

спортсменів // Сучасні досягнення валеології та спортивної медицини: Тези 5-ї Всеукр. наук.-практ. конф. — Одеса, 1999. — С. 123-124.

9. Вивчення фізичної працездатності у спортсменів / Є. Л. Михалюк,

А. М. Бражников, В. І. Лозовий та ін. // Медичні перспективи. — 2001. — Т. VI, № 3, ч. 1. — С. 99-103.

10. *Некоторые* особенности женского организма и их учет в спорте / Е. Л. Михалюк, А. Н. Бражников,

В. И. Лозовой и др. // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Зб. наук. статей. — Вип. VII. — Запоріжжя, 2001. — С. 229-235.

УДК 616-002.5:579.873.2:615.015.8(477.73)

В. В. Ніколаєвський, Н. А. Левицька, Ю. І. Бажора,
О. К. Асмолов, В. М. Шишкін

РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ ЛІКАРСЬКО-СТІЙКИХ ШТАМІВ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ В МИКОЛАЇВСЬКІЙ ОБЛАСТІ УКРАЇНИ

Одеський державний медичний університет

Щороку в світі понад 7 млн хворих гине від туберкульозу, причому навіть оптимістичні прогнози передбачують, що протягом найближчих 10–15 років «біла смерть» забере понад 30 млн життів [1].

Епідемія туберкульозу в Україні почалася з 1995 р., коли спостерігалось постійне збільшення захворюваності та смертності від цього захворювання [2]. За даними на 2002 р., захворюваність на туберкульоз в Україні становила 75,6 на 100 тис. населення, що на 10,2 % перевищує минулі показники [3].

Однією з важливих причин швидкого розповсюдження епідемії туберкульозу є зростання кількості штамів, резистентних до протитуберкульозних препаратів. Щороку в світі реєструється близько 300 000 випадків туберкульозу, спричинених первинно стійкими до протитуберкульозних препаратів штамми [4]. Резистентність збудника туберкульозу до одного або кількох препаратів, особливо первинна резистентність, значно ускладнює перебіг хвороби та погіршує прогноз, тому що спектр протитуберкульозних препаратів є досить обмеженим. Дуже високі рівні первинної та набутої моно- і мультирезистентності були за-

реєстровані у країнах Балтії [5], деяких областях Росії [6; 7], Китаю [4].

На жаль, узагальнених даних щодо медикаментозної стійкості мікобактерій, які циркулюють на території України, немає [8]. Окремі повідомлення про ситуацію в містах Києві та Львові [9; 10], а також результати наших попередніх досліджень по Одесі та Миколаєву [11] базуються, як правило, на даних ретроспективних досліджень. Крім того, майже немає інформації про рівні первинної та набутої лікарської стійкості мікобактерій до протитуберкульозних ліків, що є надзвичайно важливим для діагностики і клініки туберкульозу, розуміння причин епідеміологічного процесу та прогнозування його перебігу.

Сьогодні в Україні лабораторна діагностика туберкульозної інфекції базується, головним чином, на мікробіологічних методах. Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. передбачається також застосування молекулярно-генетичних методів ідентифікації мікобактерій [12]. У країнах Європи молекулярно-генетичні методи діагностики туберкульозу та визначення медикаментозної стійкості мікобактерій посіли чільне

місце у практиці лабораторної діагностики цієї хвороби завдяки їх високій ефективності, надійності та значному скороченню витрат праці та часу [13].

Метою даної роботи був проспективний аналіз рівнів лікарської стійкості штамів *Mycobacterium tuberculosis*, виділених від хворих у Миколаївському обласному протитуберкульозному диспансері протягом певного часу до основних протитуберкульозних препаратів першого ряду за допомогою мікробіологічних і молекулярно-генетичних методів.

Матеріали та методи дослідження

Досліджували мокротиння, отримане від хворих на різні форми легеневого туберкульозу, які відвідали поліклінічне відділення Миколаївського обласного протитуберкульозного диспансеру протягом червня–липня 2003 р. Планування дослідження за методом «поперечного зрізу» (cross-sectional study) [14] дозволило отримати необхідну епідеміологічну інформацію та виявити нові випадки хвороби. Для збору анамнестичних та епідеміологічних даних на кожного хворого лікарем або медичною сестрою було заповнено анкету, в якій



містилися дані про місце його постійного мешкання, вік, інформація про перебування у місцях позбавлення волі, БЦЖ вакцинацію, дату встановлення діагнозу та форму туберкульозного процесу, а також повідомлення про призначене лікування та дата початку протитуберкульозної терапії.

Бактеріоскопічні та бактеріологічні дослідження мокротиння проводилися згідно з Наказом МОЗ України №45 від 06.02.2002 [12]. Мокротиння від хворих збирали тричі протягом трьох діб. Кожну порцію матеріалу було поділено на дві частини, з першої виготовляли мазки для бактеріоскопії, друга використовувалася для культуральних досліджень. Мазки забарвлювали за Цілем — Нільсеном і мікроскопували, використовуючи імерсійну систему. Бактеріологічні (культуральні) дослідження здійснювали шляхом посіву мокротиння, обробленого 12%-м стерильним розчином Na_3PO_4 , на щільні поживні середовища Левенштайна — Єнсена. Ідентифікацію *Mycobacterium tuberculosis* здійснювали з використанням ніацинового тесту.

Визначення чутливості мікобактерій до рифампіцину (20,0 мкг/мл), стрептоміцину (5,0 мкг/мл), ізоніазиду (1,0 мкг/мл) та етамбутолу (5,0 мкг/мл) проводили за допомогою методу абсолютних концентрацій на щільному живильному середовищі. Під час аналізу результатів користувалися критеріями, наведеними у відповідних розділах Наказу [12].

Молекулярно-генетичні дослідження стійкості виділених ізолятів мікобактерій проведено у молекулярно-генетичному відділі Національної Референс-лабораторії з діагностики туберкульозу Великої Британії (Лондон). Для визначення стійкості до рифампіцину та ізоніазиду використовували метод зворотної гібридизації ампліфікованих фрагментів генів, що відповідають за розвиток

лікарської стійкості, з нормальними та мутантними ДНК-зондами [7; 15].

Виділення ДНК здійснювали шляхом лізису з подальшою депротейнізацією хлороформом. Ампліфікацію фрагментів генів *rpoB*, *katG* та *inhA* проводили одночасно за допомогою трьох пар праймерів в об'ємі 20 мкл. Реакційна суміш складалася з 2 мкл $10\times$ ПЛР-буфера (Bioline, Велика Британія); 0,5 од. Таq-полімерази (Bioline), 0,5 мкл 2мМ суміші чотирьох дезоксинуклеотидтрифосфатів (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) (Bioline), 0,5 мкл суміші 3 пар праймерів, помічених біотином, 1 мкл матриці ДНК та 15,5 мкл води. Ампліфікацію здійснювали у термоциклері "Perkin Elmer 9700" за такою програмою: 5 хв 95°C , далі 35 циклів (плавлення: 95°C — 30 с, відпалювання: 65°C — 30 с, елонгація 72°C — 1 хв); ампліфікацію закінчували витримкою зразків протягом 5 хв при 72°C . Аналіз продуктів ампліфікації проводили у 2%-му агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм.

ДНК-зонди, що відповідали нормальним і мутантним послідовностям генів *rpoB*, *katG* та *inhA*, іммобілізували на стрічках нейлонової мембрани ("Osmotics", США) у вигляді точок. Усього у даному дослідженні нами було використано 10 зондів, шість з яких відповідали нормальним нуклеотидним послідовностям фрагментів гена *rpoB*, в яких найчастіше спостерігаються мутації резистентності до рифампіцину. Два зонди були індикаторами нормальних послідовностей у генах *katG* та *inhA*, асоційованих з виникненням резистентності до ізоніазиду, та ще два зонди — індикаторами мутацій у вищезазначених генах.

Гібридизацію ПЛР-продуктів з зондами проводили при постійному обертанні у гібридизаційній печі при 62°C протягом 30 хв. Після промивання мембрани інкубували у 0,5%-му розчині блокуючого реагенту

(Roche) з додаванням кон'югату — стрептавідин-лужної фосфатази (BioGenex, США) у концентрації 1:100 протягом 20 хв. Колір проявляли у розчині нітросинього тетразолію з бромом-хлоро-індолілу фосфатом (1:100 у диметилформаміді). Проявлені мембрани висушували при кімнатній температурі та проводили облік результатів.

Результати дослідження та їх обговорення

Аналіз епідеміологічних та анамнестичних даних проведено на матеріалі 147 анкет хворих на туберкульоз. Вік хворих — від 19 до 71 року. Чоловіків було 112, жінок — 35 (76,2 і 23,8 % відповідно). За віковим складом хворих було розподілено таким чином: молодше 25 років — 24 (16,3 %), від 26 до 40 років — 44 (29,9 %), від 41 до 60 років — 61 (41,5 %), старше 60 років — 18 (12,2 %). Мешканцями Миколаєва були 50 хворих, Миколаївської області — 92 особи. П'ятеро хворих не мали постійного місця мешкання. Двадцять пацієнтів (13,6 %) у минулому перебували у місцях позбавлення волі, у половини з них туберкульоз вперше було діагностовано від час відбування покарання.

Клінічні прояви туберкульозного процесу характеризувалися певними особливостями. Найбільше було хворих з інфільтративними (57 осіб, або 38,7 %) та дисемінованими (37 осіб, або 25,2 %) формами легеневого туберкульозу. Інші форми були представлені осередковими (13,6 %), фіброзно-кавернозними (9,5 %), туберкульозним плевритом (2,8 %) та казеозною пневмонією (1 випадок, або 0,7 %). У всіх хворих діагноз легеневого туберкульозу базувався на даних рентгенологічного дослідження та клінічної картини.

Згідно з даними, отриманими під час аналізу анкет, у 95 (64,6 %) хворих діагноз туберкульозу було встановлено



**Медикаментозна стійкість мікобактерій туберкульозу,
виділених від хворих протягом дослідження*, абс. (%)**

Кількість ізолятів	Нові випадки	Хронічні випадки	Усі хворі
Усього виділено культур	53	31	84
Чутливі до 4 препаратів	43 (81,1)	14 (45,2)	57 (67,9)
Стійкі			
до ізоніазиду	3 (5,7)	12 (38,7)	15 (17,9)
до рифампіцину	2 (3,8)	3 (9,7)	5 (5,9)
до етамбутолу	2 (3,8)	3 (9,7)	5 (5,9)
до стрептоміцину	4 (7,5)	15 (48,4)	18 (21,4)
Мультирезистентні	2 (3,8)	3 (9,7)	5 (5,9)

Примітка. *Деякі ізоляти були стійкими до кількох препаратів одночасно, тому сума відсотків перевищує 100 %.

вперше, і вони не лікувалися раніше протитуберкульозними препаратами. Другу групу (52 осіб, або 35,4 %) склали хворі, в яких діагноз туберкульозу було встановлено раніше (від 1,5 до 5 років) і вони отримували раніше або на час анкетування протитуберкульозну терапію.

За результатами бактеріоскопії мазків мокротиння, забарвлених за Цілем — Нільсеном, кислотостійкі палички було виявлено у 65 хворих, що становило 44,2 % від загальної кількості обстежених пацієнтів. Бактеріологічне дослідження мокротиння методом посіву на щільне поживне середовище Левенштайна — Єнсена допомогло виявити мікобактерії у 84 (57,1 %) хворих. Усі виділені культури було ідентифіковано як *Mycobacterium tuberculosis*. Таким чином, подальші дослідження бактеріологічними та молекулярно-генетичними методами проводилися на матеріалі 84 культур.

Бактеріологічні дослідження виділених ізолятів збудника туберкульозу на чутливість до протитуберкульозних препаратів проводилися методом абсолютних концентрацій на щільних поживних середовищах (табл. 1).

Як видно з табл. 1, відсоток штамів, резистентних до одного або більшої кількості препаратів, набагато вищий серед штамів, виділених від хворих, які лікувалися раніше, ніж серед штамів, виділених від первинних хворих. Рівні вторинної резистентності виявилися досить високими: більше половини (54,8 %) усіх штамів, виділених від хворих, які лікувалися від туберкульозу раніше, характеризувалися стійкістю хоча б до одного з препаратів. Найбільш високі рівні вторинної резистентності було зареєстровано для стрептоміцину (48,4 %) та ізоніазиду (38,7 %). Меншими, але теж суттєвими були рівні стійкості до рифампіцину й етамбутолу (9,7 %).

Мультирезистентністю, тобто стійкістю одночасно до ізоніазиду та рифампіцину, характеризувалися 9,7 % штамів, виділених від хронічних хворих.

Серед штамів, виділених від хворих, які ніколи не лікувалися або менше ніж 4 тиж лікувалися від туберкульозу, стійкістю до препаратів характеризувалися 18,9 % штамів. Відносно вищими, як і серед штамів, виділених від хронічних хворих, були рівні стійкості до ізоніазиду та стрептоміцину (5,7 та 7,5 % відповідно). Частка мультирезистентних штамів становила 3,8 % від загальної кількості штамів, отриманих від пацієнтів, які раніше не лікувалися від туберкульозу.

Молекулярно-генетичні дослідження стійкості штамів мікобактерій проведено на матеріалі екстрактів ДНК, виділених з вищезазначених культур *M. tuberculosis*. Препарати ДНК належної якості було отримано з 56 штамів.

Мультиплексна ампліфікація ділянок генів *rpoB*, *katG* та *inhA*, які відповідають за розвиток лікарської стійкості, була успішною для усіх 56 препаратів ДНК. Наявність фрагменту гена *rpoB* масою 260 п. н. одночасно свідчила про належність досліджуваного штамму до виду *M. tuberculosis*, що підтвердило дані мікробіологічних досліджень (рисунок).

Застосування методики зворотної гібридизації за допомогою ДНК-зондів, іммобілізованих на стрічках нейлонової мембрани, дозволило отримати дані про наявність мутацій у генах *rpoB*, *katG* та *inhA* і, таким чином, зробити висновки про стійкість досліджуваних штамів до рифампіцину та ізоніазиду. Ізолят вважався стійким до рифампіцину, якщо реєструвалася відсутність картини гібридизації хоча б з одним з нормальних ДНК зондів до гена *rpoB*. Про стійкість до ізоніазиду свідчила наявність гібридизації з

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 М

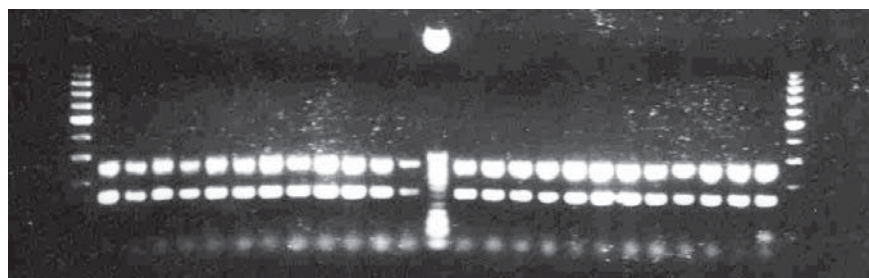


Рисунок. Електрофореграма продуктів мультиплексної ампліфікації фрагментів генів *rpoB*, *katG* та *inhA*: М — маркер молекулярної ваги; 1–12 — номери зразків; А — фрагмент гена *rpoB*; Б — фрагменти генів *katG* та *inhA*

мутантними ДНК-зондами до генів *inhA* та/або *katG*.

Чималий інтерес для оцінки ефективності та визначення шляхів застосування молекулярно-генетичних методів у лабораторній діагностиці туберкульозу являють дані порівняння результатів бактеріологічних та молекулярно-генетичних досліджень. Результати порівняльного аналізу даних молекулярно-генетичних і мікробіологічних методів щодо рівнів стійкості виділених штамів мікобактерій до рифампіцину та ізоніазиду подано в табл. 2.

Як видно з табл. 2, дані щодо стійкості штамів до рифампіцину та ізоніазиду, отримані за допомогою молекулярних і мікробіологічних методів, добре збігаються між собою. Обидва штами, які мали мутації одночасно у генах *rpoB* і *katG*, були ідентифіковані бактеріологічними методами як мультирезистентні, тобто резистентні одночасно до рифампіцину та ізоніазиду. Із 46 штамів, ідентифікованих методом абсолютних концентрацій як чутливі до рифампіцину та ізоніазиду, мутацій не було відмічено у 40 (86,9 %). У 6 штамів з цієї групи було виявлено мутації у генах *katG* та/або *inhA*, а у 4 з цих 6 — ще й мутації у гені *rpoB*. Таким чином, у групі фенотипово чутливих до цих препаратів штамів збіг результатів щодо чутливості до ізоніазиду дорівнював 86,9 %, до рифампіцину — 91,3 %, що є досить високим показником. Виявлені розбіжності можуть свідчити про на-

явність прихованих мутацій (silence mutations) або про потенційну, але поки що не виявлену лікарську стійкість. У цьому разі дані щодо наявності мутацій у геномі мікобактерій може бути використано для прогнозування перебігу епідемічного процесу.

Таким чином, використовуючи методику дослідження за методом «зрізу» (cross-sectional study), вперше вдалося отримати дані щодо розповсюдженості лікарсько-стійких мікобактерій туберкульозу в Миколаївській області України у 2003 р. та доказово розрізнити первинну й набуту стійкість. Порівнюючи ці дані з даними ретроспективного аналізу рівнів стійкості мікобактерій у Миколаївській області у 2000–2002 рр. [11], вдалося простежити тенденцію до зростання рівнів стійкості як до окремих препаратів, так і частки мультирезистентних штамів. Особливо вираженим є збільшення показників резистентності до стрептоміцину, ізоніазиду та мультирезистентних штамів. Тривожним фактором є зростання рівнів первинної резистентності до усіх досліджених препаратів, що свідчить про активну циркуляцію високорезистентних стійких до анти-туберкульозної терапії штамів. Взагалі рівні стійкості мікобактерій туберкульозу, що циркулюють у Миколаївській області, виявилися дещо нижчими, ніж в окремих регіонах Росії, Східної Європи та Китаю, але значно перевищують рівні, про які було повідомлено для біль-

шості країн Західної Європи, Японії та Північної Америки [3; 4; 6; 7].

Одночасне використання бактеріологічних і молекулярно-генетичних методів діагностики стійкості до ізоніазиду та рифампіцину дозволило зробити висновок про ефективність застосування молекулярних методів, які базуються на виявленні мутацій, що відповідають за розвиток лікарської стійкості. Показники збігу даних фенотипових (бактеріологічних) та генотипових (молекулярно-генетичних) методів є близькими або навіть вищими за опубліковані раніше [16; 17] і свідчать про достатню чутливість та специфічність методу. Значними перевагами молекулярно-генетичних підходів, що базуються на детектуванні мутацій, є можливість швидкісної оцінки лікарської стійкості виділеного штамів, що є важливим для призначення відповідної терапії. Крім того, дані щодо профілів лікарської стійкості ізолятів мікобактерій та спектра мутацій, що кодують стійкість до препаратів, можуть бути дуже корисними у епідеміологічному моніторингу та прогнозуванні епідемічного процесу. Враховуючи існуючу ситуацію з туберкульозом в Україні, впровадження молекулярно-генетичних методів діагностики лікарської стійкості мікобактерій туберкульозу є дуже важливим і може зробити значний внесок у поліпшення стану діагностики та лікування цієї хвороби.

ЛІТЕРАТУРА

1. Small P. M. Tuberculosis in the 21st century: DOTS and SPOTS // Int. J. Tuberc. Lung Dis. — 1999. — Vol. 3, N 11. — P. 949-955.
2. Феценко Ю. І. Мельник В. М., Кобилянська А. В. Основні тенденції динаміки статистичних показників з туберкульозу в Україні за останні 10 років // Укр. пульмонолог. журнал. — 2000. — № 4. — С. 5-9.
3. European Database Health for All, European World Health Organization Bureau, Copenhagen, Denmark, 2003 (www.euro.who.int/hfadb).
4. Espinal M. A. The global situation of MDR-TB // Tuberculosis. — 2003. — Vol. 83. — P. 44-51.

Таблиця 2
Порівняльний аналіз результатів молекулярно-генетичних та мікробіологічних тестів на чутливість до рифампіцину та ізоніазиду

Мікробіологічні тести	Молекулярні тести			
	IP-PP	IP-PC	IC-PP	IC-PC
IP-PP	2	0	0	0
IP-PC	0	5	0	1
IC-PP	0	0	0	0
IC-PC	4	2	0	40

Примітка. IP — резистентність до ізоніазиду; IC — чутливість до ізоніазиду; PP — резистентність до рифампіцину; PC — чутливість до рифампіцину.



5. *Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia* / A. Krutner, S. E. Hoffner, H. Sillastu et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 3339-3345.

6. *Nosocomial outbreak of MDR-TB caused by a strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family in St. Petersburg, Russia* / O. Narvskaya, T. Otten, E. Limeschenko et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis.* — 2002. — Vol. 21. — P. 596-602.

7. *Rifampin- 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.

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

9. *Клініко-бактеріологічна характеристика хворих на туберкульоз легень з хіміорезистентними формами*

збудника / О. В. Павленко, І. О. Новажилова, Н. П. Шваєнко, І. Є. Юхименко // *Там же.* — 2002. — № 4. — С. 14-19.

10. *Ситуація з мультирезистентного та полірезистентного туберкульозу в м. Києві* / О. А. Журило, Л. В. Турченко, М. Т. Клименко та ін. // *Там же.* — № 3. — С. 36-39.

11. *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. Николаєвський, О. К. Асмолов // *Там же.* — 2003. — № 4. — С. 17-20.

12. *Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002 «Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції»* / Складена під керівництвом Ю. І. Феценко, О. А. Журило, М. Т. Клименко та ін. // *Збірник нормат.-директ. документів з охорони здоров'я.* — 2002. — № 2. — С. 63-111.

13. *Modern laboratory diagnosis of tuberculosis* / F. A. Drobniowski,

M. Caws, A. Gibson, D. Young // *The Lancet Inf. Dis.* — 2003. — Vol. 3. — P. 141-147.

14. *Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э.* Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины: Пер. с англ. — М.: Медиа Сфера, 1998. — 352 с.

15. *Molecular genetic analysis of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Central Russia* / V. Nikolayevsky, T. Brown, M. Ruddy et al. // *Abstr. 24th Congress of European Society of Mycobacteriology.* — Tartu, Estonia, 2003. — P. 49.

16. *Garcia de Viedma G.* Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review discussing molecular approaches // *Clin Microbiol Infect.* — 2002. — Vol. 9. — P. 349-359.

17. *Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in a high-incidence community* / A. Van Rie, R. Warren, I. Mshanga et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2001. — Vol. 39. — P. 636-641.

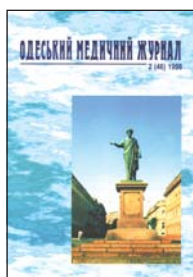
*Передплачуйте
і читайте*

ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому передплатному пункті

У випусках журналу:

- ◆ *Теорія і експеримент*
- ◆ *Клінічна практика*
- ◆ *Профілактика, реабілітація, валеологія*
- ◆ *Нові технології*
- ◆ *Огляди, рецензії, дискусії*



Ціна передплати на півріччя (три номери):

- для підприємств та організацій — 60 грн;
- для індивідуальних передплатників — 30 грн.

Передплатні індекси:

- для підприємств та організацій — 48717;
- для індивідуальних передплатників — 48405.

