	Et
Із 2		EtZ		EtZ
Із 3		EtSH	EtSR	EtSH EtSZ EtSR EtSK
Із 4	EtSHE	EtSHE		EtSHR EtSHE EtSHZ EtSRZ

Продовження табл. 4.13

Комбінації	м. Миколаїв		Миколаївська область	
	Первинні хворі	Хворі з хронічною формою	Первинні хворі	Хворі з хронічною формою
Із 5		EtSHEK		EtSKRZ EtSHRZ EtSHER EtSHEZ
Із 6	EtSHEKR	EtSHEKR	EtKCfCCIRb	EtSHEKR
Із 7		EtSHEKRZ EtSHECCIRb	EtSHERZK	EtSHRZKT
Із 8				EtSHERZCRb
Із 9	EtSHERZKA Pas			EtSHERZKC Rb
Із 10		EtSHEKRZACf Cl		
Із 11			EtSHZKLeoA CfCCIRb	
Із 12			EtSHERZKA PasCfCRb	EtSHERZKA CfCCIRb
Із 13		EtSHERZKLeo ACfCCIRb		
Із 14	EtSHEKRZ LeoAPasCfC CIRb	EtSHERZKLeo APasCfCCIRb		EtSHERZKLeo APasCfCCIRb
Всього комбінацій	5	11	6	21

Серед штамів, резистентних до етіонаміду, також простежується більше різноманіття і кількість штамів у хронічних хворих і хворих — жителів Миколаївської області.

4.5. Обґрунтування ефективності застосування фторхінолонів для терапії туберкульозу

Ріст кількості мікобактерій, стійких до чотирьох і більшої кількості протитуберкульозних препаратів, привертає увагу фармакологів і клініцистів до препаратів з антимікобактеріальними властивостями, особливо до фторхінолонів, які використовуються як антимікобактеріальні препарати

широкого спектра дії. Увага до фторхінолонів пов'язана, в першу чергу, з особливостями їхнього механізму антибактеріальної дії, у зв'язку з чим препарати цієї групи почали використовувати при лікуванні ТБ [21].

Як відомо, фторхінолони викликають порушення суперспіралізації ДНК мікроорганізмів за рахунок інгібування активності ферментів ДНК-топоізомераз другого типу (ДНК-гіраз) [149–151]. Найбільшою активністю щодо мікобактерій *in vivo* характеризуються дифторовані фторхінолони третього–четвертого покоління: спарфлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин і левофлоксацин, у яких мінімальні пригнічуючі концентрації становлять від 0,12 до 1,0 мкг/мл [152–156].

Вищими (від 0,5 до 4,0 мкг/мл) є мінімальні пригнічуючі концентрації щодо мікобактерій у ципрофлоксацину, ломефлоксацину і офлоксацину, які найбільше використовуються в Україні. Відомо також про здатність фторхінолонів проникати в макрофаги людини, де левофлоксацин виявляє особливо високу антибактеріальну активність [154]. Сьогодні існують дані про успішне застосування фторхінолонів в терапії мульти- і полірезистентного туберкульозу, які входять в офіційно рекомендовані режими хіміотерапії лікування мультирезистентного туберкульозу в Україні [74]. На жаль, дані про поширеність штамів мікобактерій, стійких до фторхінолонів, відсутні як для зарубіжних країн, так і для України. Штами *M. tuberculosis*, виділені у хворих, не тестуються на стійкість до фторхінолонів. За окремими даними США, рівні стійкості до ципрофлоксацину становлять не більше 2 %, причому в 75,8 % стійкість до фторхінолонів поєднується з мультирезистентністю [157–160]. Між тим, дані літератури свідчать про швидкий розвиток стійкості до фторхінолонів, наприклад, в Бомбеї (Індія) в 1966 р. лікарська стійкість до фторхінолонів визначалася у 3 % хворих, а в результаті їх широкого застосування в 2000 р. вона досягла вже 34 %, тобто за 4 роки резистентність МБТ до фторхінолонів збільшилася в 11 разів. Таке значне і швидке збільшення частоти лікарської стійкості до хінололів зумовлене нерідким їх призначенням у вигляді

монотерапії [17]. Розвиток стійкості до фторхінолонів особливо тривожний стосовно пацієнтів з імунодефіцитами [140]. Поширення епідемії ВІЛ/СНІД в Україні і ріст кількості лікарсько-стійких штамів мікобактерій передбачає завдання вивчення рівнів стійкості до фторхінолонів. З цією метою були проведені проспективні дослідження на матеріалі 809 культур *Mycobacterium tuberculosis*, виділених у хворих з різними формами туберкульозу легенів в лабораторії Миколаївського обласного протитуберкульозного диспансеру в другій половині 2003 р. Із них 280 культур були від хронічних хворих, 529 — від хворих з вперше діагностованим туберкульозом. Дані про встановлення діагнозу і попереднє лікування були отримані з історій хвороби і архівних даних. Дослідження матеріалу (головним чином мокротиння), з використанням щільного живильного середовища й ідентифікація ізолятів проводилися відповідно до Наказу № 45 МОЗ України [20]. Дослідження чутливості мікобактерій до фторхінолонів проводилися до левофлоксацину (дифторований фторхінолол третього покоління) і ципрофлоксацину (фторхінолол другого покоління). З метою вивчення перехресної чутливості визначалися також рівні стійкості виділених штамів мікобактерій до дев'яти інших протитуберкульозних препаратів першого—другого ряду. Перелік і концентрації препаратів, до яких визначалася чутливість, наведено в табл. 4.14.

Тестування лікарської стійкості штамів *M. tuberculosis* до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу, етіонаміду, рифампіцину, канаміцину, піразинаміду і ПАСК проводилося методом абсолютних концентрацій на щільному живильному середовищі Левенштейна—Йенсена відповідно до Наказу № 45 МОЗ України [20; 160–166]. Визначення чутливості до ципрофлоксацину, левофлоксацину і циклосерину проводилося з використанням щільного живильного середовища фірми "Himedia Laboratories" також методом абсолютних концентрацій.

**Концентрації протитуберкульозних препаратів, які були використані
для тестування медикаментозної стійкості**

№	Назва препарату	Концентрації в живильному середовищі, мкг/мл
1	Стрептоміцин	5,0
2	Ізоніазид	1,0
3	Етамбутол	5,0
4	Етіонамід	30,0
5	Рифампіцин	20,0
6	Канаміцин	30,0
7	Піразинамід	5,0
8	Ципрофлоксацин	12,5
9	Левофлоксацин	12,5
10	Циклосерин	30,0
11	ПАСК	1,0

Культура вважалася чутливою до певного препарату за наявності менше 20 колоній в пробірці з препаратом при суцільному рості штамів у контрольній пробірці. Остаточна відповідь про чутливість або стійкість штамів давалася через 4 тиж інкубування в термостаті. Результати тестування виділених штамів чутливості до левофлоксацину і ципрофлоксацину наведено в табл 4.15. Наведені дані демонструють достатньо низький рівень стійкості штамів мікобактерій до левофлоксацину і ципрофлоксацину. Загальна кількість штамів, стійких до одного або двох препаратів, становила 22 (2,7 % від усіх штамів). Однаковими (близько 1,5 %) у двох групах хворих були рівні резистентності до левофлоксацину. Деяко вищими ($p > 0,05$) виявилися рівні резистентності до ципрофлоксацину, які становили 2,3 % від загальної кількості виділених штамів. Різниця в рівнях стійкості до ципрофлоксацину між штамми, виділеними у первинних хворих, і штамми хворих, які раніше лікувалися ПТП, виявилася незначною. Комбінована резистентність до двох препаратів була виявлена у 8 (36,4 %) культур мікобактерій, резистентних до цих препаратів.

Таблиця 4.15

Результати бактеріологічної діагностики чутливості виділених штамів до ципрофлоксацину і левофлоксацину

Характеристика штамів	Штами хворих, які ніколи не приймали ПТП	Штами хворих, які раніше приймали ПТП	Всього штамів
Виділено штамів	529	280	809
Резистентні до ципрофлоксацину	9 (1,7 %)	10 (3,6 %)	19 (2,3 %)
Резистентні до левофлоксацину	7 (1,3 %)	4 (1,4 %)	11 (1,4 %)
Резистентні водночас до ципрофлоксацину і левофлоксацину	5 (0,9 %)	3 (1,0 %)	8 (1,0 %)

Примітка: суттєвих статистичних відмінностей між групами хворих, які ніколи не приймали ПТП і раніше приймали ПТП не встановлено ($p > 0,05$).

Результати комбінованої резистентності свідчать, що більшість штамів, стійких до фторхінолонів, є не чутливими до інших протитуберкульозних препаратів. Більше 90 % левофлоксацин-резистентних штамів є також стійкими до інших досліджуваних ПТП, крім ПАСК. Із штамів, резистентних до ципрофлоксацину, найвищі рівні перехресної стійкості відмічено до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу і піразинаміду по 84,2 %, а також до циклосерину (78,9 %).

Таким чином, дані проведених досліджень демонструють, що в Миколаївській області на даний момент рівень поширення штамів мікобактерій, стійких до фторхінолонів, є невисоким і порівнюваним з даними США, Канади й інших країн [156,167-175]. Не виявлено значної різниці між показниками стійкості до фторхінолонів другого (ципрофлоксацину) і третього (левофлоксацину) поколінь. Відсутність різниці між показниками чутливості штамів, виділених від різних груп пацієнтів, які раніше не лікувалися ПТП, і тих, які отримували ПТ терапію, свідчать, з однієї сторони, про відносно повільний розвиток резистентності

до цих препаратів мікобактерій туберкульозу, з іншої сторони, цей факт підтверджує, що фторхінолони мало використовувалися в терапії туберкульозу, незважаючи на добрі клінічні показники [17].

З метою отримання даних комбінованої резистентності до фторхінолонів та інших протитуберкульозних препаратів I і II ряду, які є основними в сучасних схемах протитуберкульозної терапії, було проведено порівняння результатів тестів на лікарську чутливість до 9 препаратів у штамів, стійких до фторхінолонів. Результати наведено в табл. 4.16.

Таблиця 4.16

**Аналіз комбінованої резистентності штамів мікобактерій до
антимікобактеріальних препаратів**

Кількість штамів резистентних до фторхінолонів	Кількість штамів, резистентних також до:								
	S	H	E	Z	Et	R	K	Pas	C
Резистентні до левофлоксацину (N= 11)	10	10	9	10	9	9	9	6	10
Резистентні до ципрофлоксацину (N=19)	16	16	16	16	13	13	14	10	15

Отримані дані перехресної стійкості співпадають з даними ІФП про повну перехресну резистентність штамів, стійких до препаратів I і II ряду, до всіх фторхінолонів [17].

Необхідно звернути увагу на дані швидкого розвитку резистентності до фторхінолонів, особливо у ВІЛ-інфікованих хворих [19], що підтверджує необхідність впровадження системи моніторингу лікарської чутливості штамів мікобактерій до цих препаратів.

Значно менші порівняно з показниками стійкості збудника туберкульозу до препаратів першого ряду [19] рівні стійкості до фторхінолонів, продемонстровані в табл. 4.15, вказують на перспективність використання фторхінолонів як протитуберкульозних препаратів в Україні. З іншої сторони, результати аналізу перехресної резистентності фторхінолон-стійких штамів до препаратів першого ряду, особливо до стрептоміцину, ізоніазиду,

етамбутолу і рифампіцину, свідчать про те, що значна кількість фторхінолон-резистентних штамів є також нечутливими й до інших препаратів. Це явище було вже відмічено в літературі [17; 19] і, на жаль, обмежує можливості використання фторхінолонів у частини пацієнтів, інфікованих мульти- і полірезистентними штамми *M. tuberculosis*.

РОЗДІЛ V

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Протягом досліджуваного періоду (2000–2005 рр.) в Миколаївській області, яка посідає одне з перших місць із захворюваності на туберкульоз в Україні, поряд з погіршенням епідеміологічної ситуації, що характеризується ростом захворюваності на туберкульоз з 68 випадків на 100 тис. населення в 1993 р. до 110 — в 2005 р., спостерігається збільшення кількості виділених від хворих резистентних до ПТП штамів *M. tuberculosis*. Характеристика контингенту хворих на туберкульоз в Миколаївській області порівнювана з даними у світі й в Україні [167–173]. У контрольній групі хворих чоловіки становлять 75,3 %, особливо страждає категорія жителів репродуктивного і працездатного віку (рис. 3.13 і 3.14). Істотний внесок у резервуар інфекції роблять особи асоціальної поведінки — без певного місця мешкання і прибулі з установ пенітенціарної системи (становили 17,8 % в контрольній групі хворих), які виділяють у великому відсотку мультирезистентні штами МБТ і характеризуються перебігом туберкульозу з низькою ефективністю лікування (див. табл. 2.3). Хворі на СНІД і ВІЛ-інфіковані доповнюють контингент неблагополучних пацієнтів, оскільки СНІД є на сучасному етапі розвитку туберкульозної інфекції асоційованим з туберкульозом захворюванням [174] і, знижуючи, в свою чергу, імунітет хворого, призводить до неблагополучного перебігу хвороби (див. табл. 4.9).

У контрольній групі хворих більше жителів Миколаївської області (див. табл. 2.3), у цієї групи хворих показники розвитку стійкості до ПТП значно перевищують відповідні значення як за темпами збільшення резистентних форм, за кількістю ПТП, до яких водночас виділений штам є нечутливим, так і за кількістю резистентних штамів до окремих антимікобактеріальних засобів.

По відношенню до ПТП у контрольній групі хворих чутливі штами становили 48,6 %; резистентні — 11,6 % (за даними молекулярно-генетичних

досліджень); абацитарні — 39,7 %, що приводить до різних результатів проведеної протитуберкульозної терапії (див. табл. 4.2).

Дані бактеріологічних досліджень характеризують популяцію мікобактерій туберкульозу, які викликають туберкульоз у жителів Миколаївської області, такими показниками (див. табл. 3.1).

На фоні збільшення кількості досліджуваних культур і відповідно кількості первинних хворих, співвідношення яких знизилося по відношенню до хронічних хворих з 1,9 до 1,4 разу, спостерігається ріст загальної кількості резистентних форм — з 19,9 % в 2000 р. до 27,4 % в 2005 р., менш інтенсивний, але все ж таки ріст кількості резистентних штамів, виділених від первинних хворих, — з 3,15 % в 2000 р. до 4,11 % в 2005 р. [176].

Селекція резистентних штамів у хронічних хворих на фоні проведеної хіміотерапії пов'язана зі зменшенням бактеріальної популяції і зміною співвідношення в бік резистентних форм. Існує тісний взаємозв'язок між кількісними змінами мікобактеріальної популяції і зміною ряду біологічних властивостей МБТ (наприклад лікарської стійкості). У великій бактеріальній популяції, яка активно розмножується, завжди є невелика кількість лікарсько-стійких диких мутантів. В каверні $d=2\text{см}$ знаходиться 1 млрд МБТ і серед них мутанти до всіх протитуберкульозних препаратів [17]. Ці мутанти не мають практичного значення, але по мірі зменшення бактеріальної популяції під впливом ПТП змінюється співвідношення між кількістю лікарсько-чутливих і стійких мікобактерій туберкульозу.

При неадекватних режимах хіміотерапії і поєднання ПТП, неоптимальних дозах основними механізмами у формуванні лікарської резистентності є селекція й адаптація мікобактерій туберкульозу, тобто постійний відбір й звикання МБТ до протитуберкульозних препаратів, що при тривалому впливу веде до змін геному мікобактеріальної клітини без оборотності чутливості. В цих умовах відбувається розмноження, головним чином, стійких мікобактерій туберкульозу [176–184].

Таке явище, як монорезистентність резистентних штамів, зазнало за досліджуваний період значних змін: питома вага монорезистентних штамів зменшилася в 2000 р. з 6 (хронічні хворі — Миколаївська область) до 1 (м. Миколаїв — первинні хворі); з'явилися такі, що раніше не виявлялися, монорезистентні штами до С, Leo, Et (2003 р.). Стабільно зберігається монорезистентність до стрептоміцину й ізоніазиду.

Резистентність мікобактерій — негативне явище, а полірезистентність — це негативне явище, піднесене до степеня, оскільки значно знижує можливості етіотропної терапії таких хворих [6]. У Миколаївській області відмічено зростання стійкості до стрептоміцину, ізоніазиду, канаміцину, етіонаміду. Полірезистентні штами мають ослаблену вірулентність, особливо за наявності резистентності до ізоніазиду й рифампіцину, і знижену життєздатність. Дані штами зумовлюють торпідність перебігу основного процесу в легенях і меншу схильність до дисемінації. Але ці здавалося б сприятливі властивості нівелюються труднощами підбору препаратів для лікування, особливо у випадках поєднання з непереносністю хворим ряду препаратів або побічними реакціями.

Полірезистентність штамів МБТ в Миколаївській області характеризується ростом кількості комбінацій препаратів від 2 до 14 (рис. 3.2–3.5), причому сполучаються препарати I, II ряду, фторхінолони [19]. Цей факт, безсумнівно, створює труднощі в лікуванні хворих на туберкульоз і знижує його ефективність.

Протягом 2000–2005 рр. спостерігався ріст кількості виділених мультирезистентних штамів, які являють епідеміологічну небезпеку й несприятливий прогноз для конкретного хворого (див. табл. 3.3). У 18 (12,3 %) хворих контрольної групи, які виділяли мультирезистентні форми, результатом лікування в 21,4 % випадків було прогресування захворювання у первинних хворих і в 25 % — летальний кінець у хронічних хворих. Збільшилася кількість виділених штамів, які характеризуються як мультирезистентні, по всіх групах хворих: у первинних хворих на

туберкульоз цей показник становив 1,39 % в 2000 р. і 2,55 % — в 2004 р., у хворих з хронічним перебігом хвороби кількість мультирезистентних штамів збільшилася з 8,4 % в 2000 р. до 16,9 % в 2004 р. При цьому спостерігався значний ріст загальної кількості мультирезистентних штамів: з 9,8 % в 2000 р. до 19,5 % в 2004 р. Відносно невисокі рівні мультирезистентності штамів МБТ, виділених від хворих на туберкульоз в Миколаївській області, кількісно порівнюються з виявленою кількістю штамів, що належать до сімейства Beijing, яке, за деякими даними, пов'язує з розвитком стійкості мікобактерій до рифампіцину й ізоніазиду [185–192]. У контрольній групі хворих лише від 7 були виділені штами з властивостями сімейства Beijing, що значно відрізняє популяцію мікобактерій туберкульозу Миколаївської області за даними показниками зі штамми МБТ, які виділяються в найближчій Одеській області [108]. Повсюдне поширення первинно-резистентних форм МБТ вказує на можливий розвиток у деяких країнах епідемії мультирезистентного туберкульозу, що не піддається лікуванню. В зв'язку з цим актуальним завданням фтизіатрії є своєчасна діагностика лікарської стійкості МБТ. Порівняння чутливості традиційних бактеріологічних методів визначення резистентності з результатами молекулярно-генетичних досліджень довело розбіжність у результатах діагностики мультирезистентних форм у первинних хворих в 14 разів. Це вплинуло на стратегію лікування і знизило ефективність лікування даних хворих (див. табл. 4.3).

Із ростом загальної кількості резистентних штамів *M. tuberculosis* з 19,9 % в 2000 р. до 27,4 % в 2005 р. змінювалися комбінації ПТП, до яких водночас були стійкі штами мікобактерій, які виділялися, як в кількості ПТП, так і в поєднанні препаратів I і II ряду. Кількість антимікобактеріальних препаратів, до яких водночас був стійкий штам, збільшилася з 7 в 2002 р. до 14 в 2005 р.; це пов'язано як з розширенням використання препаратів II ряду і фторхінолонів у схемах лікування, так і з включенням цих препаратів у методику визначення резистентності. Як відомо, хіміотерапія індукує появу

мутацій в геномі *M. tuberculosis* [193; 194]. Було зареєстровано різних поєднань ПТП від 3 (Миколаївська область, 2000 р., первинні хворі) до 29 (Миколаївська область, 2003 р., хронічні хворі); отже, найбільше різноманіття поєднань ПТП спостерігалось в 2003 р. Аналіз поєднання протитуберкульозних препаратів, до яких були стійкі виділені штами, в різних соціальних групах засвідчив, що штами мікобактерій туберкульозу в хворих Миколаївської області (порівняно з жителями міста Миколаєва) і хворих, які раніше отримували антимікобактеріальну терапію, мають значні розбіжності в кількості й різноманітті комбінацій ПТП, до яких резистентні штами МБТ, виділені у одного хворого (для первинних хворих — 3, для хронічних — 29), причиною чого є недоліки у проведенні терапії протитуберкульозними препаратами.

Найвищий відсоток у кількісному відношенні дали штами, які виявили стійкість до поєднання препаратів S+H (додаток Д). Даний тип стійкості пов'язаний з використанням препаратів I ряду і, безперечно, впливає на ефективність лікування і прогресування патологічного процесу. Резистентність до ізоніазиду пов'язана з дефектами в ділянці генів *inh A*, *kat G*, що підтвердили дані молекулярно-генетического аналізу — в 17 штаммах, виділених від хворих контрольної групи, виявлено мутації в ділянці гена *kat G* і в 6 штаммах — мутації в ділянці гена *inh A*. Ця ділянка гена пов'язана і з розвитком резистентності до етіонаміду, що й підтвердили дані дослідження розвитку стійкості виділених штамів до Et протягом 2000–2004 рр.

Стосовно окремих протитуберкульозних препаратів I ряду протягом 2000–2005 рр. зберігалася превалююча кількість резистентних штамів мікобактерій туберкульозу до стрептоміцину та ізоніазиду, що збігається з даними поширення таких штамів у світі [3; 195; 198]. Більш високі, чим в групі первинних хворих показники за рівнем резистентності виділених штамів до рифампіцину спостерігалися у групі хронічних хворих, як тих, що проживають в місті Миколаєві, так і в Миколаївській області. Дані проведених молекулярно-генетичних досліджень підтвердили унікальність

циркулюючих в Миколаївській області штамів МБТ, оскільки стійкість їх до рифампіцину визначається мутаціями, що рідко зустрічаються, не характерними для Одеської області (олігонуклеотидні заміни в області гена *rrpO B*). Наступними за частотою виділення в 2000 і 2001 рр. були штами, резистентні до піразинаміду, надалі в 2002–2003 рр. їх змінили етамбутол-резистентні штами і збільшилася кількість штамів, резистентних до етамбутолу. Найменш інтенсивно з'являлися стійкі штами до канаміцину (див. рис. 3.6-3.9), який використовується в схемах лікування хворих, які виділяють стійкі штами МБТ до препаратів I ряду [196].

Аналіз перехресної стійкості штамів *M. tuberculosis*, виділених від хворих контрольної групи, до протитуберкульозних препаратів, засвідчив найбільшу кількість резистентних штамів до стрептоміцину та ізоніазиду (див. табл. 4.11).

Звертають на себе увагу дані, отримані в ході ретроспективних і проспективних досліджень вивчення розвитку резистентності до окремих препаратів II ряду (канаміцину й етіонаміду). Так, різноманіття штамів, як і їх велика кількість, більше спостерігаються у хронічних хворих, що пов'язано з результатами проведеної антимікобактеріальної терапії; а також у хворих на туберкульоз — жителів Миколаївської області, при проведенні лікування яких частіше відбуваються порушення режиму хіміотерапії (додаток Д).

Окремо було вивчено питання ефективності використання препаратів групи фторхінолонів, які використовуються в МОПТД для лікування хронічних хворих з резистентними формами туберкульозу і входять до групи резерву, але їх висока ефективність при лікуванні туберкульозного процесу, а також достатньо низькі рівні поширення штамів мікобактерій, стійких до фторхінолонів, вселяють надію на збільшення кількості хворих, які одужали. Однак вивчення перехресної стійкості до препаратів I й II ряду, виявленої у значної кількості штамів, показало, що більшість резистентних до фторхінолонів штамів є стійкими до 9 основних протитуберкульозних

препаратів, використовуваних у схемах лікування хворих на туберкульоз у МОПТД.

M. tuberculosis мають унікальні здатності розвитку мутацій, відповідальних за розвиток стійкості до протитуберкульозних препаратів [197], що продемонстрували дані ретроспективних і проспективних досліджень змін резистентності МБТ протягом розвитку епідеміологічного процесу протягом 2000–2005 рр. Широкий спектр поєднань і кількості протитуберкульозних препаратів I й II ряду, до яких сформувалася стійкість збудника туберкульозу, демонструють високий потенціал появи мутацій в геномі *M. tuberculosis*, які викликають туберкульоз у жителів Миколаївської області. Швидкість мутаційних процесів непрямо характеризує ріст кількості полірезистентних штамів і комбінацій ПТП, до яких виділений штам МБТ є водночас стійким. Проведені дослідження геному *M. tuberculosis*, які викликають туберкульоз у жителів Миколаївської області, показали невисоку інтенсивність мутаційних процесів у популяції МБТ. Виявлені мутації в ділянці генів *kat G* и *inh A* відкрили молекулярно-генетичні основи розвитку резистентності штамів *M. tuberculosis* до ізоніазиду. Діагностована в ДНК штамів мікобактерій, виділених від хворих у Миколаївській області, мутація в 315-му кодоні являє собою міссенс-мутацію (сер-тир), ця мутація найчастіше спостерігається в гені *kat G*. В цілому мутації в гені *kat G* мають не менше 70 %, а за деякими оцінками — не менше 85 % стійких до ізоніазиду штамів. У деяких випадках резистентність розвивається і за відсутності мутацій в гені *kat G*. Нерідко при цьому резистентність до ізоніазиду асоціюється зі стійкістю до етіонаміду. Виявилось, що близько 10 % фенотипічно стійких до ізоніазиду штамів мікобактерій мають мутації в гені *inh A*, що експресується при синтезі білків клітинної стінки.

Мутації, що зачіпають 511–533-й кодон висококонсервативного гена *rpo B*, відповідальні за розвиток стійкості до рифампіцину (95 % рифампіцин-стійких штамів, за даними літератури), у виділених штамів від хворих контрольної групи виявлені (олігонуклеотидні заміни в даному гені

відповідають за 36,8 % резистентних штамів). Це відповідає невисоким рівням поширеності рифампіцин-стійких штамів МБТ у Миколаївській області.

Однак наявність таких штамів *M. tuberculosis* підтверджують дані споліготипування, згідно з якими 18,4 % досліджуваних штамів, виділених від хворих контрольної групи, належать до сімейства Beijing, що асоціюється з мультирезистентністю. Природа розвитку резистентності до рифампіцину в штамів дикого типу (тобто позбавлених мутацій, wt=24), що становлять, за різними оцінками, від 4 до 12 %, залишається невідомою.

Не виявлено також мутації, які зачіпають ділянку гена *rnc A*, що експресує амідазу, під дією якої піразинамід гідролізується до активної по відношенню до мікобактерій туберкульозу сполуки —піризинової кислоти [199-201]. Це дозволяє ширше використовувати піразинамід у лікуванні хворих на туберкульоз у Миколаївській області, особливо враховуючи його виражений синергізм з рифампіцином й ізоніазидом.

Дані, отримані в ході проспективних молекулярно-генетичних досліджень, дозволили розкрити механізм значного поширення в популяції *M. tuberculosis* в Миколаївській області стрептоміцин-резистентних штамів. За наявними даними, в 60 % випадків стійкість до стрептоміцину мікобактерій туберкульозу зумовлена мутаціями в генах *rps L* і *rrs*[199]. Дані мутації не виявлені в геномі резистентних штамів *M. tuberculosis*. Можливо, ці штами входять у 40 % випадків резистентності до стрептоміцину у мікобактерій туберкульозу, яким поки що не знайдено пояснення.

Не потрапили в 68 % пояснених мутаціями в гені *emb B* резистентні до етамбутолу штами МБТ, виділені від хворих на туберкульоз контрольної групи. Етамбутол, декстро-2,2(етилдііміно)-ди-лонол, є високоефективним протимікобактеріальним засобом і останніми роками широко застосовується в терапії туберкульозу як препарат першого ряду. Ріст кількості резистентних штамів, спостережуваний протягом 2000–2004 рр., мабуть, пов'язаний з іншими механізмами розвитку стійкості до цього препарату.

Не визначалися в резистентних штаммах, виділених від хворих на туберкульоз контрольної групи, й мутації в генах *gyr A* і *gyr B*, відповідальних за стійкість до фторхінолонів, які почали використовувати останнім часом в терапії туберкульозу як резервні препарати. Рівні поширення резистентних штамів до цієї групи препаратів незначні, що дозволяє ширше використовувати їх для лікування хворих на туберкульоз в Миколаївській області.

При виявленні стійкості штамів мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів велике значення має час проведення досліджень. Отримані результати при використанні рекомендованих МОЗ України бактеріологічних методів тільки через 8–10 тиж після початку лікування дозволяють відкоригувати комбінацію протитуберкульозних препаратів, що приймаються хворим, а до цього часу в деяких категорій хворих закінчується курс інтенсивної фази лікування. Тому розробка і впровадження альтернативних, прискорених методів діагностики лікарсько-стійких форм МБТ на сучасному етапі розвитку епідемії туберкульозу є необхідними.

Порівняльний аналіз діагностики резистентних форм туберкульозу з використанням бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів дозволив зробити висновок про специфічність бактеріологічних методів на основі того, що не було жодного випадку хибнопозитивного результату, але стосовно чутливості традиційних методів спостерігалися значні розбіжності з даними, отриманими в ході молекулярно-генетичних досліджень, як у діагностиці видів резистентності, так і в кількості отриманих результатів про розвиток лікарської стійкості до ПТП. Розбіжність результатів становила 41,9 % в контрольній групі хворих (у 26 випадках із 62 проведених паралельно досліджень), що й характеризує чутливість бактеріологічних методів порівняно з молекулярно-генетичними. Ефективність традиційних методів характеризують розбіжності в отриманих результатах діагностики мультирезистентних форм туберкульозу. Бактеріологічні методи

дослідження виявили із 15 діагностованих резистентних форм МБТ у контрольній групі хворих 10 мультирезистентних; молекулярно-генетичні методи дозволили в цій самій групі хворих виявити 29 резистентних форм і 16 з них — мультирезистентних. Розбіжність в результатах становила 42 %.

У зв'язку з тим, що сучасний туберкульоз розширив контингент інфікованих осіб, у зміненій епідеміологічній ситуації необхідно застосовувати анкетування хворих, які надійшли на лікування, для створення бази даних груп ризику і отримання вихідних даних перед вибором терапії, що й підтвердили проведені проспективні дослідження з використанням розробленої анкети [202-208].

ВИСНОВКИ

1. Протягом досліджуваного періоду (2000–2005 рр.) ріст захворюваності на туберкульоз у Миколаївській області України (з 82,6 до 110,0 на 100 тис. населення) поєднується зі збільшенням первинної (з 3,15 до 4,09 %) і набутої (з 16,8 до 23,3 %) резистентності мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів першого ряду при наростанні кількості виділених полірезистентних (у первинних хворих — в 1,74; у хронічних — в 1,8 разу) і мультирезистентних штамів *M. tuberculosis* (з 9,8 до 19,5 %). На цьому фоні зростає кількість (від 2 до 14) і різноманіття поєднань (від 2 до 29) протитуберкульозних препаратів, до яких є водночас стійким виділений від конкретного хворого штам МБТ.

2. Порівняльний аналіз діагностики резистентності досліджуваних штамів *M. tuberculosis* з застосуванням бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів досліджень показав, що молекулярно-генетичні методи значно вищі за чутливістю при визначенні резистентності МБТ (в 1,93 рази), при визначенні мультирезистентності *M. tuberculosis* (в 1,61 рази) і за ефективністю (на 34,6 %).

3. Встановлено, що в основі розвитку такого високого рівня резистентності штамів МБТ, виділених від хворих у Миколаївській області, лежать молекулярно-генетичні зміни геному *M. tuberculosis*, а саме: частота мутацій у генах МБТ, відповідальних за розвиток лікарської стійкості до рифампіцину (область гена *rpo B*), становила 36,8 %, до ізоніазиду (область гена *kat G*) — 44,7 %, до етіонаміду (область гена *Inh A*, також пов'язана з резистентністю до ізоніазиду) — 15,7 %. У різноманітті виділених від хворих штамів мікобактерій туберкульозу, стійких до протитуберкульозних препаратів I, II ряду і резервних препаратів, протягом досліджуваного періоду превалював штам МБТ, стійкий до комбінації стрептоміцин+ізоніазид (препаратів першого ряду) — 43,9 %.

Звертає на себе увагу низька (18,4 %) частота зустрічальності поширених у сусідніх регіонах України та інших країнах Східної Європи штамів МБТ, що належать до сімейства Beijing.

4. Дослідження довели, що у Миколаївській області резистентність *M. tuberculosis* до окремих препаратів I–II ряду в 2003 р. становила: загальна — 28,18 % (у первинних хворих — 2,55 %; у хронічних хворих — 25,6 %). Стійкість до препаратів групи фторхінолонів становила: 1,5 % — до левофлоксацину; 2,3 % — до ципрофлоксацину. Спостерігається тенденція до росту кількості резистентних штамів, виділених у первинних хворих, до основних ПТП (до 4,09 %). Виявлено перехресну стійкість: більше 90 % левофлоксацин-резистентних штамів одночасно стійкі до 9 інших основних ПТП, крім ПАСК. Штами, резистентні до ципрофлоксацину, давали найвищі рівні перехресної стійкості до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу й піразинаміду (по 84,2 %), а також до циклосерину (78,9 %).

5. Ефективність протитуберкульозної терапії підвищується при використанні вихідних даних, отриманих із розробленої нами в ході проспективних досліджень анкети. Така анкета може бути рекомендована для проведення аналізу епідеміологічної обстановки з туберкульозу в Миколаївській області України і створення бази даних за групами ризику.

6. Дослідження показали, що найефективнішим поєднанням антимікобактеріальних препаратів є комбінація стрептоміцин + ізоніазід + рифампіцин + піразинамід. Одування в групі хворих з абациллярними формами туберкульозу становило 65,1 %, а в групі хворих, у яких виділено чутливі до зазначеної комбінації препаратів штами *M. tuberculosis*, — 45 %. В групі хворих, що раніше приймали антимікобактеріальні препарати, в яких виділено резистентні штами *M. tuberculosis*, найменш ефективним було поєднання препаратів із тих, що були в наявності, — ізоніазід, рифампіцин, етамбутол, канаміцин, етіонамід+препарат із групи фторхінолонів (одування спостерігалось тільки в 10 %, прогресування захворювання — в 60 %, летальний кінець — в 30 % випадків).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Christopher Dye. Global epidemiology of tuberculosis // *Lancet*. — 2006. — Vol. 367, March 18. — P. 938-940.
2. Информационный бюллетень ко Всемирному дню борьбы с туберкулезом в 2006 году (www.ifp.kiev.ua).
3. Самойлова А. Г., Марьяндышев А. О. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза — актуальная проблема фтизиатрии (обзор литературы) // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. — 2005. — № 7. — С. 3-9.
4. Gupta R., Espinal M., Raviglione M. Tuberculosis as a major global health problem in the XXI century, a WHO perspective // *Seminars in respiratory and critical med.* — 2004. — Vol. 24, N 3. — P. 245-253.
5. Фещенко Ю. И. Ситуация с туберкулезом в Украине // *Доктор*. — 2002. — № 4. — С. 11-14.
6. Фещенко Ю. И., Мельник В. М., Кобилянська А. В. Основні тенденції динаміки статистичних показників з туберкульозу в Україні за останні 10 років // *Укр. пульмонол. журнал*. — 2000. — № 4. — С. 5-9.
7. Фещенко Ю. И., Мельник В. М. Туберкульоз легень в період епідемії і епідеміологічні, клініко-діагностичні, лікувально-профілактичні та організаційні аспекти. — К.: Логос, 1998. — 284 с.
8. Степанишин Ю. Г., Степанишина В. Н., Шемякин И. Г. Лекарственно-устойчивые штаммы *M. tuberculosis* и их эпидемическая значимость // *Журн. микробиол., эпидемиологии и иммунологии*. — 1999. — № 3. — С. 84-89.
9. Туберкулез сегодня: особенности возбудителя, клиника и лечение / Л. А. Скворцов, М. В. Павлов, Н. В. Сапожников и др. // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. — 2005. — № 11. — С. 6-9.
10. Новожилова И. А. Значимость определения лекарственной устойчивости для успешного лечения туберкулеза // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. — 2004. — № 4. — С. 29-31.

11. Ситуація з полірезистентного та мультирезистентного туберкульозу в м. Києві / О. А. Журило, Л. В. Турченко, М. Т. Клименко та ін. // Укр. пульмонолог. журнал. — 2002. — № 3. — С. 36-39.
12. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу, що були виділені від хворих в Миколаївській області України протягом 2000–2002 рр. / Н. А. Левицька, Ю. І. Бажора, В. В. Ніколаєвський, О. К. Асмолов // Укр. пульмонолог. журнал. — 2003. — № 4. — С. 17-20.
13. Бялик И. Б. Современная фармакотерапия туберкулеза // Журн. практ. лікаря. — 1999. — № 2. — С. 45-49.
14. Возможности режимов полихимиотерапии в предупреждении лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза и повышении результатов лечения больных деструктивным туберкулезом легких / И. Б. Бялик, Л. М. Цыганова, Ж. Е. Вялых, Н. А. Литвиненко // Укр. пульмонолог. журнал. — 2003. — № 2. — С. 84-86.
15. Застосування фторхінолонів для лікування туберкульозу легень: Метод. рекомендації / Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського, Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. — К., 2000. — 14 с.
16. Стандарти діагностики і лікування туберкульозу: Метод. рекомендації / Академія медичних наук України, МОЗ України, Державний департамент України з питань виконання покарань, Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. — К., 2004. — 63 с.
17. Петренко В. М., Черенько С. А. Современные методы лечения химиорезистентного туберкулеза (научный доклад на заседании Ученого совета) (www.ifp.kiev.ua).
18. Udhwadia Z., Almedia D., Rodrigues C. Fluoroguinolone resistant tuberculosis in Bombay. Germany // *Tuber. and Lung Diseases*. — 2001. — Vol. 5, N 11. — Suppl. 1. — P. 79-80.

19. Діагностика стійкості мікобактерій туберкульозу до фторхінолонів / О. К. Асмолов, Н. А. Левицька, В. В. Ніколаєвський, Ю. І. Бажора // Укр. хіміотер. журнал. — 2004. — № 1–2 (19). — С. 44-47.
20. Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002 «Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції» (складена під керівництвом Фещенко Ю. І., Журило О. А., Клименко М. Т. та ін. // Збірник нормативно-директивних документів з охорони здоров'я. — 2002. — № 2. — С. 63-111.
21. Молекулярно-генетические механизмы туберкулезной инфекции / Ю. И. Бажора, В. И. Кресюн, Ю. И. Фещенко и др. — Одесса: Одесский медуниверситет, 2005. — 259 с.
22. Perkins M. D. Progress and pitfalls in TB diagnostics development // 4-th World Congress on tuberculosis: Abstract book. — Washington, DC, USA, 2002. — P. 24-25.
23. Сравнительное изучение эффективности разных методов диагностики туберкулеза / Т. Ю. Салина, Т. И. Морозова, Т. А. Федотов и др. // Пробл. туберкулеза. — 2000. — № 2. — С. 43-44.
24. Выявление микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции с одновременной идентификацией вида *M. tuberculosis* / А. Б. Беклемишев, Е. М. Хорошева, Н. Ю. Номоконова и др. // Клин. лабор. диагностика. — 2001. — № 7. — С. 50-53.
25. De Riemer K., Daley Ch. Tuberculosis transmission based on molecular epidemiology research // Seminars in respiratory and critical med. — 2004. — Vol. 24, N 3. — P. 297-306.
26. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA / Helen D. Donoghue, Mark Spigelman, Charles L. Greenblatt et al. // Lancet. — 2004. — Vol. 4 (9), September. — P. 584-592.
27. Kaufmann S. H. E., Schaible U. E. 100-th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus // Trends Microbiol. — 2005. — Vol. 13 (10). — P. 469-475.

28. Raviglione M. Global epidemiology of tuberculosis // *Tuberc. and Lung Diseases*. — 2001. — Vol. 5, N 11. — Suppl. 11. — P. 7-8.
29. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes / I. Filliol, J. R. Driscoll, D. Van Soolingen et al. // *Emerg. Inf. Dis.* — 2002. — Vol. 8 (11). — P. 1347-1350.
30. Sola C., Rastogi N. Genetic description and frequency maps of some major families of *Mycobacterium tuberculosis* // *Molecular Epidemiology and Population Genetics of Tuberculosis*. — Kuala Lumpur: Academy of Sciences of Malaysia, 2005. — P. 315-318.
31. Global Trends in Resistance to Antituberculosis Drugs / M. A. Espinal, A. Laszlo, L. Simonsen et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344. — P. 1294-1300.
32. *Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis compared to IS6 110-based restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis* / P. M. Hawkey, E. G. Smith, J. T. Evans et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41 (8). — P. 3514-3520.
33. Мельник В. М. Стратегія раннього виявлення хворих на туберкульоз легень: організаційно-методичні аспекти // *Журн. практ. лікаря*. — 2002. — № 4. — С. 2-9.
34. Немцова Е. С., Казенный Б. Я. Эффективность культурального и бактериоскопического методов у больных с впервые выявленным туберкулезом легких // *Пробл. туберкулеза*. — 2001. — № 5. — С. 40-41.
35. Лабораторна діагностика туберкульозу легень / В. М. Мельник, П. М. Дорошенко, Ю. М. Валецький та ін. // *Журн. практ. лікаря*. — 2003. — № 2. — С. 30-32.
36. Черенько С. О. Тривалість хіміотерапії хворих на туберкульоз легень з мультирезистентними мікобактеріями туберкульозу // *Укр. мед. часопис*. — 2000. — № 5 (19). — С. 127-129.

37. Нечаева О. Б., Скачкова Е. И. Причины и факторы формирования лекарственной устойчивости при туберкулезе легких // Пробл. туберкулеза. — 2003. — № 2. — С. 6-8.
38. Карачунский М. А. Туберкулез в наши дни // Мед. сестра. — 2002. — № 3. — С. 21-23.
39. Лечение лекарственно-резистентного туберкулеза: Пособие для врачей-фтизиатров / НИИ фтизиопульмонологии Московской мед. академии им. И. М. Сеченова; Под ред. М. И. Перельмана. — М.: Медицина, 2002. — 76 с.
40. L.V. Heifets. From book: Victor L. Antimicrobial Therapy and Vaccine. Vol. 2. Antimicrobial Agents. 2 Ed. 2005. S. 391-401.
41. Drug monitoring and multiple drug resistance / S. Mitarai et al. // Tuberc. and Lung Diseases. — 2004. — N 11. — Suppl. 1. — P. 65.
42. Туберкулез: Руководство для врачей / Под ред. А. Г. Хоменко. — М.: Медицина, 1996. — 493 с.
43. Assessment of the interleukin 1 gene cluster and other candidate gene polymorphisms in host susceptibility to tuberculosis / R. Bellamy, C. Ruwende, T. Corrah et al. // Tuberc. Lung. Dis. — 1998. — Vol. 79. — P. 83-89.
44. Mycobacterium africanum subtype II is associated with two distinct genotypes and is a major cause of human tuberculosis in Kampala, Uganda / S. Nieman, S. Rusch-Gerdes, M. L. Joloba et al. // J. Clin. Microbiol. — 2002. — Vol. 40. — P. 3398-3405.
45. Biology of pathogenic mycobacteria in water / G. A. Cangelosi, J. Clark-Curtiss, M. A. Behr et al. // Pathogenic Mycobacteria in Water / Ed. J. Bartram. — Geneva: WHO and USEPA, 2003.
46. Molecular mechanism of drug inhibition by DNA gyrase / R. J. Lewis, F. T. F. Tsai, D. B. Wigley et al. // Bioessays. — 1996. — Vol. 18. — P. 661-671.
47. Mehrotra J., Bishai W. R. Regulation of virulence genes in Mycobacterium tuberculosis // Int. J. Med. Microbiol. — 2001. — Vol. 291. — P. 171-182.

48. Kramnik I., Dietrich W. F., Demant P. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 8560-8565.

49. An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence / E. Perez, S. Samper, Y. Bordas et al. // *Mol. Microbiol.* — 2001. — Vol. 41. — P. 179-187.

50. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2003. — Vol. 16 (3). — P. 463-496.

51. Single-Nucleotide Polymorphism-Based Population Genetic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Strains from 4 Geographic Sites / M. M. Gutacker, B. Mathem, H. Soini et al. // *J. Infect. Dis.* — 2006. — Vol. 193 (1). — P. 121-128.

52. Тунгусова О. С., Марьяндышев О. А. Молекулярные механизмы формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (обзор литературы) // *Пробл. туберкулеза.* — 2001. — № 6. — С. 48-49.

53. Епідеміологія, діагностика та лікування хіміорезистентного туберкульозу органів дихання / Ю. І. Фещенко, В. М. Петренко, С. О. Черенько та ін. // *Укр. пульмонол. журнал.* — 2002. — № 4. — С. 5-12.

54. Клименко М. Т., Чернушенко Е. Ф. Методы выявления и исследования биологических особенностей измененных микобактерий туберкулеза (L-форм) // *Лабор. диагностика.* — 1999. — № 2. — С. 41-44.

55. Чернушенко Е. Ф., Клименко М. Т., Журило А. А. Диагностика персистенции микобактерий туберкулеза // *Лабор. диагностика.* — 2000. — № 3. — С. 49-54.

56. Идентификация L-форм микобактерий туберкулезного комплекса с применением полимеразной цепной реакции / Е. Б. Вишневская, А. П. Бобченко, Н. Н. Мельникова, Б. И. Вишневский // *Пробл. туберкулеза.* — 2001. — № 4. — С. 38-40.

57. Ginsburg A. S., Grosset J. H., Bishai W. R. Fluoroguinolones, tuberculosis and resistance // *J. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 3. — P. 432-442.

58. Lodenkemper R., Sagebiel D., Brendel A. Strategies against multidrug-resistant tuberculosis // *Eur. Respir. J.* — 2002. — Vol. 20. — Suppl. 36. — P. 66-67.
59. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis. Treatment outcomes in 6 countries / M. A. Espinal, S. J. Kim, P. O. Suarez et al. // *JAMA.* — 2000. — Vol. 283. — P. 2537-2545.
60. Drug-resistant tuberculosis in Germany / M. Frossborn, D. Sagebie, B. Hauer, R. Loddenkemper // *Tuberc. and Lung Dis.* — 2001. — Vol. 5, N 11. — Suppl. 1. — P. 83-84.
61. Пухлик Б. М. Проблема химиорезистентного туберкулеза и пути ее решения // *Укр. хіміотерапевт. журнал.* — 1999. — № 2. — С. 37-42.
62. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis / F. A. Drobniowski, M. Caws, A. Gibson et al. // *Lancet Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 3 (3). — P. 141-147.
63. Перельман М. И. Туберкулез в России // *Consillium medicum.* — 2001. — Т. 3, № 12. — С. 12-20.
64. Выявление микобактерий туберкулеза различными методами / Е. М. Скрыгина, О. М. Залуцкая, А. Рот и др. // *Пробл. туберкулеза.* — 2001. — № 3. — С. 56-58.
65. Голышевская В. И., Севастьянова Э. В., Воронина Г. А. Определение лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* методами пропорций и абсолютных концентраций // *Пробл. туберкулеза.* — 2001. — № 3. — С. 51-53.
66. European Database Health for All, European World Health Organization Bureau, Copenhagen, Denmark, 2003 (www.euro.who.int/hfadb).
67. Small P. M. Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS // *Tuberc. and Lung Dis.* — 1999. — Vol. 3, N 11. — P. 949-955.
68. Борисов С. Е. Диагностика туберкулеза: возможности и пределы // *Пробл. туберкулеза.* — 2001. — № 3. — С. 5-9.
69. Watterson S. A., Drobniowski F. A. Modern laboratory diagnosis of mycobacterial infections // *J. Clin. Pathol.* — 2000. — Vol. 53. — P. 727-732.

70. Молекулярная характеристика полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* из России / Э. В. Генерозов, Т. А. Акопиан, В. М. Говорун и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2000. — № 1. — С. 11-16.

71. Tuberculosis as a occupational hazard for health care workers in Estonia / A. Kruuner, M. Danilovitsh, L. Pehme et al. // Tuberc. and Lung Diseases. — 2001. — Vol. 1, N 3. — P. 170-177.

72. Анализ факторов риска возникновения лекарственной устойчивости у больных туберкулеза гражданского и пенитенциарного секторов в Самарской области России / Я. М. Балабанова, М. Радди, К. Грэм и др. // Проблемы туберкулеза и болезни легких. — 2005. — № 5. — С. 25-31.

73. Фещенко Ю. І., Мельник В. М. Стан і проблеми протитуберкульозної допомоги населенню України та шляхи її поліпшення // Укр. пульмонолог. журнал. — 2004. — № 2. — С. 6-11.

74. Harries A. D., Chimzizi R., Zachariah R. Safety, effectiveness and outcomes of concomitant use of highly active antiretroviral therapy with drugs for tuberculosis in resource-poor settings // Lancet. — 2006. — Vol. 367, March 18. — P. 944-950.

75. Стратегія лікування хворих на мультирезистентний туберкульоз легень: Методичні рекомендації / Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського, Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. — К., 2003.

76. Диспансерні категорії контингенту протитуберкульозних закладів / Ю. І. Фещенко, В. М. Петренко, В. М. Мельник та ін. // Укр. пульмонолог. журнал. — 2002. — № 4. — С. 12-17.

77. Епідеміологія, діагностика та лікування хіміорезистентного туберкульозу органів дихання / Ю. І. Фещенко, В. М. Петренко, С. О. Черенько та ін. // Укр. пульмонолог. журнал. — 2002. — № 4. — С. 5-12.

78. Николаевский В. В., Бажора Ю. И. Выявление лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза молекулярно-генетическими методами // Буковин. мед. вісник. — 2003. — № 3. — С. 137-144.

79. Иртуганова О. А., Смирнова Н. С., Слогодкая Л. В. Автоматизированные методы культурального определения *M. tuberculosis* на жидких средах. — 2001. — № 3. — С. 53-55.

80. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection / T. Lillebaek, A. Dirksen, I. Baess et al. // *J. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 185. — P. 401-404.

81. Rattan A., Kalia A., Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives // *Emerging Infections Diseases.* — 1998. — Vol. 4, N 2. — P. 846-848.

82. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics / C. Sola, I. Filliol, E. Legrand et al. // *Infection. Genetics and Evolution.* — 2003. — Vol. 3. — P. 125-133.

83. Николаевский В. В., Бажора Ю. И. Молекулярно-генетическое типирование микобактерий // *Досягнення біології та медицини.* — 2004. — № 1 (3). — С. 28-35.

84. Frieden T. R., Lemer B. H., Rutherford B. R. Lessons from the 1800s: tuberculosis control in the new millennium // *Lancet.* — 2000. — Vol. 355. — P. 1088-1092.

85. Использование молекулярно-биологических методов для индивидуальной характеристики штаммов *M. tuberculosis* / И. Г. Шемякин, В. Н. Степашина, О. К. Манзенюк и др. // *Журн. микробиол., эпидемиологии и иммунологии.* — 2000. — № 2. — С. 6-11.

86. Abel L., Casanova J. L. Genetic predisposition to clinical tuberculosis: bridging the gap between simple and complex inheritance // *Am. J. Hum. Genet.* — 2000. — Vol. 67. — P. 274-277.

87. Exogenous re-infection as a cause of recurrent tuberculosis in a low-incidence area / A. S. de Boer, M. W. Borgdorff, E. Vynnycky et al. // *Tuberc. and Lung Diseases*. — 2003. — Vol. 7. — P. 145-52.

88. Exogenous reinfection with tuberculosis on a European island with a moderate incidence of disease / J. A. Caminero, M. J. Pena, M. I. Campos-Herrero et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 163. — P. 717-720.

89. Abbott A. Live lung tissue enlisted in fight against tuberculosis // *Nature*. — 2002. — Vol. 415. — P. 823.

90. Stead W. W. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? // *Ann. Intern. Med.* — 1995. — Vol. 116. — P. 937-941.

91. Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family / O. S. Toungousova, A. Mariandyshev, G. Bjune et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 37 (5). — P. 665-672.

92. Трансмиссия штаммов микобактерий туберкулеза, обусловленная миграционными процессами в Российской Федерации / С. Н. Андреевская, Л. Н. Черноусова, Т. Г. Смирнова и др. // *Пробл. туберкулеза и болезни легких*. — 2006. — № 1. — С. 29-35.

93. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography / I. Mokrousov, H. M. Ly, T. Otten et al. // *Genome Res.* — 2005. — Vol. 15 (10). — P. 1357-1364.

94. Ohata R., Tada A. Beijing family and other genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Okayama district // *Kekkaku*. 2004. — Vol. 79 (2). — P. 47-53.

95. Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family / O. S. Toungousova, A. Mariandyshev, G. Bjune et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 37 (5). — P. 665-672.

96. Drug monitoring and multiple drug resistance / S. Mitarai et al. // *Tuberc. and Lung Diseases*. — 2004. — N 11. — P. 65.
97. Туберкулез сегодня: особенности возбудителя, клиника и лечение / Л. А. Скворцова, М. В. Павлова, Н. В. Сапожникова и др. // *Пробл. туберкулеза*. — 2005. — № 11. — С. 6-9.
98. Тунгусова О. С., Марьяндышев А. О., Каугант Д. А. Влияние лекарственной устойчивости на фитнес микобактерий туберкулеза генотипа W-Beijing // *Пробл. туберкулеза и болезней легких*. — 2005. — № 8. — С. 46-50.
99. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography / I. Mokrousov, H. M. Ly, T. Otten et al. // *Genom Res*. — 2005. — Published electronically at [http://www/genome.org](http://www.genome.org).
100. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Southern Ukraine: drug resistance rates and prevalence of Beijing strain / V. V. Nikolayevskyy, T. I. Brown, N. A. Levitska et al. — Abstr. 14 European Congress of Clinical Microbiology. — Prague, 2004. — P. 81.
101. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance / A. C. Fluit, M. R. Visser, F. J. Schmitz et al. // *Clin. Microbial. Rev.* — 2001. — Vol. 14. — P. 836-871.
102. Evolutionary relationships amongst isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with few copies of IS6110 / J. W. Dale, H. Al-Ghusein, S. Al-Hasmi et al. // *J. Bacteriol.* — 2003. — Vol. 185 (8). — P. 2555-2562.
103. Calculation of the stability of the IS6110 banding pattern in patients with persistent *Mycobacterium tuberculosis* disease / R. M. Warren, G. D. van der Spuy, M. Richardson et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 1705-1708.
104. Genetic Diversity of *Mycobacterium africanum* Clinical Isolates Based on IS6110-Restriction Fragment Polymorphism Analysis, Spoligotyping and Variable

Number of Tandem DNA Repeats / C. Viana-Niero, C. Gutierrez, C. Sola et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 57-65.

105. Использование молекулярно-биологических методов для индивидуальной характеристики штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / И. Г. Шемякин, В. Н. Степашина, О. Ю. Манзенюк и др. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии.* — 2000. — № 2. — С. 6-11.

106. Имангулова М. М., Карунас А. С., Хуснутдинова Э. К. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких // *Мед. генетика.* — 2005. — № 11. — С. 505-511.

107. Молекулярная характеристика полирезистентных клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* из России / Э. В. Генерозов, Т. А. Акопиан, В. М. Говорун и др. // *Молек. генетика, микробиология и вирусология.* — 2000. — № 1. — С. 11-17.

108. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mumbai, India / S. Kulkarni, C. Sola, I. Filliol et al. // *Res. Microbiol.* — 2005. — Vol. 156 (4). — P. 588-596.

109. Показники стійкості мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів першого ряду в Одесі та Одеській області / В. В. Ніколаєвський, В. Й. Кресюн, К. О. Прудникова, А. К. Асмолов // *Одес. мед. журнал.* — 2004. — № 3. — С. 59-62.

110. Молекулярная эпидемиология туберкулеза / О. В. Нарвская, И. В. Мокроусов, Е. В. Лимещенко и др. // *Большой целевой журнал о туберкулезе.* — 2000. — № 7-8. — С. 4-6.

111. Тестирование лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза с использованием различных методов / Е. М. Скрыгина, О. М. Залуцкая, А. Рот и др. // *Пробл. туберкулеза.* — 2001. — № 5. — С. 43-45.

112. Rifamping and Multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family / F. A. Drobniowski, Y. M. Balabanova, M. Ruddy et al. // *Emerg. Infect. Dis.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1320-1326.

113. Левицкая Н. А., Бажора Ю. И. Распространение мультирезистентного и полирезистентного туберкулеза в Николаевской области Украины // Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. «Розвиток наукових досліджень 2005». — Полтава, 2005. — С. 46-49.
114. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis / C. Dye, M. A. Espinal, C. J. Watt et al. // *J. Infekt. Dis.* — 2002. — Vol. 185, N 4. — P. 1197-1202.
115. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis / F. A. Drobniowski, M. Caws, A. Gibson et al. // *Lancet.* — 2003. — Vol. 3 (3). — P. 141-147.
116. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology / J. D. Embden van der, M. D. Cave, J. T. Crawford et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1993. — Vol. 31. — P. 406-409.
117. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection / J. L. Flynn, J. Chan et al. // *J. Exp. Med.* — 1993. — Vol. 178 (6). — P. 2249-2254.
118. Bellamy R. Susceptibility to mycobacterial infections: the importance of host genetics // *Genes and Immunity.* — 2003. — Vol. 4. — P. 4-11.
119. Duncan K. Progress in drug development and what's still needed // 4-th World Congress on tuberculosis: Abstract book. — Washington, DC, USA, 2002. — P. 23.
120. Мишин В. Ю. Современные режимы химиотерапии туберкулеза легких, вызванного лекарственно-чувствительными и лекарственно-резистентными микобактериями // *РМЖ.* — 2003. — Т. 11, № 21. — С. 5-9.
121. Mitchison D. Antibacterial therapy of TB: acknowledgement of modern treatment methods // *Seminars in Resp. and Critic. Care Med.* — 2004. — Vol. 25, N 3. — P. 307-315.
122. Мишин В. Ю. Современная стратегия лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких // *Лечащий врач.* — 2000. — № 3. — С. 4-9.

123. Лечение туберкулеза: рекомендации для национальных программ: Пер. с англ. — Женева: ВОЗ, 1998. — 77 с.
124. Рекомендации по лечению резистентных форм туберкулеза легких: Пер. с англ. — Женева: ВОЗ, 1998. — 47 с.
125. Sbarbaro J. A. Treatment and eradication of multidrug-resistant tuberculosis // *Chest*. — 2001. — Vol. 120, N 8. — P. 536-539.
126. Yew W. W. Management of multidrug-resistant tuberculosis: chemotherapy and beyond // *Clin. Pulm. Med.* — 2001. — Vol. 8, N 5. — P. 265-272.
127. Global distribution of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes / I. Filliot, J. R. Driscoll, D. van Soolingen et al. // *Emerg. Inf. Dis.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1347-1349.
128. Long-term molecular analysis of tuberculosis strains in Alabama, a state characterized by a largely indigenous, low-risk population / M. C. Kempf, N. E. Dunlap, K. H. Lok et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43 (2). — P. 870-878.
129. Espinal M. A. Global situation of MDR-TB // 4-th World Congress on tuberculosis: Abstract book. — Washington, DC, USA, 2002. — P. 3.
130. Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe / V. Schwebel, M. L. Moro, F. Drobniewski et al. // *Eur. Respir. J.* — 2000. — Vol. 16. — P. 364-371.
131. Global Trends in Resistance to Antituberculosis Drugs / M. A. Espinal, A. Laszlo, L. Simonsen et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2001. — Vol. 344. — P. 1294-1300.
132. Standard Short-Course Chemotherapy for Drug-Resistant Tuberculosis Treatment Outcomes in 6 countries / Espinal Marcos A., Suarez Pedro J. et al. // *JAMA*. — 2000. — Vol. 283, N 19. — P. 2537-2545.
133. Листопад А. Рынок противотуберкулезных препаратов в Украине // *Провизор*. — 2000. — № 1. — С. 15-19.

134. Family-member DOTS and community DOTS for tuberculosis control in Nepal: cluster-randomised controlled trial / J. N. Newell, S. C. Baral, S. B. Pande et al. // *Lancet*. — 2006. — Vol. 367. — P. 903-909.

135. Tuberculosis in sub-Saharan Africa: opportunities, challenges, and change in the era of antiretroviral treatment / E. L. Corbett, B. Marston, G. J. Churchyard et al. // *Lancet*. — 2006. — Vol. 367. — P. 926-937.

136. Александріна Т. А. Епідеміологічна ситуація в Україні щодо туберкульозу у поєднанні з ВІЛ-інфекцією та СНІДом // *Укр. хіміотерапевт. журнал*. — 2003. — № 3-4.

137. Coker R., Miller R. HIV-associated tuberculosis // *Br. Med. J.* — 1997. — Vol. 314. — P. 1847.

138. Нанн П. Глобальный подход к борьбе с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. — 2005. — № 10. — С. 13-16.

139. Глобальный подход к борьбе с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом. Отдел борьбы с туберкулезом, ВОЗ, Женева // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. — 2005. — № 10. — С. 13-16.

140. Эпидемиология ВИЧ-инфекции в Российских регионах в 2004 г. / В. В. Покровский, Н. Н. Ладная, Е. В. Соколова и др. // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. — 2005. — № 10. — С. 3-13.

141. Туберкульоз легень у ВІЛ-інфікованих / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник, В. П. Мельник, О. М. Леоненко // *Журн. АМН України*. — 2000. — Т. 6, № 4. — С. 809-814.

142. Drug-resistant tuberculosis in HIV-infected patients, Peru 1999-2001 / L. Ascenios, L. Vasgues, N. Quispe et al. // *Tuberc. and Lung Diseases*. — 2002. — Vol. 6, N 10. — Suppl. 1. — P. 176-177.

143. Застосування методів ДНК-аналізу у лабораторній діагностиці туберкульозу і мікобактеріозів / В. В. Ніколаєвський, Ю. І. Бажора, К. О. Прудникова, Н. А. Левицька // *Одес. мед. журнал*. — 2002. — № 4 (72). — С. 18-21.

144. Чернушенко К. Ф., Клименко М. Т., Журило О. А. Мікробіологічна діагностика туберкульозу в сучасних умовах // Журн. практ. лікаря. — 2000. — № 3. — С. 13-18.

145. Molecular typing of *Micobacterium tuberculosis* based on variable number of tandem DNA repeats used alone and in association with spoligotyping / I. Filliol, S Ferdinand, L. Negroni et al. // *J. Clin. Vicrobiology*. — 2000. — Vol. 38. — P. 2520-2524.

146. Genetic diversity determined on the basis of *katG463* and *gyrA95* polymorphisms, spoligotyping, and IS6110 typing of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Italy / N. Lari, L. Rindi, C. Sola et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43. — P. 1617-1624.

147. Isoniazid prophylaxis among Alaskan Eskimos: a final report of the Bethel izoniazid / G. W. Comstock, C. Baum, D. E. Snider et al. // *Am. Rev. Respir. Dis.* — 1979. — Vol. 119. — P. 827-830.

148. Evaluation of the invader Assay, a linear signal Amplification method for identification of mutations associated with resistance to rifamping and izoniazid in *Mycobacterium tuberculosis* / R. C. Cooksey, B. P. Holloway, M. C. Oldenburg et al. // *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy*. — 2000. — Vol. 44. — P. 1296-1301.

149. Drobniowski F. A., Wilson S. M. The rapid diagnosis of izoniazid and rifamping resistance in *Mycobacterium tuberculosis* — a molecular story // *J. Med. Microbiol.* — 1998. — Vol. 467. — P. 189-196.

150. Molecular mechanism of drug inhibition by DNA gyrase / R. J. Lewis, F. T. F. Tsai, D. B. Wigley et al. // *Bioessays*. — 1996. — Vol. 18. — P. 661-671.

151. Характеристика чутливості *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину и изониазиду посредством определения мутаций в генах *pro B*, *kat G*, *inh A*, *oxy R*, *kas A* различными молекулярно-генетическими методами / О. И. Скотникова, К. Ю. Галкина, Е. Ю. Носова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2005. — № 8. — С. 42-45.

152. Iseman M. Important variables in the management of a large cohort of VDR-TB cases // *Tuberc. and Lung Diseases*. — 2004. — N 11. — P. 14-15.

153. Особенности механизма действия ломефлоксацина на микобактерии туберкулеза / Т. Н. Можокина, А. Д. Куничан, Т. Н. Левченко, Н. С. Смирнова // *Антибиотики и химиотерапия*. — 1998. — Т. 43, № 10. — С. 13-26.

154. Падейская Е. Н. Офлоксацин в терапии микобактериозов: обзор // *Антибиотики и химиотерапия*. — 1997. — Т. 42, № 11. — С. 26-31.

155. Черенько С. О., Клименко М. Т., В'ялих Ж. Е. Ефективність ломефлоксацину у лікуванні хворих на мультирезистентний туберкульоз легень // *Укр. пульмонолог. журнал*. — 2002. — № 4. — С. 38-41.

156. Гришин В. К., Полунина Т. Е. Ломефлоксацин в практике фтизиатра // *Антибиотики и химиотерапия*. — 1998. — № 10. — С. 17-18.

157. Outcomes of patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis treated with ofloxacin/levofloxacin containing regimens // *Chest*. — 2000. — Vol. 117. — P. 744-751.

158. Левицкая Н. А. Возникновение и распространение лекарственно устойчивых штаммов *M. tuberculosis* в Николаевской области Украины // *Матеріали міжнародної НПК «Наукові дослідження — теорія та експеримент 2006»*. — Полтава, 2006. — С. 45-49.

159. Молекулярно-генетические методы для выявления рифампицин-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / О. И. Скотникова, А. И. Соболева, В. М. Михайлович и др. // *Вестн. РАМН*. — 2002. — № 2. — С. 36-39.

160. Молекулярные механизмы устойчивости к рифампицину и изониазиду клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / В. Н. Степанишина, Е. А. Панферцев, Г. Н. Митрофанова и др. // *Пробл. туберкулеза*. — 2000. — № 1. — С. 32-36.

161. Molecular characterization of MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia and analysis of rifampin resistance using RNA\RNA

mismatch analysis as compared to the line probe assay and *rpoB* gene sequencing / I. Mokrousov, I. Filliol, E. Legrand et al. // *Res. Microbiol.* — 2002. — Vol. 153. — P. 212-219.

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

163. Маничева О. А. Некоторые аспекты определения чувствительности микобактерий туберкулеза к этамбутолу при использовании полужидкой среды // *Пробл. туберкулеза.* — 2003. — № 2. — С. 47-49.

164. Molecular identification of Streptomycin Mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis* related to Multidrug-Resistant W strain / P. Bifani, B. Mathema, M. Campo et al. // *Emerg. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 7. — P. 842-848.

165. Douglass J., Steyn L. M. A ribosomal gene mutation in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates // *J. Infect. Dis.* — 1993. — Vol. 167 (6). — P. 1505-1506.

166. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot / M. Finken, P. Kirshner, A. Meier et al. // *Mol. Microbiol.* — 1993. — Vol. 9 (6). — P. 1239-1246.

167. Detection of resistance to isoniazid, rifampin and streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods / I. Nachamkin, C. Kang, M. P. Weinstein et al. // *Clin. Infect. Dis.* — 1997. — Vol. 24. — P. 894-900.

168. Tackling poverty in tuberculosis control // *Lancet.* — 2005. — Vol. 366. — December. — P. 2063.

169. Perkins M. D., Roscigno G., Zumla A. Progress towards improved tuberculosis for developing countries // *Lancet.* — 2006. — Vol. 367. — March. — P. 942-943.

170. Molecular epidemiology of tuberculosis / P. Barnes, D. Cave et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 349. — P. 1149-1156.

171. Овсянкина Е. С., Касимцева О. В., Васильева И. А. Эффективность превентивной химиотерапии у детей и подростков из очагов бактериовыделения туберкулезной инфекции // Проблемы туберкулеза и болезни легких. — 2006. — № 1. — С. 3-5.
172. Perelman M. I. Tuberculosis in Russia // *Tuberc. and Lung Diseases*. — 2000. — Vol. 4, N 12. — P. 1097-1103.
173. Sekowitz K. A. Tuberculosis control in 21-st century // *Emerging inf. diseases*. — 2001. — Vol. 7, N 2. — P. 259-262.
174. Surveillance of HIV and tuberculosis drug resistance / L. J. Nelson, E. A. Talbot, M. J. Mwasekaga et al. // *Lancet*. — 2005. — Vol. 366. — P. 438-439.
175. Antituberculosis drug resistance and anonymous HIV surveillance in tuberculosis patients in Botswana, 2002 / L. J. Nelson, E. A. Talbot, M. J. Mwasekaga et al. // *Lancet*. — 2005. — Vol. 366. — P. 488-490.
176. Стійкість до специфічної терапії туберкульозної палички в хворих на туберкульоз Миколаївської області України / Н. А. Левицька, В. В. Ніколаєвський, В. М. Шишкін та ін. // Матеріали VII з'їзду ВУЛТ. — Тернопіль, 2003. — С. 81-82.
177. Мониторинг лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза в России за 1979–1998 гг. / И. Р. Дорожкова, С. А. Попов, И. М. Медведева и др. // *Пробл. туберкулеза*. — 2000. — № 5. — С. 19-22.
178. Blanchard J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in Mtb // *Ann. Rev. Biochemistry*. — 1996. — Vol. 65. — P. 215-239.
179. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes / T. R. Frieden, L. F. Sherman, K. L. Maw et al. // *JAMA*. — 1996. — Vol. 276. — P. 1229-1235.
180. Levy S. B. The challenge of antibiotic resistance // *Sci. Am.* — 1998. — Vol. 275. — P. 46-53.
181. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in a high-incidence community / van der A. Rie, R. Warren, I. Mshanga et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 636-641.

182. Ginsburg A. S., Grosset J. H., Bishai W. R. Fluoroguinolones, tuberculosis and resistance // *Lancet*. — 2003. — Vol. 3. — P. 432-442.

183. The rapid development of fluoroguinolone resistance in *M.tuberculosis* / A. S. Ginsburg, N. Hooper, W. H. Benjamin et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — Vol. 349. — P. 1977-1978.

184. Hutchison D. C. S., Drobntwski F. A., Milburn H. J. Management of multiple drug-resistant tuberculosis // *Respir. Medicine*. — 2003. — Vol. 97. — P. 65-70.

185. Кибрик Б. С., Челнокова О. Г. Некоторые особенности лекарственной резистентности микобактерий туберкулеза у больных с остро прогрессирующими деструктивными формами туберкулеза легких // *Пробл. туберкулеза*. — 2003. — № 3. — С. 3-5.

186. Прямой генетический анализ резистентности и рифампицину изолятов *M. tuberculosis* в образцах мокроты / Э. рВ. Генерозов, Т. А. Акопиан, М. А. Владимирский и др. // *Материалы 3-й Всероссийской конференции «Генодиагностики в современной медицине»*. — М., 2000. — С. 274-276.

187. Молекулярно-генетические методы для выявления рифампицин-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / О. И. Скотников, А. И. Соболева, В. М. Михайлович и др. // *Вестник Рос. АМН*. — 2002. — № 2. — С. 36-39.

188. Molecular Characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay / Z. Bártfal, A. Somoskövi, C. Ködmön et al. // *Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 3736-3739.

189. Detection of Rifampin Resistance in *Mtb* in a Single Tube with Molecular Beacons / H. H. El-Haji, S. A. E. Marras, S. Tyagi et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39, N 11. — P. 4131-4137.

190. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*) / B. J. Kim, S. H. Lee, M. A. Lyu et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 1999. — Vol. 37. — P. 1714-1720.

191. Detection of rifampicin-resistance mutation in Mtb / A. Telenti, P. Imboden, F. Marchesi et al. // *Lancet*. — 1993. — Vol. 341. — P. 647-650.
192. Characterization of rifampicin-resistance in pathogenic mycobacteria / D. L. Williams, C. Waguespack, K. Eisenach et al. // *Antimicrobial Agents Chemother.* — 1994. — Vol. 38. — P. 2386-2386.
193. Wilson T. M., Collins D. M. Gene involved in isoniazid resistance of the Mtb complex // *Molecular Microbiology*. — 1996. — Vol. 19, N 5. — P. 1025-1034.
194. European Database Health for All, European World Health Organization Bureau, Copenhagen, Denmark, 2003 (www.euro.who.int/hfadb).
195. A new evolutionary for the Mycobacterium tuberculosis complex / R. Brosch, S. V. Gordon, M. Marmiesse et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — Vol. 99. — P. 3684-3689.
196. План розширення програми DOTS для боротьби з туберкульозом. — Копенгаген: ВОЗ, Європейське регіональне бюро, 2002. — 42 с.
197. Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. WHO recommendation / B. P. Varelidiz, J. Grosser, I. de Kantor et al. // *Tuberc. and Lung Diseases*. — 1994. — Vol. 75. — P. 1-7.
198. Малюта С. С. Молекулярно-генетичні дослідження в діагностиці хвороб людини // *Лікування та діагностика*. — 2001. — № 3. — С. 9-13.
199. Honore N., Cole S. T. Streptomycin resistance in mycobacteria // *Antimicrob. Agents. Chemother.* — 1994. — Vol. 38 (2). — P. 238-242.
200. Konno K., Feldman F. M., McDermot W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity in tubercle basilli // *Am. Rev. Respirat. Dis.* — 1967. — Vol. 95. — P. 461-467.
201. Phenotypic Characterization of pncA mutants of Mtb / G. P. Morlock, J. T. Crawford, W. R. Butler et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2000. — Vol. 44-49. — P. 2291-2295.

202. Нанн П. Глобальный подход к борьбе с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2005. — № 10. — С. 13-16.

203. Susceptibility of mice deficient in CD14 or TLR4 to infection with *Mycobacterium tuberculosis* / S. M. Behar, C. C. Dascher, M. J. Grusby et al. // *J. Exp. Med.* — 1999. — Vol. 189. — P. 1937-1980.

204. The association between smoking and tuberculosis infection: a population survey in a high tuberculosis incidence area / Den Boon et al. // *Tuberc. and Lung Diseases.* — 2004. — Vol. 11. — Suppl. 1. — P. 231.

205. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes / I. Fillio, J. R. Driscoll, D. van Salinger et al. — 2002. — Vol. 8. — P. 1347-1349.

206. Левицкая Н. А. Анализ эпидемиологической ситуации с туберкулезом в Николаевской области Украины на основе результатов сполиготипирования выделенных штаммов микобактерий туберкулеза // Матеріали конференції "Біофізичні стандарти та інформаційні технології в медицині". — Одеса: Астропринт, 2006. — С. 60-61.

207. The Competitive Cost of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / Sebastien Gagneux, Clara Davis Long, Peter M. Smatt et al. // *Science.*-2006.-Vol.312.-P.1944-1946.

208. Extensively drug resistant tuberculosis as cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa / Neel R Gandhi, Anthony Moll, A Willem Sturm et al. // *The Lancet.*-2006.-Vol.368.-P.1575-1578.