

Із таблиці 3 видно, що тільки 38,4 % хворих з вперше виявленим полі- і мультирезистентним туберкульозом через 4 роки спостереження залишаються здоровими. Варто звернути увагу на високий процент смертності серед цих хворих та переходу в хронічні форми туберкульозу.

Таким чином, на підставі проведеного аналізу можна зробити наступні висновки.

Наявність медикаментозної резистентності МБТ у хворих з вперше діагностованим деструктивним туберкульозом легень значно знижує ефективність лікування цієї ка-

тегорії хворих. Результати лікування таких хворих як безпосередні так і у віддаленому періоді залежать від застосування хімотерапії в поєднанні з неспецифічними методами і своєчасного хірургічного лікування, від тривалості стаціонарного етапу лікування, регулярності приймання препаратів та відношення хворого до лікування.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Фещенко Ю.І., Мельник В.М., Коблянська А.В. Хіміорезистентний туберкульоз – К.: Здоров'я, 2003. – 133с.

УДК 616.24-002.5-036.1

**Крутько В.С., Филипенко М.Л.\*, Ляшенко О.О., Рот М.А.\*, Потейко П.І., Стаднікова А.В., Сокол Т.В., Кашуба Д.О.**

**РЕЗУЛЬТАТИ ГЕНОТИПУВАННЯ ШТАМІВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ М. ХАРКОВА**

Харківська медична академія післядипломної освіти

\*Новосибірський інститут хімічної біології і фундаментальної медицини СВ РАН

**РЕЗУЛЬТАТИ ГЕНОТИПУВАННЯ ШТАМІВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ М. ХАРКОВА** – Для генотипування штамів МБТ, що циркулюють у м. Харкові, використовувалася методика VNTR-типування M. tuberculosis по ETR A, C, E локусах. Досліджено 106 культур. Найбільше часто зустрічалися VNTR-профілі 445 і 442, що відповідає генотипу Beijing (33 %) і 222, що відповідає генотипу LA-M (23 %).

**РЕЗУЛЬТАТИ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ Г. ХАРЬКОВА** – Для генотипирования штаммов МБТ, циркулирующих в г. Харькове, использовалась методика VNTR-типирования по ETR A, C, E локусам. Исследовано 106 культур. Наиболее часто встречались VNTR-профили 445 и 442, что соответствует генотипу Beijing (33%) и 222, что соответствует генотипу LA-M(23%).

**RESULTS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS GENOTYPING IN PATIENTS WITH PULMONARY TUBERCULOSIS FROM KHARKIV** – VNTR-typing method by ETR A, C, E locuses was used for genotyping of Mycobacterium tuberculosis strains circulating in Kharkiv. 106 clinical isolates of M. tuberculosis were investigated. VNTR-profiles 445 and 442 were determined most frequently that corresponded to Beijing genotype (33 %) and 222 that corresponded to LA-M genotype (23 %).

**Ключові слова:** M. tuberculosis, генотипування, VNTR.  
**Ключевые слова:** M. tuberculosis, генотипирование, VNTR.  
**Key words:** M. tuberculosis, genotyping, VNTR.

**ВСТУП** Туберкульоз є одним з найпоширеніших інфекційних захворювань у світі. За даними ВООЗ, щорічно у світі занедажують на туберкульоз близько 9 мільйонів чоловік і близько 3 мільйонів хворих вмирають від цієї хвороби [9].

Епідемічна ситуація з туберкульозу на Україні вкрай несприятлива – щорічно занедажують на туберкульоз близько 40 тис. чоловік і вмирає від нього приблизно 10 тис. хворих [4]. У Харківській області останніми двома роками захворюваність на туберкульоз стабілізувалася (94,7 і 94,0 на 100 тис. населення в 2003 і 2004 р. відповідно), однак смертність збільшилася (19,4 і 20,1 на 100 тис. в 2003 і 2004 р. відповідно).

Важливу роль у погіршенні епідемічної ситуації з туберкульозу грають зміна сучасних соціально-економічних і екологічних умов, зниження реактивності людського організму, а також зміна самого збудника захворювання – M. tuberculosis (МБТ). Все більшого значення набуває проблема стійкості МБТ до протитуберкульозних препаратів, що призводить до зниження ефективності лікування хво-

рих.

З розвитком молекулярної генетики стало можливим на сьогодні проводити генетичне типування МБТ, що дозволяє розрізнити штами збудника, виділені від хворих на туберкульоз, і більш точно проводити епідеміологічний нагляд за резистентним туберкульозом.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій з молекулярної епідеміології туберкульозу** У різних регіонах миру описана циркуляція різних генетичних сімейств M. tuberculosis, з них найбільш поширеним є Beijing (W), Haarlem, Latin American and Mediterranean (LA-M), Africa та деякі ін. [8, 12]. У цілому ряді спостережень виявлено, що випадки тяжкого перебігу й неефективного лікування часто пов'язані із зараженням штамми МБТ сімейства Beijing [10]. Широке розповсюдження генотипу Beijing спостерігається на території Китаю, країн Південно-Східної Азії, [12] і Карибського басейну, у Південній Африці, у США [5], а також у країнах колишнього Радянського Союзу [1-3]. Даних про генетичні характеристики штамів, що циркулюють на території України, в доступній літературі ми не зустріли.

В усьому світі "золотим стандартом" при молекулярно-епідеміологічних дослідженнях МБТ є IS6110-RFLP метод (restriction fragment length polymorphism). Даний метод досить складний, процедура дослідження багатоетапна, забирає тривалий час, вимагає складного оснащення й високої кваліфікації персоналу. Поряд з IS6110-RFLP методом у світі використовують інші методики. Одним з найбільш перспективних є VNTR-метод (variable numbers of tandem repeats), заснований на варіабельності числа тандемних повторів у різних геномних локусах. VNTR-метод простіший, проводиться протягом доби, не вимагає дорогого обладнання [11]. За даними літератури, встановлена висока кореляція RFLP і VNTR методів (до 98 %) [6, 8].

**Мета дослідження** Встановлення розподілу різних штамів M. tuberculosis, що циркулюють на території м. Харкова, за даними генотипування.

**Виклад основного матеріалу дослідження** Матеріалом для дослідження були культури МБТ, виділені від 106 хворих на туберкульоз легень. Переважали чоловіки – 86 (81 %) у віці 20 – 60 років. За типом туберкульозного процесу хворі розподілилися таким чином: вперше діагностований туберкульоз був у 51 (48 %), рецидив туберкульозу – у 7 (7 %), хронічний туберкульоз – у 48 (45 %). Дисемінований туберкульоз легень був у 6 (6 %), інфільтративний – у 68 (64 %), казеозна пневмонія – у 2 (2 %), фіброзно-кавернозний – у 30 (28 %) хворих. Деструктивні зміни в легенях відзначалися у 98 (93 %) хворих. Бактеріо-

виділення встановлено у всіх хворих. Лікарняна чутливість МБТ до хіміопрепаратів (ХП) вивчена у всіх хворих методом абсолютних концентрацій. Резистентність МБТ до ХП виявлена у 78 (74 %) хворих. У вперше виявлених хворих на туберкульоз лікарняну стійкість МБТ встановлено у 33 (65 %), з рецидивом – у 4 (57 %), із хронічним туберкульозом легень – у 41 (85 %) хворого. Монорезистентний туберкульоз спостерігався у 14 (13 %) хворих, полірезистентний – у 64 (61 %), у тому числі мультирезистентний – у 50 (47 %) хворих.

Культури *M.tuberculosis* відбиралися випадковим методом у Централізованій міській бактеріологічній лабораторії м. Харкова. У дослідженні представлені всі райони міста. Мікобактерії вирощували на середовищі Левенштейна-Йенсена. VNTR-типювання проводилося по трьох локусах ETR (exact tandem repeat) A, C, E за методикою R. Frothingham і W. A [7] в Інституті хімічної біології і фундаментальної медицини СВ РАН. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використали олегонуклеотидні праймери:

ETR-A1 AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT; ETR-A2 CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT; ETR-C1 GTGAGTCGCTGCAGAACSTGCAG; ETR-C2 GCGTCTTGACSTCCACGAGTG; ETR-E1 CTTCCGGCTCGAAGAGAGCCTC; ETR-E2 CGGAACGCTGGTCAACACSTAAG.

ПЛР проводили у 25 мкл буфера, що містить 6,7 мМ трис-HCl (pH8.9), 16 мМ сульфат амонію, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,005% Tween 20, 0,2 мМ dNTP, 1 мкМ праймери, 0,2-2 нг/мкл матриці ДНК і 1 од. акт. Taq-полімерази. Ампліфікацію проводили в наступному режимі: первинна денатурація протягом 3 хв при 95°C, потім 34 цикли: денатурація – 10 с при 95°C, віджиг праймерів – 5 с при 65°C, елонгація – 1 хв при 72°C (5 хв на останньому циклі). Отримані ампліфіковані суміші аналізували електрофорезом у 6%-ному поліакриламідному гелі з наступною візуалізацією ДНК бромистим етидієм. Кількість тандемних одиниць визначалася за оцінкою розміру ПЛР-продукту на поліакриламідному гелі. Профіль алелю виражався як тризначне число, у якому кожна цифра визначає кількість копій у специфічному локусі. На підставі літературних даних VNTR-профілі 442 і 445 по ETR A, C, E локусах були віднесені до штаму Beijing, профілі 222 і 243 – до штаму LA-M, 333 – до штаму Haarlem.

У результаті молекулярно-генетичних досліджень встановлено, що у 35 (33 %) хворих виявлені штами Beijing, у 24 (22 %) – штаму LA-M, у 11 (10 %) – Haarlem, у 36 (34 %) – штами індивідуальних профілів. Отримані дані представлені на рис. 1.

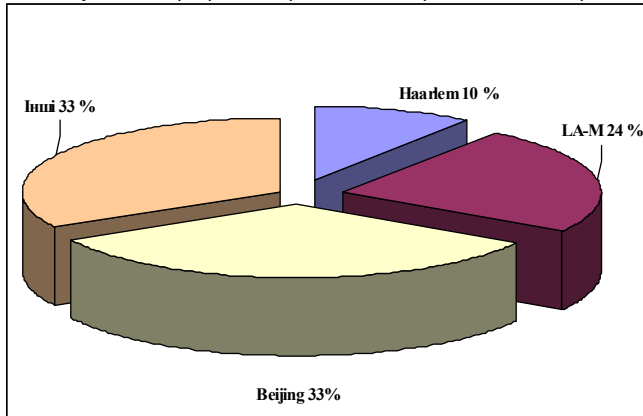


Рис. 1. Розподіл VNTR-профільв штамів *M. tuberculosis*, які виділені від хворих на туберкульоз м. Харкова.

Таким чином, у м. Харкові переважає туберкульоз, який викликаний двома сімействами штамів МБТ – Beijing і LA-M, на частку яких доводиться 57 %.

Встановлено, що серед штамів Beijing стійкість до ізоніазиду (H) зустрічалася у 24 (69 %), до рифампіцину (R) – у 21 (60 %), мультирезистентність (стійкість як мінімум до H і R) – у 21 (60 %) випадку. Серед штамів LA-M стійкість до H та R зустрічалася однаково часто – у 17 (71 %), мультирезистентність – також у 17 (71 %) випадках. Серед штамів Haarlem – стійкість до H зустрічалася у 5 (45 %), до R – у 2 (18 %), мультирезистентність – у 2 (18 %) випадках. Штами індивідуальних профілів мали стійкість до H у 15 (42 %), до R – у 10 (28 %), мультирезистентність – у 24 (67 %)

випадках. Частота стійкості до H та R у виділених штамів МБТ представлена на рис. 2.

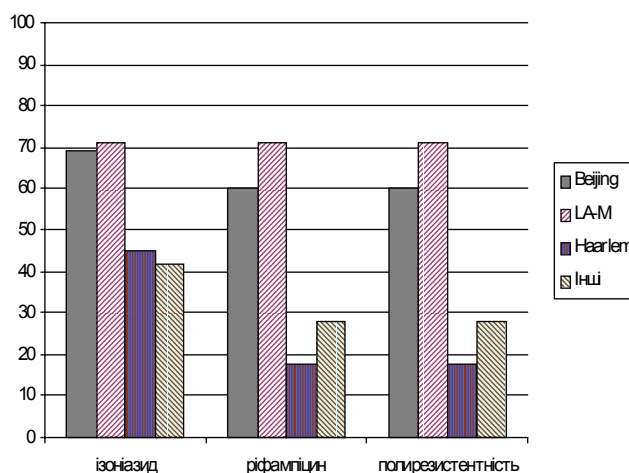


Рис. 2. Частота стійкості МБТ різних генотипів до хіміопрепаратів (в %).

Таким чином, в обох сімействах штамів МБТ (Beijing та LA-M), які частіше зустрічаються, відзначається висока частота (близько 70 %) стійкості до ізоніазиду і рифампіцину.

**ВИСНОВКИ** 1. Вперше проведене в м. Харкові генотипування *M. tuberculosis* виявило, що найчастіше зустрічаються штами сімейства Beijing (33 %) і LA-M (22 %), для яких характерна висока частота стійкості до основних протитуберкульозних препаратів (ізоніазиду, рифампіцину) – близько 70 %. Перевага цих штамів, безсумнівно, впливає на несприятливу епідеміологічну ситуацію з туберкульозом в м. Харкові.

2. VNTR-метод дозволяє швидко встановити генотип МБТ і дає можливість у ранній термін лікування вносити корекцію в режим хіміотерапії.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Иванов И.Ю., Степаншина В.Н., Липин М.Ю., Шемякин И.Г. Молекулярно-генетическое типирование методом RFLP-IS6110 клинических изолятов *m. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом в центральном регионе России / Мат. VII Российского съезда фтизиатров. – М., 2003. – С. 109.
2. Ковалев С.Ю., Скорняков С.Н., Кравченко М.А. и соавт. Опыт MIRU-VNTR генотипирования Уральской популяции *M. tuberculosis* / Мат. VII Российского съезда фтизиатров. – М., 2003. – С. 110.
3. Медведева Т.В., Огарков О.Б., Некипелов О.М., и соавт. Генотипирование штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Восточной Сибири / Мат. VII Российского съезда фтизиатров. – М., 2003. – С. 113.
4. Порівняльні дані про розповсюдженість туберкульозу та ефективність діяльності протитуберкульозних закладів України за 2002 та 2003 рр. / За ред. Ю.І. Фещенко. – 2004. – Київ. – 67 с.
5. Agerron T. B., Valwav S. E., Blinkhorn R. J. et al. // Clin. Infect. Dis. – 1999. – V. 29. – P. 85 - 92.
6. Bifani P.J., Plikaytis B.B., Kapur V. et al. Origin and interstate spread of a New York City multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family // JAMA. – 1996. – V. 275. – P. 452-457.
7. Frothingham R., Meeker-O'Connell W. A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats // Microbiology. – 1998. – V. 144. – P. 1189-1196.
8. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R. Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility // J. Clin. Micr. – 1999. – V. 37, № 8. – P. 2607-2618.
9. Maher D., Chaulet P., Spinaci S., Harries A. Лечение туберкулеза: рекомендации для национальных программ / 2-ое издание. – Женева, 1998. – 78 с.
10. Sonal S. // Emerging Infectious Diseases. – 2002. – V. 8, № 11. – P. 1230-1238.
11. Supply P., Mazars E., Lesjean S. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome // Molecular Microbiology. – 2000. – V. 36. – P. 762-771.
12. Van Soolingen D. L. Qian P. E., de Haas J. T. // Ibid. – 1995. – V. 33. – P. 3234-3235.