

ЖУРНАЛ
АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК
УКРАЇНИ

ТОМ 10 **3** 2004



Науковий журнал Президії
АМН України

Том 10, № 3, 2004

Заснований у липні 1995 р.

ЖУРНАЛ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

Виходить 4 рази на рік

Київ

ЗМІСТ

ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

- Заморський І. І., Резніков О. Г.* Агоністи та антагоністи серотонінових рецепторів: реалії та перспективи клінічного застосування (огляд літератури) 429
- Бощенко Ю. А., Юрченко О. А., Скрипченко Г. С.* Источники гетерогенности и "антигенной мимикрии" возбудителей инфекционных заболеваний (обзор литературы и собственных исследований) 446
- Пилипенко М. І., Розенфельд Л. Г., Мамотюк Є. М., Лукашова О. П., Кононенко О. К., Тесленко І. М., Нагулін Ю. О., Спужак Р. М., Певний А. М.* Засоби захисту від токсичної дії препаратів сульфату барію на клітини слизової оболонки шлунка і тонкої кишки при рентгенодіагностиці 460

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

- Запорожан В. М., Пішак В. П., Пересунько О. П.* Спадковий чинник в етіопатогенезі раку жіночих репродуктивних органів (клініко-генеалогічна, генетико-математична оцінка та прогнозування) (огляд літератури та власних досліджень) 471
- Фещенко Ю. І., Лискина І. В., Опанасенко Н. С.* Распространенность плевральных выпотов различной этиологии среди населения Украины (эпидемиологическое исследование, 1996–2002 гг.) 486
- Кресюн В. Й., Николаєвський В. В., Бажора Ю. І., Дробнієвські Ф. А.* Розповсюдженість мікобактерій туберкульозу, що резистентні до різних препаратів, в Одеській області (за даними молекулярно-генетичної та бактеріологічної діагностики) 498
- Гринь В. К., Гилорыбов А. М., Хрещачова Т. П.* Антицитрулиновые антитела и их роль в диагностике и клинике ревматоидного артрита (обзор литературы) 509
- Медведь В. І., Данилко В. О.* Щитовидна залоза і вагітність (огляд літератури) 518
- Эпштейн Е. В., Матящук С. И.* Ультразвуковое исследование с помощью системы цветной доплерографии васкулярной структуры новообразований щитовидной железы 530

ПРОФІЛАКТИЧНА МЕДИЦИНА

- Гончарук Є. Г., Коршун М. М., Юрженко Н. М., Брюзгіна Т. С.* Окисно-антиоксидантна рівновага при ізольованій та поєднаній дії хімічних забруднювачів ґрунту і γ -випромінювання 542

Одесский
медичний інститут
БІБЛІОТЕКА

УДК 616–002.5:579.873.2:579.253.4:615.015.8 (477.74)

В. Й. Кресюн, В. В. Ніколаєвський, Ю. І. Бажора,
Ф. А. Дробнієвські*

РОЗПОВСЮДЖЕНІСТЬ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ, ЩО РЕЗИСТЕНТНІ ДО РІЗНИХ ПРЕПАРАТІВ, В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ (за даними молекулярно-генетичної та бактеріологічної діагностики)

За допомогою бактеріологічних та молекулярно-генетичних методів визначено розповсюдженість резистентності до рифампіцину, ізоніазиду, етамбутолу та стрептоміцину мікобактерій туберкульозу, виділених з мокротиння хворих, які мешкають в Одеській області. Найвищу розповсюдженість первинної та вторинної резистентності зареєстровано для стрептоміцину та ізоніазиду (25,7 % та 10,5 %, 48,5 % та 60,6 %, відповідно). Первинна та вторинна мультирезистентність була виявлена, відповідно, у 5,7 % та 33,3 % досліджених ізолятів. Показано високу ефективність застосування молекулярно-генетичних методів, що базуються на виявленні мутацій у генах, які відповідають за розвиток резистентності. Зроблено висновок про доцільність впровадження молекулярно-генетичних методів для визначення медикаментозної резистентності збудника туберкульозу.

Ключові слова: мікобактерії туберкульозу, медикаментозна резистентність, молекулярно-генетична діагностика, бактеріологічні методи, епідеміологія.

За оцінками ВООЗ, більш ніж третина всього населення Земної кулі, тобто 2 млрд. людей, інфікована мікобактеріями туберкульозу [18]. Щороку у світі реєструється понад 8 млн. нових випадків туберкульозу та понад 2 млн. смертей від цієї хвороби. Понад 85 % усіх випадків туберкульозу реєструються у так званих країнах третього світу, причому в останнє десятиріччя стан

Одеський державний медичний університет МОЗ України, 65026 Одеса,

* Національна референс-лабораторія з діагностики туберкульозу, SE22 8QF Лондон, Великобританія.

© В. Й. Кресюн — чл.-кор. АМН України, В. В. Ніколаєвський — к.б.н.,
Ю. І. Бажора — д.м.н., Ф. А. Дробнієвські — проф., 2004.

проблеми погіршується у зв'язку з катастрофічним поширенням пандемії ВІЛ-інфекції [8].

Розвиток медикаментозної резистентності мікобактерій є одним із головних чинників зростання захворюваності на туберкульоз [13]. Розповсюдження лікарсько стійких ізолятів *M. tuberculosis*, особливо мульти- та полірезистентних, значно знижує ефективність лікування та профілактичних заходів, погіршує прогноз, спричинюючи через це значні економічні витрати. Найбільш високі рівні розповсюдженості резистентних штамів мікобактерій туберкульозу на цей час зареєстровані у країнах Балтії, багатьох областях Росії, в Китаї та деяких інших країнах світу [11, 14]. Спостерігається зв'язок між високими рівнями захворюваності на туберкульоз та розповсюдженістю штамів, які резистентні до протитуберкульозних препаратів (ПТП).

В Україні епідемія туберкульозу зареєстрована з 1995 р. За останні 10 років захворюваність на туберкульоз у нашій державі зростає більш ніж в два рази і становила у 2001 р. 68,6 на 100000 населення [6]. У Південному регіоні, наприклад у Одеській та Миколаївській областях, захворюваність перевищує значення середньоукраїнських показників на 10–50 %. В Одеській області захворюваність у 2002 р. становила 80,4 на 100000 населення [1].

Дані щодо розповсюдженості лікарсько стійких штамів збудника туберкульозу в Україні є недостатніми. За окремими оцінками, які базуються на ретроспективному аналізі історій хвороб та результатів бактеріологічних досліджень, рівні розповсюдженості штамів *M. tuberculosis*, стійких до основних ПТП, коливаються у межах 10–20 % та більше, причому спостерігається зростання чисельності мульти- та полірезистентних штамів, що є несприятливим епідеміологічним показником [2, 3]. Проспективні або популяційно обґрунтовані дослідження лікарської резистентності мікобактерій в Україні на цей час відсутні. Між тим досвід інших країн з високими рівнями захворюваності на туберкульоз у поєднанні з поширенням епідемії ВІЛ/СНІД дозволяє припустити, що зростання медикаментозної резистентності ізолятів мікобактерій до головних ПТП є важливим чинником поширення епідемії туберкульозу в Україні, що потребує подальших досліджень.

Міжнародно визнаним “золотим стандартом” лабораторних тестів на чутливість до ПТП на цей час залишаються бактеріологічні методи. В Україні, згідно з Наказом МОЗ України № 45 від 6 лютого 2002 р., лікарська резистентність діагностується методом абсолютних концентрацій на щільному поживному середовищі Льовенштайна – Єнсена [4]. Цей метод характеризується відносною простотою, доступністю та дешевиною, але за чутливістю, витратами праці та часу він поступається методам автоматизованого вирощування мікобактерій *ВАСТЕС* та молекулярно-генетичним методам.

Використання молекулярно-генетичних підходів до діагностики чутливості до ПТП стало можливим завдяки розшифровці молекулярних механізмів розвитку лікарської резистентності мікобактерій. Сьогодні відомо понад 12 генів, які відповідають за розвиток резистентності мікобактерій до стрептоміцину, рифампіцину, ізоніазиду, етамбутолу та інших ПТП [17]. Більшість

молекулярних методів діагностики резистентності базується на ампліфікації відповідної ділянки гена з подальшою гібридизацією помічених продуктів ампліфікації з відповідним ДНК-зондом. Створено комерційні та некомерційні тест-системи, які характеризуються високою чутливістю, специфічністю та широко використовуються в практичній лабораторній діагностиці туберкульозу [5, 10].

З клінічної та епідеміологічної точок зору, надзвичайно важливим є прискорене виявлення резистентності виділеного штаму мікобактерій до двох головних препаратів — рифампіцину та ізоніазиду, що характеризує мультирезистентні штами. Нещодавно була продемонстрована ефективність використання некомерційних тест-систем (що базуються на аналізі обмеженого набору кодонів у генах *rpoB*, *katG* та *inhA*) для скринінгу лікарської резистентності штамів *M. tuberculosis* в умовах високої захворюваності на туберкульоз [16]. Висока чутливість та специфічність у поєднанні з економією витрат праці, часу та відносною дешевизною дозволяють рекомендувати цей метод для застосування в нашій державі.

Метою дослідження було визначення бактеріологічними та молекулярно-генетичними методами первинної та набутої резистентності до чотирьох ПТП першого ряду штамів мікобактерій туберкульозу, що були виділені від хворих протягом проспективного дослідження.

Матеріал, обстежувані та методи. З метою забезпечення репрезентативності результатів щодо розповсюдженості резистентних штамів в Одеській області дослідження було сплановане та проведено за методом “зрізу” (*cross-sectional study*) [7] на проспективній основі. У дослідження були включені всі хворі з різними формами легеневого туберкульозу, які відвідували поліклінічне відділення Одеського обласного протитуберкульозного диспансеру протягом червня-липня 2003 р., а також хворі, які були направлені до приймального відділення Одеської обласної протитуберкульозної лікарні протягом двох тижнів у червні 2003 р.

Епідеміологічні та анамнестичні дані було проаналізовано на матеріалі 146 анкет хворих (122 чоловіків, 24 жінок віком 18–72 років) з різними формами легеневого туберкульозу. Мешканцями міста Одеси були 27 хворих, міста Іллічевська — 9, Одеської області — 106; не мали постійного місця мешкання 4 хворих, 21 хворий (14,3 %) у минулому перебував у місцях позбавлення волі.

Досить різноманітними були клінічні прояви туберкульозної інфекції. Більш за все було хворих з інфільтративними (73 чол., або 50,0 %) та дисемінованими (55 чол., або 37,7 %) формами легеневого туберкульозу. Інші форми були представлені вогнищевими та фіброзно-кавернозними (по 4,8 %), казеозною пневмонією, циротичним туберкульозом та туберкуломою (по 1 випадку, або 0,7 %). У всіх хворих діагноз легеневого туберкульозу базувався на даних рентгенологічного дослідження та клінічної картини.

У зв'язку з тим, що Одеський протитуберкульозний диспансер є базовим закладом, який обслуговує усе населення Одещини, результати дослідження можуть бути розглянуті як індикативні для області у цілому.

Для збору анамнестичних та епідеміологічних даних на кожного хворого лікарем або медичною сестрою була заповнена анкета, в якій містились 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 інформація про призначене лікування та дата початку протитуберкульозної терапії.

Бактеріоскопічні та бактеріологічні дослідження мокротиння проводилися згідно з Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. [4]. Мокротиння від хворих збиралося три рази протягом трьох діб. Кожну порцію матеріалу було поділено на дві частини. З першої частини виготовляли мазки для бактеріоскопії, другу половину використовували для культуральних досліджень.

Мазки фарбували за Цілем — Нільсеном та мікроскопували, використовуючи імерсійну систему. Результат дослідження вважали позитивним, якщо у мазку було знайдено 5 та більше кислотостійких паличок при перегляданні 100 полів зору.

Бактеріологічні (культуральні) дослідження здійснювали шляхом посіву мокротиння, обробленого 12 % стерильним розчином Na_3PO_4 , на щільні поживні середовища Льовенштайна — Єнсена. Посіви переглядали кожного тижня, при наявності росту культуру мікроскопували та констатували позитивний результат. Аналіз вважали негативним при відсутності росту протягом 2,5 міс з моменту посіву. *M. tuberculosis* ідентифікували за ніациновим тестом.

Чутливість мікобактерій до рифампіцину (20,0 мкг/мл), стрептоміцину (5,0 мкг/мл), ізоніазиду (1,0 мкг/мл) та етамбутолу (5,0 мкг/мл) визначали за методом абсолютних концентрацій на щільному поживному середовищі. Культуру вважали стійкою при наявності більше 20 колоній у пробірці під час реєстрації результатів. В якості контрольного використовували чутливий штам *H37RV*.

Молекулярно-генетичні дослідження стійкості виділених ізолятів мікобактерій були проведені у молекулярно-генетичному відділі Національної референс-лабораторії з діагностики туберкульозу Великобританії (Лондон). Для визначення стійкості до рифампіцину та ізоніазиду використовували метод зворотної гібридизації ампліфікованих фрагментів генів, що відповідають за розвиток медикаментозної резистентності, з нормальними та мутантними ДНК-зондами [9, 16].

Виділення ДНК здійснювали шляхом лізису з подальшою депротеїнізацією 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 ПЛР-буфера (*Bioline*, Великобританія), 0,5 од. *Taq*-полімерази (*Bioline*), 0,5 мкл 2 мМ 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 здій-

снювали за наступною програмою: 5 хв – 95 (С, далі 35 циклів (плавлення 95 °С – 30 с, віджиг 65 (С – 30 с, елонгація 72 (С – 1 хв) і закінчували витримкою зразків протягом 5 хв при 72 (С. Аналіз продуктів ампліфікації проводили у 2 % агарозному гелі, пофарбованому етидієм бромідом.

ДНК-зонди, що відповідали нормальним та мутантним послідовностям генів *rpoB*, *katG* та *inhA*, іммобілізували на стрічках нейлонової мембрани у вигляді точок. Всього у даному дослідженні було використано 10 зондів; 6 із них відповідали нормальним нуклеотидним послідовностям фрагментів гена *rpoB*, у 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 (рис. 1).

Гібридизацію ПЦР-продуктів із зондами проводили при постійному обертанні у гібридизаційній печі при 62 (С протягом 30 хв. Після промивки мембрани інкубували у 0,5 % розчині блокуючого реагенту (*Roche*) з додаванням кон'югату стрептавідін-лужна фосфатаза (*BioGenex*, США) у концентрації 1:100 протягом 20 хв. Проявлення кольору здійснювали у розчині нітросинього тетразолія з бромохлороіндолілфосфатом (1:100 у диметилформаміді). Проявлені мембрани висушували при кімнатній температурі та проводили облік результатів.

Результати та їх обговорення. За результатами бактеріоскопії мазків мокротиння, зафарбованих за Цілем – Нільсеном, кислотостійкі палички були виявлені у 72 хворих (49,3 %). Бактеріологічне дослідження мокротиння методом посіву на щільне поживне середовище Льовенштайна – Єнсена дозволило виявити наявність мікобактерій у 79 (54,1 %) хворих. Усі виділені культури були ідентифіковані як *M. tuberculosis*. Подальші дослідження бактеріологічними та молекулярно-генетичними методами проводилися на матеріалі цих 79 ізолятів.

Бактеріологічні дослідження виділених ізолятів збудника туберкульозу на чутливість до ПТП проводили методом абсолютних концентрацій на щільних поживних середовищах. Як й очікувалося, розповсюдженість вторинної, або набутої резистентності до усіх досліджених препаратів була набагато вище первинної (рис. 2). Найвищу розповсюдженість набутої резистентності виявлено до ізоніазиду та стрептоміцину – 60,6 % та 48,5 %, відповідно. Взагалі лише 27,2 % усіх штамів, які були виділені від хворих, що лікувалися раніше від туберкульозу, були чутливі до усіх досліджуваних препаратів. Усі інші (72,8 %, тобто майже кожні три з чотирьох), були резистентними до одного або кількох препаратів. Мультирезистентними, тобто нечутливими одночасно до рифампіцину та ізоніазиду, виявилися 33,3 % штамів.

Значно меншою, але істотною, виявилася розповсюдженість первинної резистентності ізолятів мікобактерій. Резистентністю до одного або кількох ПТП характеризувалися 34,3 % штамів, що були виділені від хворих, які ніколи не лікувалися від туберкульозу (або лікувалися менш ніж чотири тижні).

№ зразка	●	●	●	●	●	●	○	●	○	●
	1					2a	2б	3a	3б	4

Рис. 1. Нейлонова мембрана з ДНК-зондами для визначення мутацій у генах, що асоційовані з лікарською резистентністю:

- 1 – ДНК-зонди, що відповідають нормальній послідовності гена *proB* (чутливість до рифампіцину);
- 2a – ДНК-зонд, що відповідає нормальній послідовності гена *inhA* (чутливість до ізоніазиду);
- 2б – ДНК-зонд, що відповідає мутантній послідовності гена *inhA* (резистентність до ізоніазиду);
- 3a – ДНК-зонд, що відповідає нормальній послідовності гена *katG* (чутливість до ізоніазиду);
- 3б – ДНК-зонд, що відповідає мутантній послідовності гена *katG* (резистентність до ізоніазиду);
- 4 – ДНК-зонд, призначений для контролю реакції.

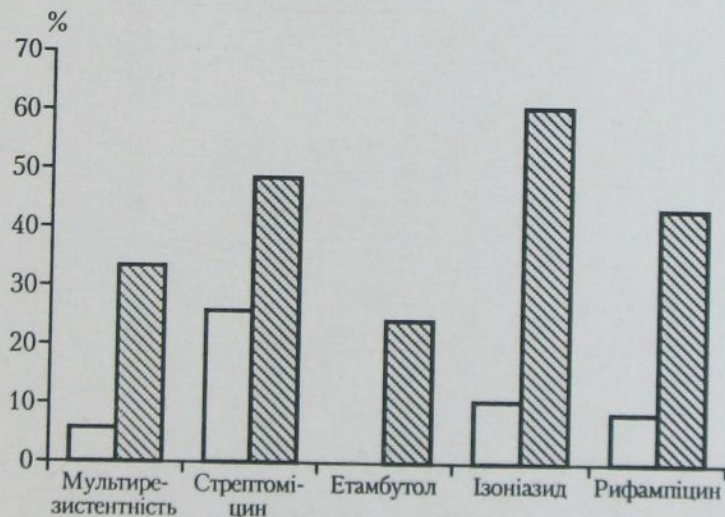


Рис. 2. Первинна (світлі стовпчики) та набута (заштриховані стовпчики) резистентність ізолятів *M. tuberculosis* до різних ПТП (за даними бактеріологічної діагностики).

Досить високою була розповсюдженість первинної резистентності до стрептоміцину (25,7 %). Для рифампіцину та ізоніазиду були зареєстровані близькі рівні розповсюдженості лікарської резистентності (8,5 % та 10,5 %, відповідно). Важливо підкреслити, що жоден штам з цієї групи не характеризувався резистентністю до етамбутолу, 5,7 % штамів, що були виділені від первинних хворих, були мультирезистентними.

Переважна більшість виділених штамів характеризувалася полірезистентністю, тобто стійкістю до двох або більш ПТП. 9 ізолятів (11,4 % усіх досліджених штамів) були нечутливими одночасно до чотирьох препаратів. Всі вони належали хворим, які отримували раніше протитуберкульозну терапію. Загальна кількість монорезистентних штамів становила 21 (26,6 % загальної кількості штамів).

Молекулярно-генетичні дослідження стійкості штамів мікобактерій були проведені на матеріалі екстрактів ДНК, що були виділені з вищезазначених культур *M. tuberculosis*. Препарати ДНК належної якості були отримані з 54 штамів.

Мультиплексна ампліфікація ділянок генів *rpoB*, *katG* та *inhA*, які відповідають за розвиток лікарської резистентності, була успішною для всіх 54 препаратів ДНК. Наявність фрагмента гена *rpoB* (260 п. н.) одночасно свідчила про належність досліджуваного штаму до виду *M. tuberculosis*, що підтвердило дані мікробіологічних досліджень. 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*, таким чином, зробити висновки про резистентність досліджуваних штамів до рифампіцину та ізоніазиду.

Чимале значення для оцінки ефективності та визначення шляхів застосування молекулярно-генетичних методів у лабораторній діагностиці туберкульозу має порівняння їх результатів з даними бактеріологічних досліджень. Результати такого порівняльного аналізу щодо розповсюдженості резистентності виділених штамів мікобактерій до рифампіцину та ізоніазиду добре збігаються між собою (таблиця). З 54 ізолятів однакові результати за даними обох способів були отримані для 48 (88,9 %) штамів. Найкращий збіг результатів (100 %) спостерігався у групі повністю чутливих за даними бактеріологічної діагностики ізолятів, у жодного з яких не було знайдено мутацій у відповідних ділянках генів *rpoB*, *katG* та *inhA*.

Серед 13 штамів, які були бактеріологічно ідентифіковані як резистентні до рифампіцину, у 12 були знайдені мутації у гені *rpoB*, переважна більшість яких була сконцентрована у ділянці 526–531 кодонів. У одного штаму мутацій зареєстровано не було. Відсутність мутацій приблизно у 5 % стійких до рифампіцину штамів є відомим феноменом [17], що, мабуть, відображає наявність інших механізмів розвитку резистентності *M. tuberculosis* до рифампіцину.

З 23 ізолятів, які були бактеріологічно ідентифіковані як резистентні до ізоніазиду, наявність мутацій у генах *katG* та *inhA* була зареєстрована у 21 (91,3 %), що, можливо, свідчить про зумовленість резистентності у цих випадках мутаціями в інших генах, наприклад, *ahpC* [15, 17]. Усі бактеріологічно чутливі до ізоніазиду штами були вірно ідентифіковані молекулярно-генетичними методами, тобто не містили мутацій у відповідних ділянках генів. Чутливість молекулярно-генетичних методів, яка була підрахована виходячи з результатів аналізу наших даних, становила 85,7 % та 91,3 %, відповідно,

Порівняльний аналіз результатів молекулярно-генетичних та мікробіологічних тестів на чутливість до рифампіцину та ізоніазиду, кількість ізолятів

Мікробіологічні тести	Молекулярно-генетичні тести			
	ІР-РР	ІР-РЧ	ІЧ-РР	ІЧ-РЧ
ІР-РР	12	1	0	0
ІР-РЧ	2	6	0	2
ІЧ-РР	0	0	0	1
ІЧ-РЧ	0	0	0	30

Примітки: ІР – резистентність до ізоніазиду, ІЧ – чутливість до ізоніазиду, РР – резистентність до рифампіцину, РЧ – чутливість до рифампіцину,

для визначення стійкості до рифампіцину та ізоніазиду; специфічність – 95,0 % та 93,9 %, відповідно.

Отже, на підставі аналізу результатів даного дослідження вдалося вперше встановити рівні розповсюдженості первинної та набутої лікарської резистентності штамів *M. tuberculosis*, що циркулюють в Одеській області. Проспективне виконання дослідження з використанням двох методів – бактеріологічного та молекулярно-генетичного – дозволило отримати інформацію щодо наявних на цей час показників резистентності до головних ПТП та порівняти ефективність застосування цих методів у практичній лабораторній діагностиці.

Отримані дані свідчать про те, що розповсюдженість штамів мікобактерій з набутою (вторинною) резистентністю, які циркулюють в Одеській області, досить висока; її рівень є близьким до такого штамів, що були виділені від хворих у країнах Балтії, у Північно-Західній Росії та інших регіонах з високими рівнями розповсюдженості лікарської резистентності [9, 14, 20]. Найвища розповсюдженість набутої резистентності була зареєстрована для ізоніазиду.

Ситуація з первинною резистентністю до ПТП першого ряду, особливо до стрептоміцину, ізоніазиду та рифампіцину, є також тривожною. Дуже високою є розповсюдженість первинної резистентності до стрептоміцину (перевищує 25 %), що свідчить про активну циркуляцію таких штамів та неефективність застосування цього препарату без попереднього ретельного тестування виділеного штаму на чутливість до нього. Частка первинно мультирезистентних штамів (нечутливих одночасно до ізоніазиду та рифампіцину), за нашими даними, становить 5,7 % та є близькою до рівнів, про які було повідомлено для Ірану, деяких регіонів Індії та інших країн Сходу. Незважаючи на те, що значення цих показників є помірними у порівнянні з деякими іншими країнами СНД, для яких є достовірна інформація, вони в 3–4 рази перебільшують такі для розвинутих країн Європи та Північної Америки [14, 20]. Значна питома вага лікарської стійкості штамів серед мікобактерій, які циркулюють на території Одеської області, у певній мірі обмежує можливості використання препаратів першого ряду для терапії туберкульозу та, на нашу думку, є важливим чинником погіршення епідемічної ситуації у цьому регіоні.

Незважаючи на те, що бактеріологічні методи залишаються сьогодні "золотим стандартом" у визначенні резистентності мікобактерій туберкульозу до ПТП, молекулярно-генетичні методи останнім часом набувають чималого значення та з успіхом застосовуються для діагностики та скринінгу завдяки своїй високій ефективності, чутливості та специфічності, а також значному збереженню витрат праці та часу [5, 10, 13]. У нашому дослідженні застосування молекулярно-генетичного методу, що базується на реєстрації мутацій у генах *katG*, *inhA* та *inhA*, дозволило виявити понад 90 % штамів *M. tuberculosis*, резистентних до рифампіцину та ізоніазиду. Чутливість та специфічність методу виявилися близькими або вищими тих, дані про які були опубліковані раніше [12, 16, 19], що свідчить про ефективність використання молекулярно-генетичних тест-систем, які базуються на детектуванні найбільш розповсюджених типів мутацій. Відносна дешевина та доступність таких некомерційних тест-систем, які визначають наявність мутацій в обмеженому спектрі кодонів відповідних генів, дозволяє з успіхом використовувати їх для скринінгу або діагностики лікарської резистентності у країнах з високими рівнями захворюваності на туберкульоз, до яких належить й Україна.

Патерни резистентності, а також дані щодо спектру мутацій, які відповідають за розвиток лікарської стійкості, отримані за допомогою молекулярно-генетичних методів у сукупності з даними генотипування, можуть бути використані у молекулярно-епідеміологічному аналізі штамів, які циркулюють в різних регіонах, та сприяти прогнозуванню епідемічного процесу в Україні. Таким чином, комплексний підхід до питань діагностики медикаментозної резистентності мікобактерій з використанням бактеріологічних та молекулярно-генетичних методів дозволяє отримати нові дані щодо розповсюдженості медикаментозно резистентних штамів *M. tuberculosis* на території України. Це дозволить значно підвищити ефективність лікування туберкульозу та зменшити ймовірність виникнення та розвитку лікарської резистентності мікобактерій.

Автори висловлюють щире подяку головним лікарям та співробітникам бактеріологічних лабораторій Одеського обласного протитуберкульозного диспансеру та Одеської обласної протитуберкульозної лікарні, а також колегам з Національної референс-лабораторії з діагностики туберкульозу Великобританії (*HPA Mycobacterium Reference Unit, King's College London*) за співробітництво, допомогу у зборі, обробці матеріалу та аналізі результатів дослідження.

Література

1. *Європейська база даних "Здоров'я для усіх"*: Європейське бюро ВООЗ, Копенгаген, Данія, 2003. <http://www.euro.who.int/hfadb>.
2. Журило О. А., Турченко Л. В., Клименко М. Т. та ін. Ситуація з мультирезистентного та полірезистентного туберкульозу в м. Києві // Укр. пульмонол. журн. – 2002. – № 3. – С. 36–39.
3. Левицька Н. А., Бажора Ю. І., Николаєвський В. В., Асмолов О. К. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу, що були виділені від хворих в Миколаївській області України протягом 2000–2002 рр. // Укр. пульмонол. журн. – 2003. – № 4. – С. 17–20.

4. Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. "Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції" (складена під керівництвом Ю. І. Фещенко, О. А. Журило, М. Т. Клименко та ін.) // Збірник нормативно-директивних документів з охорони здоров'я. – 2002 – № 2. – С. 63–111.
5. Николаевский В. В., Бажора Ю. И. Выявление лекарственной устойчивости микобактерий молекулярно-генетическими методами // Буковинський мед. вісник. – 2003. – 7, № 3. – С. 137–144.
6. Фещенко Ю. И. Ситуация с туберкулезом в Украине // Доктор. – 2002. – № 4. – С. 11–14.
7. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины: Пер.с англ. – М.: Медиа сфера, 1998. – 352 с.
8. Coker R., Miller R. HIV associated tuberculosis // Br. Med. J. – 1997. – 314. – P. 1847.
9. Drobniowski F. A., Balabanova Y. M., Ruddy M. et al. Rifampin- and multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – 8. – P. 1320–1326.
10. Drobniowski F. A., Caws M., Gibson A., Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis // Lancet Infect. Dis. – 2003. – 3, № 3. – P. 141–147.
11. Espinal M. A. The global situation of MDR-TB // Tuberculosis. – 2003. – 83. – P. 44–51.
12. Garcia de Viedma G. Rapid detection of resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review discussing molecular approaches // Clin. Microbiol. Infect. – 2002. – 9. – P. 349–359.
13. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis: 2nd ed. / Ed. M. A. Aziz. – Geneva: WHO, 2003. – 72 p.
14. Kruuner A., Hoffner S. E., Sillastu H. et al. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia // J. Clin. Microbiol. – 2001. – 39. – P. 3339–3345.
15. Musser J. M. Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: molecular genetic insights // Clin. Micr. Rev. – 1995. – 8. – P. 496–514.
16. Nikolayevskyy V. V., Brown T. J., Balabanova Ya. M. et al. Detection of mutations associated with isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Samara Region, Russian Federation // J. Clin. Microbiol. – 2004. – in press.
17. Rattan A., Kalia A., Ahmad N. Multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis: molecular perspectives // Emerg. Infect. Dis. – 1998. – 4. – P. 195–209.
18. Ravighione M. C., Snider D. E., Koshi A. Global epidemiology of tuberculosis – morbidity and mortality of a worldwide epidemic // JAMA. – 1995. – 273. – P. 220–226.
19. Rie A., van, Warren R., Mshanga I. et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in a high-incidence community // J. Clin. Microbiol. – 2001. – 39. – P. 636–641.
20. World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world: prevalence and trends. Report № 2. WHO/CDS/TB/2000.278. – Geneva: WHO, 2000. – 253 p.

Одержано 8.06.2004

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ
ТУБЕРКУЛЕЗА, РЕЗИСТЕНТНЫХ К РАЗНЫМ
ПРЕПАРАТАМ, В ОДЕССКОЙ ОБЛАСТИ
(по данным молекулярно-генетической
и бактериологической диагностики)**

В. И. Кресюн, В. В. Николаевский, Ю. И. Бажора, Ф. А. Дробниевский*

Одесский государственный медицинский университет МЗ Украины,
65026 Одесса

* Национальная референс-лаборатория по диагностике туберкулеза,
SE22 8QF Лондон, Великобритания

С помощью бактериологических и молекулярно-генетических методов определена распространенность резистентности к рифампицину, изониазиду, этамбутолу и стрептомицину микобактерий туберкулеза, выделенных из мокроты больных, проживающих в Одесской области. Наиболее высокая распространенность первичной и приобретенной резистентности зарегистрирована для стрептомицина и изониазида (25,7 % и 10,5 %, 48,5 % и 60,6 %, соответственно). Первичная и вторичная мультирезистентность была выявлена, соответственно, в 5,7 % и 33,3 % исследованных изолятов. Показана высокая эффективность применения молекулярно-генетических методов, основанных на регистрации мутаций в генах, ответственных за развитие резистентности. Сделан вывод о целесообразности внедрения молекулярно-генетических методов для определения лекарственной резистентности возбудителя туберкулеза.

**OCCURRENCE OF DRUG-RESISTANT MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS IN ODESSA OBLAST
(molecular-genetic and bacteriological data)**

V. I. Kresyun, V. V. Nikolaevsky, Yu. I. Bazhora, F. A. Drobniowski*

Odessa State Medical University Ministry of Health Ukraine, 65026 Odessa

* HPA Mycobacterium Reference Unit, King's College London, SE22 8QF London, UK

Bacteriological and molecular-genetic methods were used to determine occurrence of resistance of *Mycobacterium tuberculosis*, obtained from sputum of patients in Odesa Oblast to rifampicin, isoniazid, streptomycin and ethambutol. Highest primary and acquired resistance rates were registered for streptomycin and isoniazid (25,7 % and 10,5 %; 48,5 % and 60,6 %, respectively). Primary and acquired multi-drug resistance rates were as high as 5,7 % and 33,3 %, respectively. High efficacy of molecular-genetics methods based on detection of mutations in genes responsible for drug resistance development was demonstrated. Urgent necessity for implementation of molecular methods in the laboratory diagnosis of TB and drug resistance assessment is emphasized.