



П.И. Потейко<sup>1</sup>, А.П. Герилович<sup>2</sup>, А.В. Рогожин<sup>1</sup>,  
О.С. Константиновская<sup>1</sup>, А.А. Ляшенко<sup>3</sup>, С.А. Сапко<sup>2</sup>,  
А.С. Солодянкин<sup>2</sup>, В.И. Болотин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Харьковская медицинская академия последипломного образования

<sup>2</sup> Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, Харьков

<sup>3</sup> Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

## Филогенетический анализ *M. tuberculosis*, выделенных у больных химиорезистентным туберкулезом легких

**Цель работы** — изучить спектр резистентности у различных штаммов *M. tuberculosis*, выделенных у больных химиорезистентным туберкулезом легких, находившихся на лечении в стационарах Харькова и Харьковской области.

**Материалы и методы.** С сентября 2014 г. по сентябрь 2015 г. с помощью VNTR-генотипирования нами изучено 93 штамма *M. tuberculosis*, полученных от пациентов с ХРТБ легких.

**Результаты и обсуждение.** Всем больным проводили клиничко-рентгенологические и лабораторные исследования согласно действующему протоколу, а также VNTR-генотипирование штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ). Для VNTR-генотипирования использовали 5 пар праймеров, которые соответствуют ETR-локусам. У 41 (44 %) пациента диагностирован мультирезистентный туберкулез легких и у 52 (56 %) — туберкулез с расширенной резистентностью. В результате VNTR-генотипирования в 69 % случаев среди выделенных штаммов встречались генотипы *Beijing*. Наиболее часто наблюдалась резистентность микобактерий туберкулеза (МБТ) к стрептомицину.

**Выводы.** Различий в структуре химиорезистентности к антимикобактериальным препаратам I ряда в зависимости от штаммов МБТ не выявлено. В структуре химиорезистентности к антимикобактериальным препаратам II ряда в зависимости от штаммов МБТ определено, что устойчивость МБТ к Km, PAS и Et выявлялась достоверно чаще у штамма LAM в сравнении с *Beijing*.

### Ключевые слова

Туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, генотип, резистентность, Харьковская область, полимеразная цепная реакция.

На сегодняшний день туберкулез является актуальной медико-социальной проблемой не только в Украине, но и во всем мире [5, 7].

На фоне постепенного снижения эпидемических показателей на современном этапе угрозу представляет распространение химиорезистентного туберкулеза (ХРТБ) в Украине [4, 8].

Согласно приказу МЗ Украины № 620 от 04.09.2014 г., мультирезистентный туберкулез (МРТБ) — это форма туберкулеза, при которой пациент выделяет микобактерии туберкулеза (МБТ), резистентные как минимум к изониазиду и рифамицину, а часто и к большому количеству

противотуберкулезных препаратов I и II рядов, что подтверждено лабораторным методом в тесте медикаментозной чувствительности. Туберкулез с расширенной медикаментозной резистентностью (РРТБ) — резистентность МБТ одновременно к изониазиду, рифампицину и к одному из двух групп противотуберкулезных препаратов II ряда — аминогликозидам (амикацин, канамицин и капреомицин) и фторхинолонам [2, 9, 13, 14].

По данным ВОЗ, в Украине МРТБ выявлено у 16 % больных, которым первично установлено диагноз туберкулеза, и у 44 % больных с рецидивом заболевания. Около 8 % впервые заболевших прерывают лечение, 12 % умирают [4, 7, 10, 12].

Количество выявления случаев химиорезистентного туберкулеза за последние 10 лет увели-

© П.И. Потейко, А.П. Герилович, А.В. Рогожин,  
О.С. Константиновська, О.О. Ляшенко, С.А. Сапко,  
О.С. Солодянкин, В.И. Болотин, 2016

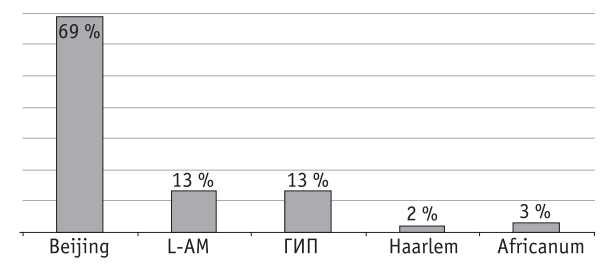


Рисунок. Распределение штаммов МБТ у пациентов с химиорезистентным туберкулезом легких

чилося практично в три рази завдяки впровадженню методів молекулярної діагностики. Из общего количества больных МРТБ 13 % составили больные с РРТБ [1, 3, 7, 8, 14].

С развитием молекулярной генетики стало возможным проводить генетическое типирование МБТ, что позволяет различать штаммы возбудителя и определять их роль в дальнейшем течении заболевания.

Разнообразные генетические семейства *M. tuberculosis* представлены в разных географических регионах, например *Beijing*, *Haarlem*, LA-M (Latin American and Mediterranean), *Africanum*, а также неидентифицированные штаммы, условно названные генотипами индивидуальных профилей (ГИП), и некоторые другие широко распространены и поддерживают на высоком уровне эпидемиологические показатели туберкулеза. В целом ряде наблюдений обнаружено, что случаи тяжелого течения и неэффективного лечения часто связаны с заражением штаммами МБТ семейства *Beijing* [3, 11, 15].

**Цель работы** — изучить спектр резистентности у различных штаммов *M. tuberculosis*, выделенных у больных химиорезистентным туберкулезом легких, находившихся на лечении в стационарах Харькова и Харьковской области.

### Материалы и методы

С сентября 2014 г. по сентябрь 2015 г. нами изучено 93 случая ХРТБ легких у пациентов, находившихся на лечении в стационарах Харькова и Харьковской области. Пациентов отбирали слепым методом.

Пробы мокроты культивировали на питательных средах, после чего отбирали и проводили инактивацию возбудителя по разработанной нами схеме с использованием влияния температурного режима и лизирующегося раствора с гуанидин тиоционатом (документы поданы на получение патента). Это позволяло обеспечить биобезопасность и провести достоверные ПЦР исследования. Экстракцию ДНК проводили согласно с инструкцией к набору

реагентов Diatom DNA Prep 200 (ТУ 9398-001-73867468-2012). Амплификацию проводили с использованием набора реагентов GenPak PCR Core согласно с листом-вкладышем (ТУ 9398-001-738674468-2012). Для VNTR генотипирования использовали 5 пар праймеров, которые соответствуют ETR-локусам, на базе лаборатории молекулярной диагностики НИЦ «Института экспериментальной и клинической ветеринарной медицины». Амплификацию проводили за следующими режимами: начальная денатурация при 95 °С — 5 мин, далее в течение 35 циклов с денатурацией при 94 °С 15 с, отжигом при температуре 62 °С — 15 с и элонгацией при 72 °С — 25 с. Финальную элонгацию проводили при 72 °С — 5 мин. На подготовительном этапе для приготовления раствора ТБЕ (x1) использовали борную кислоту (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, НПФ «Синбиас»), соль этилентетрауксусной кислоты (ЭДТА, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, ООО, США), Трис (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>N, Sigma-Aldrich, ООО, США). Для приготовления агарозного геля использована агароза производства Serva (Германия) и бромид этидия (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br) производства Sigma-Aldrich ООО (США). В целях определения размера ампликона использовали маркер молекулярной массы 100 bp Ladder (ООО «Изоген», РФ).

Статистическая обработка результатов произведена с помощью Excel 2007 (Microsoft, лиц. № RW2FR-7DFDD-TCF8J-9K9VJ-MJ678).

### Результаты и обсуждение

Из 93 пациентов было 80 % (n = 74) мужчин и 20 % (n = 19) женщин. Возраст пациентов колебался от 23 до 84 лет. Средний возраст составил (49 ± 1,2) года.

Всем больным проводили клинико-рентгенологическое и лабораторное исследования согласно «Унифицированному клиническому протоколу первичной, вторичной (специализированной) и третичной (высокоспециализированной) медицинской помощи. Туберкулез», утвержденному приказом МЗ Украины № 620 от 04.09.2014 г. [6].

Результаты VNTR-генотипирования отражены на рисунке.

У всех пациентов с ХРТБ наблюдался распространенный туберкулез легких с массивным микобактериовыделением, которое было подтверждено бактериоскопически и культурально.

Из 93 пациентов с ХРТБ легких у 41 (44 %) установлен диагноз МРТБ, а у 52 (56 %) — РРТБ.

Произведено исследование МБТ на медикаментозную чувствительность на жидких (ВАСТЕС 960) и плотных питательных средах. Результаты устойчивости к антимикобакте-

Таблиця 1. Устойчивость МБТ различных штаммов к АМБП I ряда

Препарат	Устойчивость <i>M. tuberculosis</i>									
	Beijing (n = 64)		L-AM (n = 12)		ГИП (n = 12)		Africanum (n = 3)		Haarlem (n = 2)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Изониазид (H)	63	98	12	100	12	100	3	100	2	100
Рифампицин (R)	63	98	11	91,5	11	91,5	3	100	1	50
Этамбутол (E)	58	90,5	11	91,5	11	91,5	3	100	0	0
Пиразинамид (Z)	26	40,5	2	16,5	6	50	1	33,3	1	50
Стрептомицин (S)	64	100	12	100	12	100	3	100	2	100

Таблиця 2. Устойчивость МБТ различных штаммов к АМБП II ряда

Препарат	Устойчивость <i>M. tuberculosis</i>									
	Beijing (n = 64)		L-AM (n = 12)		ГИП (n = 12)		Haarlem (n = 2)		Africanum (n = 3)	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Канамицин (Km)	42	65,5	12	100	7	58	0	0	3	100
Амикацин (Am)	8	12,5	5	41,5	4	33,3	0	0	1	33,3
Капреомицин (Cm)	20	31,2	5	41,5	4	33,3	0	0	3	100
Офлоксацин (Ofx)	37	57,8	9	75	7	58	0	0	3	100
Левифлоксацин (Lfx)	11	17	3	25	1	8,3	0	0	1	33,3
Моксифлоксацин (Mfx)	10	15,5	4	33,3	2	16,5	0	0	2	66,6
Протионамид (Pt)	8	12,5	3	25	3	25	0	0	1	33,3
Парааминосилициловая кислота (PAS)	13	20,3	11	91,5	2	16,5	0	0	0	0
Циклосерин (Cs)	2	3	2	16,5	3	25	0	0	2	66,6
Этионамид (Et)	21	33	9	75	4	33,4	0	0	1	33,3

риальным препаратам (АМБП) I ряда отражены в табл. 1.

Таким образом, достоверных статистических различий по частоте устойчивости выделенных штаммов МБТ к АМБП I ряда не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Результаты устойчивости к АМБП II ряда отражены в табл. 2.

Итак, частоту устойчивости к Km, PAS и Et выявляли достоверно чаще у штамма L-AM в сравнении с *Beijing* ( $p < 0,05$ ).

## Выводы

В Харьковской области ситуация по ХРТБ остается сложной. У 56 % из проанализированных 93 случаев ХРТБ легких выявлен РРТБ к

АМБП. Преобладал штамм *Beijing* – 68,8 % случаев.

Различий в структуре химиорезистентности к АМБП I ряда в зависимости от штаммов МБТ не выявлено.

В структуре химиорезистентности к АМБП II ряда в зависимости от штаммов МБТ определено, что устойчивость МБТ к Km, PAS и Et выявлялась достоверно чаще у штамма L-AM в сравнении с *Beijing*.

В целях получения более убедительных данных по филогенетическим связям штаммов МБТ со спектром их устойчивости к АМБП необходимо проводить более широкомасштабные исследования в тесном сотрудничестве врачей и молекулярных биологов.

## Список литературы

1. Бажора Ю.І., Часникова М.М., Польова С.П., Левицька І.А. Молекулярна епідеміологія туберкульозу // Клінічна та експериментальна цитологія. – 2010. – № 2. – С. 138–140.
2. Дьмова М.А., Чередниченко А.Г., Ширшова А.Н. и др. Молекулярные основы возникновения лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis* // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: био-

3. Ляшенко А.А. Методы генотипирования во фтизиатрии // Туберкулез, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція. – 2015. – № 1 (20). – С. 98–103.
4. Наказ МОЗ України № 620 від 04.09.2014 «Уніфікований клінічний Протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги. Туберкулез».
5. Тодоріко Л.Д., Петренко В.І., Гришин М.М. Резистентність

- мікобактерій туберкульозу: міфи та реальність // Туберкульоз, легеневі хвороби, ВІЛ-інфекція.— 2014.— № 1.— С. 60–67.
6. Туберкульоз в Україні: Аналітично-статистичний довідник за 2004–2014 роки // За ред. О.К. Толстанова.— К.: Вища школа,— 2015.— 102 с.
  7. Фещенко Ю.І., Мельник В.М. Організація контролю за хіміо-резистентним туберкульозом.— К.: Здоров'я.— 2013.— 704 с.
  8. Фещенко Ю.І., Мельник В.М., Гльницький І.Г. Основи клінічної фізіатрії: посібник для лікарів: у 2 томах.— К.— Львів: Атлас, 2011.— 1363 с.
  9. Cowan L.S., Mosher L., Diem L. et al. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units // *J. Clin. Microbiol.*— 2002.— Vol. 40.— P. 1592–1602.
  10. Hashimoto R. et al. Concordance of variable-number tandem-repeat (VNTR) and large sequence polymorphism (LSP) analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains // *Infect. Genet. Evol.*— 2010.— Vol. 10, N 7.— P. 913–918.
  11. Joseph B.V., Soman S., Radhakrishnan I. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kerala, India using IS6110–RFLP, spoligotyping and MIRU–VNTRs // *Infect. Genet. Evol.*— 2013.— Vol. 16.— P. 157–164.
  12. Kwara A., Schiro R., Cowan L.S. et al. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates // *J. Clin. Microbiol.*— 2003.— Vol. 41, N 6.— P. 2683–2685.
  13. Lu B., Zhao P., Liu B. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China assessed by Spoligotyping, LSPs and VNTR profiles // *BMC Infectious Diseases.*— 2012.— Vol. 12.— P. 372.
  14. Migliori G.B., Ortmann J., Girardi E. et al. Extensively drug-resistant tuberculosis, Italy and Germany/SMIRA/TBNET Study Group // *Emerg. Infect. Dis.*— 2007.— Vol. 13, N 5.— P. 780–782.
  15. World Health Organization. «WHO report 2014: Global tuberculosis control».— 2014, Geneva, Switzerland.— 273 p.

П.І. Потейко<sup>1</sup>, А.П. Герілович<sup>2</sup>, А.В. Рогожин<sup>1</sup>, О.С. Константиновська<sup>1</sup>, О.О. Ляшенко<sup>3</sup>, С.А. Сапко<sup>2</sup>,  
О.С. Солодянкін<sup>2</sup>, В.І. Болотін<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти

<sup>2</sup>Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини, Харків

<sup>3</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

## Філогенетичний аналіз *M. tuberculosis*, виділених у хворих на хіміорезистентний туберкульоз легень

**Мета роботи** — вивчити спектр резистентності у різних штамів *M. tuberculosis*, виділених у хворих на хіміорезистентний туберкульоз легень, що перебували на лікуванні у стаціонарах Харкова та Харківської області.

**Матеріали та методи.** З вересня 2014 р. по вересень 2015 р. за допомогою VNTR-генотипування нами вивчено 93 штами *M. tuberculosis*, отриманих від пацієнтів з ХРТБ легень.

**Результати та обговорення.** Усім хворим проводили клініко-рентгенологічні та лабораторні дослідження згідно з чинним протоколом, а також VNTR-генотипування штамів мікобактерій туберкульозу (МБТ). Для VNTR-генотипування використовували 5 пар праймерів, які відповідають ETR-локусам. У 41 (44 %) пацієнта діагностовано мультирезистентний туберкульоз легень і у 52 (56 %) — туберкульоз з розширеною резистентністю. В результаті VNTR-генотипування у 69 % випадках серед виділених штамів зустрічалися генотипи Beijing. Найчастіше спостерігалася резистентність мікобактерій туберкульозу (МБТ) до стрептоміцину.

**Висновки.** Відмінностей в структурі хіміорезистентності до антимікобактеріальних препаратів І ряду залежно від штамів МБТ не виявлено. У структурі хіміорезистентності до антимікобактеріальних препаратів II ряду залежно від штамів МБТ визначено, що стійкість МБТ до Km, PAS і Et виявлялася достовірно частіше у штаму LAM порівняно з Beijing.

**Ключові слова:** туберкульоз, *Mycobacterium tuberculosis*, генотип, резистентність, Харківська область, полімеразна ланцюгова реакція.

P.I. Poteiko<sup>1</sup>, A.P. Gorilovych<sup>2</sup>, A.V. Rogozhin<sup>1</sup>, O.S. Konstantynoska<sup>1</sup>, O.O. Liashenko<sup>3</sup>, S.A. Sapko<sup>2</sup>,  
O.S. Solodiantin<sup>2</sup>, V.I. Bolotin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

## Phylogenetic analysis of *M. Tuberculosis*, obtained from patients with chemo-resistant pulmonary tuberculosis

**Objective** – to study the spectrum of resistance at the different strains of MBT received from patients with DRTB (drug resistant tuberculosis) that treated in TB hospitals of Kharkiv and Kharkiv region.

**Materials and methods.** From September 2014 for September 2015 by means of VNTR genotyping we studied 93 strains of *M. tuberculosis* received from patients with lungs DRTB.

**Results and discussion.** Clinicoradiological and laboratory researches conducted with all patients according to WHO (World Health Organization) protocols, and also VNTR genotyping of *Mycobacteria tuberculosis* strains (MBT). For VNTR genotyping were used 5 pairs of primers according to ETRloci. In 41 (44 %) of patients were diagnosed with MDRTB and at 52 (56 %) had tuberculosis with extended resistance. As a result VNTR genotyping in 69 % cases among the distinguished strains were genotypes of *Beijing*. More often there was resistance of MBT to streptomycin.

**Conclusions.** Differences in the structure of chemo resistance to I-st line of drugs depending on the strains of MBT were not found. It was detected that resistance of MBT to Km, PAS and Et appeared more often at the strains of LAM in compare with *Beijing* in the structure of the chemo resistance to antimycobacterial drugs to II series based on strains of MBT.

**Key words:** tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, strains, Kharkiv region, resistance, VNTR.

---

### Контактна інформація:

Потейко Петро Іванович, к. мед. н., доц., зав. кафедри фізіотрії та пульмонології  
61176, м. Харків, просп. Московський, 197  
Тел. (057) 738-71-87. E-mail: kfp1930@ukr.net

Стаття надійшла до редакції 22 грудня 2015 р.