

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ ЗДОРОВЬЯ СЕМЬИ И РЕПРОДУКЦИИ
ЧЕЛОВЕКА»**

на правах рукописи



ЖДАНОВА СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОСНОВНЫХ ГЕНОТИПОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ
ТУБЕРКУЛЕЗА В СЕВЕРНОЙ АЗИИ**

14.02.02 – Эпидемиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:

Заслуженный деятель науки РФ и Республики Бурятия
доктор медицинских наук, профессор **Е.Д. Савилов**

Иркутск 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	5
1	ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЕЗА (обзор литературы)	17
1.1	Бремя глобального туберкулеза и современная ситуация в регионах России	17
1.2	Достижения современной молекулярной эпидемиологии туберкулеза	27
1.2.1	Молекулярно-биологические методы, используемые в эпидемиологических исследованиях возбудителя туберкулеза	27
1.2.2	Сценарии происхождения и направление эволюции МБТ	35
1.3	Лекарственная устойчивость и трансмиссивность успешных современных клонов МБТ	46
1.4	Распространенность различных генотипов МБТ у больных ТБ - ВИЧ	55
1.5	Распространенность различных генотипов МБТ в Северной Азии и прилежащих к ней регионов Азии и Европы	59
2	ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	72
2.1.	Материалы исследования	73
2.2.	Методы исследования	78
	Описательные методы	80
	Аналитические методы	81
	Молекулярно-генетические и филогенетические методы	82
	Статистические методы	88

3	ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МНОГОЛЕТНЕЙ ДИНАМИКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ТУБЕРКУЛЕЗА НА ИЗУЧАЕМЫХ ТЕРРИТОРИЯХ СЕВЕРНОЙ АЗИИ	90
3.1	Анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в изучаемом регионе Северной Азии	90
3.2	Анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в изучаемых регионах Сибирского федерального округа	93
3.3	Анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в изучаемых регионах Дальневосточного федерального округа	97
4	ГЛАВА 4. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПОПУЛЯЦИИ <i>M. TUBERCULOSIS</i> В СЕВЕРНОЙ АЗИИ	101
4.1	Общая характеристика гетерогенности популяции <i>M. tuberculosis</i>	101
4.2	Результаты эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в Иркутской области	112
4.3	Результаты эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в Саха (Якутии)	119
4.4	Результаты эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в Бурятии и Агинском АО Забайкальского края	123
5	МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЛУ ТУБЕРКУЛЕЗА НА ИЗУЧАЕМЫХ ТЕРРИТОРИЯХ	129
5.1	Изучение роли различных клонов <i>M. tuberculosis</i> в распространении МЛУ туберкулеза	129
5.2	Выборочные исследования мутаций, ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезным препаратам	142
5.3	Разработка ПЦР-РВ экспресс метода для выявления субтипа СС2/W148 генотипа Beijing	148

6	ГЛАВА 6. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗЕРВУАРА ИНФЕКЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗА, СОЧЕТАННОГО С ВИЧ ИНФЕКЦИЕЙ	154
6.1	Проявления эпидемического процесса ВИЧ- ассоциированного туберкулеза на изучаемых территориях Северной Азии	154
6.2	Изучение роли различных генотипов <i>M. tuberculosis</i> в распространении сочетанной патологии ВИЧ-ТБ на изучаемых территориях	164
7	МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ КЛОНОВ <i>M.</i> <i>TUBERCULOSIS</i> НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРНОЙ АЗИИ	175
7.1	Моделирование распространения эпидемически значимых клонов <i>M. tuberculosis</i> в Северной Азии по молекулярно- генетическим данным	175
7.2	Обоснование концепции возникновения и поддержания эпидемического резервуара инфекции «успешными» клонами <i>M. tuberculosis</i> в Северной Азии	188
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	203
	ВЫВОДЫ	215
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	217
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	219
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	221
	СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	223
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	224
	ПРИЛОЖЕНИЕ	260

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Треть населения в мире инфицированы микобактериями туберкулеза (МБТ) и более 9 млн. случаев туберкулеза (ТБ) диагностируется ежегодно, в результате чего почти 2 миллиона человек умирает каждый год (WHO., 2015). На ТБ приходится более четверти всех предотвратимых смертей среди взрослого населения в эндемичных по ТБ странах и треть смертей больных ВИЧ-инфекцией. Эти факты позволяют отнести ТБ к заболеваниям с высокой частотой смертности взрослого населения. Масштабы проблемы ТБ еще более усиливаются эволюцией и глобальным распространением штаммов микобактерий туберкулеза, устойчивых к противотуберкулезным препаратам (ПТП) основного и резервного ряда. Особую озабоченность вызывают случаи лекарственной устойчивости (ЛУ), увеличивающейся от множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) к вариантам инфекции, для которых не осталось эффективных терапевтических средств. Эта прогрессия привела к призывам “дальновидного политического руководства” (Abubakar I. et al., 2013; Dheda K. et al., 2014). Для того чтобы достичь желаемой цели устранения глобального туберкулеза к 2050 году заболеваемость ТБ необходимо сокращать примерно на 16% каждый год в течение следующих 40 лет. Несмотря на недавние мировые успехи в борьбе с ТБ, нынешние темпы снижения заболеваемости туберкулезом на 2% в год значительно отстают от указанной цели (WHO., 2015). Эта тревожная ситуация подчеркивает насущную необходимость новых инструментов для управления этой грозной болезнью.

Напряженность ситуации по ТБ, которая проявляется в России, тесно связана с проблемой контроля резервуара инфекции. Основу для успешного распространения возбудителя ТБ – микобактерий туберкулеза обеспечивает генетическое

разнообразии. Наиболее «молодыми» и «успешными» являются Восточноазиатская, Центрально-Азиатская и Евро-Американская филогенетические линии (Comas I. et al., 2013). Доминирующая в Восточной и Северной Азии генетическая группа является одним из самых «успешных» вариантов МБТ (Hanekom M. et al. 2011; Mokrousov I., 2015). Она содержит штаммы, которые в основном принадлежат к генетическому семейству Beijing. Глобальное распространение отдельных субтипов Beijing в последние десятилетия (Parwati I. et al., 2010; Hanekom M. et al. 2011; Mokrousov I., 2015) связаны с их способностью вызывать вспышки болезни, внелегочную диссеминацию (Mokrousov I. et al., 2012; Hanekom M. et al. 2013; Mokrousov I., 2015), и активно развивать устойчивость к антибиотикам (Mokrousov I. et al., 2006; Lasunskaja E. et al., 2010; Parwati I. et al., 2010). Ведущую роль в их экспансии отдают миграционным факторам, обеспечивающим географическое распространение, социальным и генетическим особенностям восприимчивой популяции, способствующей закреплению новых клонов и формированию активного резервуара инфекции на локальной территории (Mokrousov I., 2015). Следует отметить, что взаимодействие между адаптированными к местным условиям штаммами МБТ и географически соответствующей популяцией хозяина в целом зависит от сформировавшегося общего иммунного ответа, но эти взаимодействия могут быть сорваны рядом факторов, среди которых важную роль играет ВИЧ-инфекция (Fenner L. et al., 2013).

Выявлены различные генетические маркеры, позволяющие не только классифицировать и описывать существующие клоны, но и строить различные модели и сценарии их происхождения и эволюции, как в глобальном масштабе, так и в локальных ситуациях. Азиатский регион России всегда имел более высокий уровень бремени туберкулеза по сравнению с Европейской частью страны (Краснов В. и др., 2012). Кроме того, за Уралом широкомасштабно развивается эпидемия ВИЧ-инфекции, имеющая немалый вклад в заболеваемость ТБ (Туберкулез в Российской Федерации..., 2015). Сибирский и Дальневосточный Федеральные округа долго оставались за пределами изучения молекулярной эпидемиологии ТБ в России. Это создало значительные ограничения знаний о локальных молекулярно-

эпидемиологических характеристиках МБТ, позволяющих составить более точную картину циркулирующих популяций возбудителя и построить достоверные сценарии их возникновения, дальнейшей истории распространения и прогноза в будущее. Указанные аспекты и определили выбор темы настоящего исследования.

Степень разработанности темы исследования

Основные аспекты молекулярной эпидемиологии ТБ изучались многими учеными, начиная с начала 90-ых годов в зарубежных странах (van Soolingen D., Supply P., Kremer K., Small P.M., Niemann S., Gagneux S., Drobniewski F., Allix-Béguec C., Yang Z.H., Iwamoto T., Kato-Maeda M., Wada T., Sola C., Ferdinand S., Filliol I., Rastogi N., Bifani P., Parwati I., Borrell S., Glynn J.R., Alexander D.C., Nguyen D., Pepperell C.S., Lazzarini L.C., Kurepina N.E., Nikolaevski V.V, Balabanova I.M., Zozio T, Allix C., Stavrum R., Millet J., Shen X., Yang C., Liu Y., и др.) и в России (Мокроусов И.В., Нарвская О.В., Черноусова Л.Н., Андреевская С.Н., Смирнова Е.Г., Огарков О.Б., Марьяндышев А.О., Маркелов Ю.М., Тунгусова О.С., Шемякин И.Г., Сурикова О.В., Филипенко М.Л., Дымова М.А., Шитиков А.Ю.)

Основные направления этих исследований можно свести к следующим:

- Молекулярно-генетическая характеристика изолятов МБТ в регионах мира с различным бременем туберкулеза;
- Филогеографическое моделирование: построение сценариев происхождения представителей *Mycobacterium tuberculosis complex*, направления эволюции древних и современных клонов МБТ;
- Лекарственно устойчивый ТБ: молекулярные механизмы развития устойчивости МБТ к ПТП; мутации, ответственные за формирование лекарственно-устойчивых форм МБТ, их распространенность и связь с клональной принадлежностью и клинико-эпидемиологическими проявлениями ТБ;
- Изучение эпидемической передачи МБТ и расследование вспышек ТБ в ретроспективных и проспективных исследованиях по молекулярно-генетическим данным;

- Изучение распространенности генетических маркеров устойчивости/чувствительности к ТБ в различных расовых и этнических группах населения.

Уровень исследованности перечисленных направлений непрерывно растет с появлением новых молекулярно-генетических инструментов. Полученная информация о локальных клонах МБТ, их взаимоотношениях с человеческой популяцией позволяет создавать глобальные базы данных и прогнозировать течение пандемии туберкулезной инфекции. Сформировано единое представление о вероятной дате возникновения современных клонов МБТ в России. При общем мнении о том, что до появления генотипа Beijing в России были распространены другие клоны, близкие к европейским и центрально-азиатским, время и источник заноса штаммов Восточно-Азиатской генетической линии и их укоренения остается дискуссионным. Острой остается проблема установления роли больных ВИЧ-инфекцией как резервуара туберкулезной инфекции, значение этой популяции больных в распространении наиболее трансмиссивных клонов возбудителя в условиях ко-эпидемии ВИЧ и ТБ инфекций. Мало разработаны подходы к экспресс-диагностике высокотрансмиссивных клонов МБТ для эпидемиологического мониторинга и применения в клинической практике.

Цель исследования

Совершенствование подходов эпидемиологического надзора туберкулеза на основе результатов молекулярно-эпидемиологического мониторинга основных генотипов возбудителя в Северной Азии.

Задачи исследования:

1. Оценить проявления эпидемического процесса туберкулеза в его многолетней динамике на изучаемых территориях.
2. Провести анализ молекулярно-генетической гетерогенности популяции *M. tuberculosis* в Северной Азии.

3. Дать молекулярно-генетическую характеристику штаммов *M. tuberculosis* с различной лекарственной устойчивостью.

4. Оценить резервуар инфекции при ВИЧ-ассоциированном туберкулезе.

5. На основе анализа эволюционных (филогенетических) взаимоотношений между генотипами выявить их эпидемически значимые варианты и создать эпидемиологическую модель, объясняющую происхождение и распространение на территории Северной Азии современных субтипов *M. tuberculosis*.

6. Разработать метод выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing *M. tuberculosis*, пригодный для применения в практике эпидемиологического надзора туберкулеза.

Научная новизна исследования

Впервые:

Оценена структура популяции возбудителя туберкулеза на обширной территории Северной Азии (Иркутская область, Республики Бурятия и Саха (Якутия), Забайкальский край).

Выявлены основные генотипы и их субтипы, ответственные за эпидемическое распространение инфекции и формирование множественной лекарственной устойчивости.

Выявлено неравномерное распространение эпидемических субтипов генотипа Beijing на изучаемых территориях.

Установлена их роль в формировании высоких уровней распространенности множественной лекарственной устойчивости. Обнаружены эндемичные варианты генотипов Beijing BL7 (MIT 642) и S (MIT 256), сохранившие эпидемическую значимость.

Предложена эпидемиологическая модель распространения генотипов возбудителя туберкулеза на исследуемых территориях в период освоения Сибири (начиная с XVII в.), в рамках модели объяснено существование “эндемичных эпидемических генотипов” в Бурятии и Саха (Якутия).

Получено подтверждение гипотезы экспансии эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing в России во второй половине XX века. По результатам сравнительного исследования территорий Северной Азии (Иркутская область, Республики Бурятия, Саха (Якутия) и Забайкальский край) и Северо-Восточной Азии (Монголия) определены границы и направление эпидемической экспансии субтипа CC2/W148 генотипа Beijing. Распространение субтипа CC2/W148 в Северной Азии ограничено территорией России.

Получены доказательства активного вытеснения субтипом CC2/W148 генотипа Beijing других эпидемических вариантов возбудителя на изучаемых территориях.

Сформулирован прогноз дальнейшего нарастания доли субтипа CC2/W148 генотипа Beijing в эпидемии МЛУ в России.

Разработан ПЦР-РВ метод выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing, пригодный для применения в практике эпидемиологического надзора ТБ.

Теоретическая и практическая значимость работы:

Составлена схема пространственного распределения популяции возбудителя ТБ на территории Северной Азии (Иркутская область, Республики Бурятия и Саха (Якутия), Забайкальский край).

Разработанные подходы и полученные данные позволяют оптимизировать систему мониторинга в рамках эпидемиологического надзора за туберкулезом. Сформулирована концепция экспансии генотипа Beijing в России, последним событием этого процесса было быстрое распространение субтипа CC2/W148 во второй половине XX века. Определено, что Монголия не является источником заноса эпидемического субтипа CC2/W148 в Россию. Обосновано, что активность миграционных процессов в СССР в середине XX века сыграла ведущую роль в успешности распространения эпидемического субтипа CC2/W148. Характер распространения эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing на исследуемых территориях в последние десятилетия позволяет предсказать увеличение доли случаев первичного МЛУ-ТБ, вызванного штаммами этого

субтипа, на территории Якутии и относительную стабилизацию этого процесса на других территориях Северной Азии.

Разработан ПЦР-РВ метод выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing, пригодный для применения в практике эпидемиологического надзора туберкулеза и в работе фтизиатрической службы. Подана заявка в Евразийскую патентную организацию (заявка № 201700085). Получен Акт внедрения в практику фтизиатрической службы МЗ Республики Бурятия. Высокая чувствительность и специфичность метода позволяет применять его и в практической работе фтизиатрической службы для предсказания неблагоприятных исходов туберкулеза легких.

Представленные в работе данные, касающиеся обобщенной информации о современной структуре популяции возбудителя ТБ в России, роли отдельных субтипов в формировании резервуара инфекции МЛУ-ТБ могут быть полезны при подготовке специалистов (эпидемиологов, фтизиатров и инфекционистов) – на додипломном уровне и в процессе последипломного образования. Результаты данного исследования используются в учебном процессе на кафедре Туберкулеза и кафедре Эпидемиологии и микробиологии Иркутской Государственной Медицинской Академии последипломного образования – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационного исследования послужили труды отечественных и зарубежных специалистов в области общей и молекулярной эпидемиологии туберкулеза, применение общенаучных подходов и специальных методов научного познания (описательные и аналитические эпидемиологические методы, статистические методы, в том числе филогенетическое моделирование).

Положения, выносимые автором на защиту:

1. Клональная структура штаммов МБТ в Северной Азии носит неоднородный характер, отражающий особенности эпидемической экспансии субтипов генотипа Beijing.
2. Проявлением недавней экспансии генотипа Beijing в России является распространение субтипа CC2/W148 в Саха (Якутия), территория которой оказывается одним из последних регионов Северной Азии, где происходит наиболее активное укоренение нового для популяции республики эпидемического генотипа. Границы распространения субтипа CC2/W148 в азиатском регионе России совпадают с территориальными границами России.
3. Сценарий возникновения эндемичного для Саха (Якутии) эпидемического варианта МБТ генотипа S (MIT 256), реконструированный по результатам филогенетического моделирования, предположительно имеет связь с первой волной освоения Сибири в 17-18 вв. Длительная “успешная” история существования генотипа S позволила сформировать активный резервуар инфекции среди всех этнических групп населения Саха (Якутии) и вносит значительный вклад в развитии МЛУ-ТБ в настоящее время.
4. Туберкулез у больных ВИЧ инфекцией развивается в результате заражения тем же спектром вариантов возбудителя, что и в общей популяции. На фоне ВИЧ-инфекции увеличивается риск возникновения ТБ, вызванного микст-генотипами.

Степень достоверности и апробация работы

Требуемая степень достоверности полученных результатов исследования определена достаточным объемом информации, характеризующие заболеваемость туберкулезом и ее следствия; соответствующим выбором и объемом объектов наблюдения, их репрезентативностью выборок из популяции возбудителя (в совокупности составляющей коллекцию более полутора тысяч штаммов, полученных в мониторинговых исследованиях с 2010 по 2015 гг.), использованием современных методов для решения поставленных задач, в том числе подробной статистической обработкой первичного материала. Сформулированные положения,

выводы аргументированы, логически обоснованы последовательным и многосторонним анализом полученных данных.

Результаты настоящего исследования внедрены в учебный процесс Иркутской Государственной Медицинской Академии последипломного образования – филиала ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ: материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении семинарских занятий со студентами, ординаторами и врачами на кафедре эпидемиологии и микробиологии и на кафедре туберкулеза. Результаты исследований включены в учебный курс «Социальные болезни» для бакалавров и магистров кафедры микробиологии ФГБОУ ПО ИГУ. Результаты работы отражены: в учебных пособиях «Генетическая диагностика туберкулеза» (2013) и «Причинность в эпидемиологии» (2015), в пособиях для врачей «Особенности течения туберкулезного процесса в зависимости от генотипов микобактерий туберкулеза в условиях региона Крайнего Севера и принципы лечения» (2016), «Молекулярная эпидемиология» (2017) и «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг популяции туберкулеза в Восточносибирском регионе» (2017).

Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на: II Сибирский конгрессе по экологии с международным участием «Медицина, фармация и экология» – МАНЭБ, Иркутск-Байкал, 2010; научно-практической конференции с международным участием «Этиологические, эпидемиологические и клинические аспекты инфекционных болезней» (к 90-летию кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Иркутского государственного медицинского университета) Иркутск.15-17. 09. 2011; научно-практической конференции с международным участием «Мониторинг туберкулеза и сопутствующие заболевания», Иркутск, 30 июня- 1 июля, 2011; научно-практической конференции «Актуальные проблемы противотуберкулезной помощи и перспективы ее совершенствования» Улан-Удэ, 25-26.августа, 2011; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Окружающая среда и здоровье населения» Иркутск, 5-7 октября 2011; The15th International Congress on Infectious Diseases (ICID), 2012: The historical reconstruction

of the “Beijing” genotype spreading of *Mycobacterium tuberculosis* in Russian Federation and former USSR countries by the methods of molecular epidemiology, Bangkok, Thailand, 12-16 June, 2012; научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты инфекционной патологии», посвященной 100-летию института эпидемиологии и микробиологии ФГУБ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, Иркутск, 27-28 сентября, 2012; научной конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты инфекционной патологии», посвященной 100-летию института эпидемиологии и микробиологии ФГУБ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН, 27-28 сентября, 2012; научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня образования госсанэпидслужбы РФ Иркутск, 4 октября, 2012.; научно-практической конференции, посвященной 80-летию со дня образования туберкулезной службы в Бурятии, Улан-Удэ, 5 октября 2012 года, межрегиональная научно-практическая конференции «Совершенствование организации противотуберкулезных мероприятий в условиях Крайнего Севера и Дальнего Востока» Якутск, 12-14 февраля, 2013; международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» Санкт-Петербург, 5-7 июня, 2013; 45th Union World Conference on Lung Health, Paris, France, 28-31 October, 2014; межрегиональной научно-практической конференции с международным участием: «Эффективное решение проблем туберкулеза: от научной идеи до медицинской практики», Новосибирск, 18-20 июня, 2014; International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance Vienna, Austria, October 31 – November 3, 2014; симпозиуме «Новые приоритеты противотуберкулезной работы в циркумполярных регионах Арктики», Якутск, 2-3 сентября 2015; 46th Union World Conference on Lung Health, Cape Town, South Africa, 2-6 December, 2015; 10th anniversary International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology», Novosibirsk, Russia, 29 August – 2 September, 2016; 47th Union World Conference on Lung Health to be held in The 47th Union World Conference on Lung Health, Liverpool, UK, 26-29 October, 2016; всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017», Москва, 18-20 апреля 2017.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, списка литературы, приложений. Работа изложена на 276 страницах машинописного текста, иллюстрирована 22 рисунками и 50 таблицами. Библиографический указатель содержит 299 источников, из них 101 отечественных и 198 иностранных.

Персональный вклад автора. Основные результаты получены автором лично, ею были сформулированы идея исследования, цели, задачи, выводы. Проведено большинство лабораторных исследований, анализ и интерпретация полученных результатов, моделирование изучаемых процессов самостоятельно. Автором была проведена генотипическая идентификация всей коллекции штаммов МБТ, составлена база данных генетических профилей изолятов исследуемых регионов. Доля участия автора в сборе клинико-эпидемиологической информации – 80%, в обработке данных, обобщении и анализе материала – 100%.

Клинические изоляты МБТ были собраны в Иркутской областной клинической больнице, в Республиканском противотуберкулезном диспансере им. Г.Д. Дугаровой (Улан-Удэ), в туберкулезной больнице системы УФСИН Республики Бурятия, в НПЦ Фтизиатрия (Якутск), в отделе инфекционных болезней (Улан-Батор). Молекулярно-генетические исследования полиморфизма МБТ, филогенетический и статистический анализ данных проведены в лаборатории эпидемически и социально значимых инфекций ФГБНУ «НЦ ПЗСРЧ». Мутации, ответственные за лекарственную устойчивость штаммов туберкулеза, определяли секвенированием по Сэнгеру в Медицинской Школе Университета Виржинии, США. Анализ 40 мутаций, в генах ответственных за устойчивость в одной реакции при использовании микрофлюидных технологий так же выполнялись в Медицинской Школе Университета Виржинии, США.

ПЦР-РВ метод выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing разработан в соавторстве с О.Б. Огарковым и В.В. Синьковым. В рамках

этой работы, вышеуказанным коллективом авторов подана заявка на патент в Евразийскую патентную организацию (заявка № 201700085).

Публикации

Основное содержание работы отражено в 58 научных работах, из них 36 статьях в рецензируемых изданиях, включенных в перечень, рекомендуемых ВАК для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук, трех монографиях, 7 статьях, опубликованных в высокорейтинговых международных журналах с IF 2.0-7.0.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ ТУБЕРКУЛЕЗА (обзор литературы)

1.1 Бремя глобального туберкулеза и современная ситуация в регионах России

Треть населения в мире по общим оценкам инфицированы МБТ и более 9 млн. случаев ТБ диагностируется ежегодно, в результате чего почти 2 миллиона человек умирает каждый год (WHO. Global tuberculosis report, 2015). Эти факты позволяют отнести туберкулез к заболеваниям с высокой частотой смертности взрослого населения. На ТБ приходится более четверти всех предотвратимых смертей среди взрослого населения в развивающихся странах и треть смертей больных ВИЧ/СПИДом. Среди основных факторов, которые оказывают влияние на распространенность туберкулеза во всем мире ведущие позиции имеют развитие эпидемии ВИЧ -инфекции, появление лекарственно-устойчивых форм туберкулеза (особенно с мультирезистентностью - МЛУ – одновременной резистентностью возбудителя к рифампицину и изониазиду) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ – случаи ТБ, которые дополнительно к МЛУ развивают устойчивость любому фторхинолону и, по меньшей мере, одному из второго ряда инъекционных препаратов (канамицин, амикацин или капреомицин), усиление миграционных процессов населения и недостаточная эффективность осуществляемых системой здравоохранения мер борьбы с туберкулезом.

МЛУ-ТБ является возрастающей глобальной проблемой и тяжелым бременем для ряда стран мира. Каждый год регистрируется примерно 350 000 новых случаев МЛУ-ТБ в мире. Среди них в среднем в 20,5% больных туберкулезом, которые ранее получали лечение, и 3,5% лиц, которые никогда не были на лечении туберкулеза ранее (WHO, 2015). Случаи МЛУ-ТБ требуют длительного дорогостоящего лечения токсичными препаратами второго ряда, а показатели

неэффективности лечения и смертности остаются высокими. Штаммы с ШЛУ теперь найдены в каждом регионе мира (WHO, 2015). Во всем мире доля случаев МЛУ/ШЛУ-туберкулезом достигла 9%. В последние годы наблюдается накопление сообщений о тотально устойчивых к лекарственным средствам штаммах, которые не восприимчивы к любому тестируемому препарату (Udwadia ZF., 2012).

Глобальное распределение случаев МЛУ ТБ очень неоднородно. Благодаря достижению высокого уровня (95%) проведения теста на лекарственную чувствительность и дополнительному эпидемиологическому мониторингу сформировалась ясная картина распространенности МЛУ-ТБ: заболеваемость значительно выше в южной части Африки, Центральной Азии, в том числе и во всех странах, ранее входивших в СССР. Страны со слабыми системами здравоохранения и ранее неэффективными программами по борьбе с туберкулезом являются весьма уязвимыми для развития ТБ с МЛУ, потому что сбои в его диагностике и лечении обеспечивают поддержание и распространение резервуара инфекции. Использование экспресс методов диагностики МЛУ должно сопровождаться адекватным лечением и уходом за больными. МЛУ-ТБ не может быть взят под контроль только лишь путем введения нескольких новых антибиотиков. Необходимо создание условий для соблюдения пациентом лечебного режима и надлежащего ведения случаев МЛУ до фазы завершения лечения (Comolet T., 2015).

Как было указано выше, неконтролируемое распространение МЛУ туберкулеза вызывает серьезную озабоченность не только в таких регионах, как Южная Африка, но и на евразийских территориях, которые охватывает страны Балтии, России и других текущих или бывших членов Содружества Независимых Государств. Россия входит в число 27 стран с высоким уровнем МЛУ туберкулеза (Casali N. et al., 2012). На общем фоне стабилизации эпидемиологических показателей последних лет, на некоторых территориях России ситуация остается напряженной. Это территории с наибольшими уровнями пораженности ТБ и параллельным развитием эпидемии ВИЧ-инфекции. Территории неблагоприятного развития эпидемического процесса ТБ обеспечивают не только неравномерный вклад территорий в формирование резервуара инфекции и новых случаев заболевания, но и градиент распространения

инфекции (Hickson R.I., et al, 2012). Уровень активного выявления новых случаев заболевания в регионах с высокими показателями ТБ оказывается наиболее чувствительным параметром движения распространения инфекции и тем самым играет ключевую роль в осуществлении контроля. Поэтому прогнозирование дальнейшего течения эпидемического процесса ТБ в регионах с высоким уровнем распространения становится необходимым условием для планирования адекватных стратегий борьбы и профилактики не только локального характера, но и национального уровня (Acosta C.D. et al., 2014).

Множественная лекарственная устойчивость возбудителя туберкулеза дает неблагоприятное развитие эпидемического процесса этой инфекции. Являясь основной причиной снижения эффективности лечения, она приводит к увеличению резервуара инфекции и дальнейшему ее распространению. Вследствие этого, кроме роста медико-биологических потерь, проявляющихся в повышении уровней инвалидизации и смертности от туберкулеза, значительно множится риск заражения населения штаммами возбудителя, уже устойчивыми к противотуберкулезным препаратам.

Распространенность МЛУ-ТБ в странах с высокими его уровнями все более часто связана с первичными случаями заражения устойчивыми штаммами МБТ, а не с приобретенной резистентностью, связанной с лечением (Kendall E.A. et al., 2015). Изначально ятрогенный характер формирования ЛУ у МБТ на этапе значительного роста МЛУ сменяется и усиливается активной трансмиссией МЛУ штаммов среди населения. Первоначально неадекватная терапия одним эффективным препаратом приводила к уничтожению МБТ, чувствительных к нему, и селекции устойчивых, а через некоторое время подобного лечения у больного развивалась приобретенная ЛУ. Смена препарата, добавление нового антибиотика к неэффективному, способствовала новой селекции устойчивых МБТ уже к двум препаратам и нарастанию ЛУ (Маркелов Ю.М., Марьяндышев А.О., 2013; Филиппова О.П. и др. 2015). Таким образом, малоэффективный подбор препаратов, действовавших до периода экспресс диагностики МЛУ, и отрывы от лечения сформировали обширный

резервуар МЛУ штаммов, из которого происходит активное распространение опасного инфекта.

В России полномасштабно растет распространённость МЛУ-ТБ. За последние пять лет уровень общей лекарственной устойчивости достиг 42,7%, а первичной МЛУ – 24,5% случаев (Отраслевые и экономические показатели... противотуберкулёзной работы в 2009 - 2014 гг.). В некоторых регионах наблюдается более интенсивная динамика. На Северо-востоке России, в Карелии в 2010 году уже отмечался десятикратный рост первичного МЛУ-ТБ (с 2,8 до 30,9% за десятилетний период наблюдения) (Маркелов Ю., 2011), он достиг в 2014 году 46,5% (Отраслевые и экономические показатели противотуберкулёзной работы в 2009 - 2014 г.г.). Лидирующие позиции занимает Республика Тыва, в которой уровень первичной МЛУ превысил 85%.

В регионах проводимого нами исследования также регистрируют нарастание этого показателя в 2010-2014 гг.: Республика Бурятия - с 11,9 до 17,3%; Иркутская область - с 12,8 до 19,5% , Республика Саха (Якутия) – с 33,9 до 40,1% (Отраслевые и экономические показатели противотуберкулёзной работы в 2009 - 2014 г.г.). В целом в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах темпы увеличения числа больных с МЛУ возбудителя гораздо выше, чем в среднем по РФ (Туберкулез в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах. -Информационно-аналитический обзор, 2011), а показатели эффективности лечения больных с МЛУ МБТ на этих территориях близки к опубликованным показателям когорты субъектов РФ, в которых осуществлялись проекты, одобренные ВОЗ (Руководство по программному ведению лекарственно-устойчивого туберкулеза. Всемирная организация здравоохранения: Весь мир, 2007).

Выявляется высокая эпидемическая опасность хронических больных ТБ, имеющих приобретенную МЛУ в 70% случаев. Еще более часто этот вид МЛУ имеют больные с рецидивами - 70-95% (Филинюк О. и др., 2014). При этом формируется более широкий, по сравнению с первичной МЛУ, спектр препаратов, к которым у МБТ развивается резистентность. Наблюдаемое расширение спектра ЛУ часто развивается на фоне полирезистентности к стрептомицину и изониазиду

(Маркелов Ю., Марьяндышев А., 2013). Вслед за этими препаратами амплификация ЛУ захватывает рифампицин, этамбутол и канамицин. Отмечается, что среди хронических больных с МЛУ вдвое чаще встречается лекарственная устойчивость к этамбутолу (25 %) и канамицину (14 %), а не только к рифампицину и изониазиду (Николаева С., 2011, Маркелов Ю., Марьяндышев А., 2013). Это связывают с тем, что эти препараты первого ряда входят в эмпирические режимы, к которым при наличии нераспознанной полирезистентности быстро присоединяется устойчивость к используемым антибиотикам (Маркелов Ю., Марьяндышев А., 2013). Высокий темп формирования вторичной устойчивости микобактерий туберкулеза и лекарственная устойчивость возбудителя к пяти препаратам и более на фоне массивного бактериовыделения наиболее часто ассоциированы с неудачей лечения у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (Филинюк О. и др., 2014; Батыршина Я., Петренко Т., 2014).

Кроме того, в большинстве случаев МЛУ-ТБ выявлялся у социально-дезадаптированных лиц, имевших в анамнезе в половине случаев злоупотребление алкоголем и находившихся в четверти случаев в местах лишения свободы (Маркелов, 2011; Маркелов Ю. и др., 2013; Винокурова М.и др., 2013). Злоупотребление алкоголем у больных данной группы напрямую связано с нарушением санитарно-противоэпидемических мероприятий в отношении своей болезни, а также более частым наличием деструктивных форм поражения легких, сопровождающихся массивным и длительным бактериовыделением (Мякишева Т., 2012; Миронюк О. и др., 2014; Филинюк О. и др., 2014). На этом фоне пациенты с МЛУ-ТБ более часто имеют отрыв от лечения, основной причиной которого указывают более длительный этап стационарного лечения для достижения эффекта абалилирования и закрытия полостей распада (Миронюк О. и др., 2014; Стерликов С., Тестов В., 2014). Возникший порочный круг и приводит к формированию стойкого и расширяющегося резервуара инфекции из хронических больных МЛУ-ТБ с прерывающимися курсами лечения, расширением спектра устойчивости и активным бактериовыделением.

В очагах с больными МЛУ-ТБ отмечается более частая очаговая заболеваемость, в том числе с тремя, четырьмя и более случаями заболевания контактных. Индекс контагиозности таких очагов превышает почти в три раза аналогичный показатель очагов лекарственно-чувствительного ТБ (Аксютин Л., 2011). По данным С. Кавтарашвили и др. (2013), в очагах смерти от туберкулеза спектр ЛУ МБТ у заболевших детей почти в 80% совпадает со спектром у источника инфекции. У более, чем половины умерших от туберкулеза с МЛУ диагностировались (65%) деструктивные формы и массивное бактериовыделение. А дети из этих очагов имели длительный (пять и более лет) контакт с источником инфекции до выявления у него заболевания туберкулезом.

Анализ данных распространенности ТБ с МЛУ в Республике Тыва показывает, что при достижении высоких уровней первичной МЛУ в «бациллярном ядре», резко возрастает доля женщин в структуре общей заболеваемости ТБ и первичного МЛУ-ТБ. При этом в каждом втором случае основным фактором риска выступал контакт с больным ТБ. После установления диагноза ТБ и начала интенсивного курса терапии женщины в трети случаев прерывают лечение, а при лечении более трех месяцев закрытие полостей распада происходит лишь в 46% случаев, а прекращение бактериовыделения – у 84% пациенток (Корецкая Н. и др., 2012). При этом частота деструктивных процессов и бактериовыделения у женщин выше, чем у мужчин (Корецкая Н. и др., 2014). Учитывая, преимущественно молодой возраст больных ТБ женщин, в 30% имеющих детей дошкольного возраста, прерывистые и неэффективные курсы их лечения многократно усиливают напряженность очагов МЛУ-ТБ.

Наиболее целесообразным подходом в сложившихся условиях стала организация отдельных условий стационарного этапа лечения больных с МЛУ-ТБ, в котором используются более строгие меры противоэпидемического и терапевтического режимов. Несмотря на наличие затруднений в терапии этих больных, обусловленных более длительным интенсивным курсом, высокой частотой отягощающих факторов, побочных реакций на ПТП, а также ЛУ к 4-7 ПТП одновременно, при длительном стационарном лечении непосредственный эффект

может быть достигнут у более чем 70% пациентов (Гельберг И. и др., 2011; Николаева С., 2011; Филинчук О. и др., 2014; Филиппова О., Ревякина О., Алексеева Т., 2015).

Соблюдение противоэпидемического режима в специализированных отделениях становится в первый ряд фактором контроля МЛУ-ТБ. Это вызвано тем, что вероятность внутрибольничного инфицирования в специализированном стационарном отделении для больных МЛУ-ТБ составляет около 20 % (Власова Н. и др., 2014). Внутрибольничное инфицирование снижает эффективность лечения впервые выявленных больных и повышает риск рецидивов (Власова Н. и др., 2014). В группе пациентов с первичной МЛУ показатель негативации мокроты при бактериоскопии достоверно выше (77,8 %), чем в группе сравнения (44,4 %) (Николаева С., 2011). Это дает обоснование для повышенного внимания к больным с первичной МЛУ, для того чтобы усилить приверженность к лечению сразу после установления диагноза ТБ, что имеет более эффективные результаты как в клиническом (закрытие полостей распада и инфильтрации и устранение клинических симптомов), так и эпидемиологическом плане (абацилирование).

На территориях России, имеющих высокие показатели распространенности ТБ, наблюдается увеличение числа случаев первичного МЛУ-ТБ за счет роста числа коинфицированных ВИЧ-ТБ. Бактериовыделение у впервые выявленных больных сочетанной инфекцией в отдельных регионах Урала (Пермская область) и Сибири (Кемеровская область) было более частое, чем у больных ТБ без ВИЧ (Пьянзова Т. и др., 2014; Шурыгин А. и др., 2014). Также этими авторами отмечена более высокая частота первичной МЛУ (более 40 % случаев) у больных ВИЧ-ТБ по сравнению с пациентами, инфицированными только ТБ (27-28 %). На таком фоне эти же исследователи выявляли более частые ранние рецидивы, характерные для ВИЧ-ТБ, которые давали еще более высокие уровни МЛУ – 61,5%. Следует добавить, что в других регионах параллельного развития эпидемий МЛУ-ТБ и ВИЧ-инфекции, риск реактивации туберкулеза у туберкулинпозитивных ВИЧ-инфицированных составляет в среднем 7,9% в год (Цыбикова Э., 2013). Поэтому эпидемический потенциал ТБ среди ВИЧ-инфицированных на территориях эпидемии ВИЧ-инфекции не может

быть сброшен со счетов, несмотря на неоднозначную оценку этой группы больных ТБ.

Первые вспышки МЛУ-ТБ были в значительной степени ограничены ВИЧ-инфицированными пациентами с коинфекцией, но, штаммы с обширными профилями резистентности, как недавно было показано, появились и распространились задолго до того, как мировая эпидемия ВИЧ дала подъем в 1980-х годах (Cohen K. et al., 2015; Eldholm V. et al., 2015). Тем не менее, в мировом масштабе в настоящее время имеется мало свидетельств причинно-следственной связи между сочетанной ВИЧ-инфекцией и увеличением возникновения или циркуляции МЛУ-ТБ штаммов, особенно в условиях низкого уровня распространения ТБ (Suchindran S. et al., 2009; Schiroli C. et al., 2015).

Таким образом, могут проявляться региональные тенденции активного вовлечения в эпидемию первичного МЛУ-ТБ ВИЧ-инфицированных при наличии большого резервуара инфекции МБТ. В условиях низкого уровня поражения ТБ среди населения выявлен факт, что экзогенная реинфекция МБТ, развивается с одинаково редкой частотой вне зависимости от ВИЧ-статуса и наличия МЛУ в среднем через 7-10 лет от окончания лечения первого эпизода. Исключительные случаи рецидивов ТБ возникают на более ранних этапах - в течение 4 лет. И все же даже в благоприятной эпидемиологической обстановке реинфекция и рецидив часто сопровождаются формированием МЛУ (Schiroli C. et al., 2015).

Поэтому важнейшими противоэпидемическими мероприятиями по предупреждению дальнейшего распространения ТБ с МЛУ многие специалисты считают быструю идентификацию бациллярных больных с ускоренным определением резистогаммы в сочетании с повышением эффективности лечения: назначение адекватной, соответствующей спектру ЛУ, контролируемой химиотерапии в сочетании с социальной и психологической поддержкой для ее завершения в специализированных стационарах для лечения больных с МЛУ (Маркелов Ю.М., Марьяндышев А.О., 2013; Батыршина Я.Р., Петренко Т.И., 2014; Гельберг И. С. и др., 2015).

На сегодняшний день достижения молекулярной биологии обеспечили целый спектр тестов мониторинга антибиотикорезистентности, сроки проведения которых могут быть сокращены до нескольких часов для основных ПТП (Weyer K, et al., 2013). Эти инструменты для выявления возбудителя туберкулеза и определения его устойчивости к лекарственным препаратам разработаны в течение последнего десятилетия, они в большинстве случаев основаны на амплификации нуклеиновых кислот часто в сочетании со специфическими системами обнаружения (гибридизации со специфическими олигонуклеотидными зондами или их альтернативами) для повышения чувствительности и специфичности анализа. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является наиболее распространенной методологией; альтернативы включают ПЦР в реальном времени, замещения цепи или транскрипции-опосредованной амплификации и лигазной цепной реакции (Drobniewski F. et al., 2013). Хотя молекулярные тесты теоретически позволяют обнаружить одну копию нуклеиновой кислоты в образце, обеспечивая высокую специфичность. На этом фоне их чувствительность может быть значительно скомпрометирована присутствием ингибиторов ПЦР в клинических образцах и потерей нуклеиновых кислот при обработке клинических образцов. В последнее время анализаторы линейных зондов (line-probe assays, (LPAs)) и Xpert® MTB / RIF (Cepheid Inc.) были официально одобрены ВОЗ и в настоящее время регулярно используются во многих лабораториях в странах с высоким и средним уровнем дохода, в том числе и в России (Андреевская С., и др., 2013; Концепции химиотерапии..., 2013; Литвинов В., 2013).

Достигнуты реальные успехи в экспресс диагностике (менее одного до нескольких дней) клинически значимой лекарственной устойчивости по идентификации мутаций в генах, ответственных за сопротивление (Sandgren A. et al., 2009). Кроме вышеуказанных методов амплификации фрагментов ДНК МБТ для выявления отдельных мутаций (чаще всего, к рифампицину и изониазиду), в настоящее время может быть использовано полногеномное секвенирование ДНК, полученной из выращенной культуры МБТ, и ДНК из непосредственно инфицированных образцов мокроты.

Полногеномное секвенирование обеспечивает исчерпывающими данными о мутациях устойчивости, а также маркерах, с которыми может быть осуществлена их передача (Casali N. et al., 2014), но в отличие от уже имеющихся внедренных автоматизированных систем идентификации мутаций к рифампицину и изониазиду, требует получение достаточного количества исследуемой ДНК. В последнее время для целей полногеномного секвенирования была получена возможность использования 3-дневной MGIT культуры, тем самым уменьшая время от получения образца до получения результата тестирования лекарственной устойчивости до одной недели (Köser C.U. et al., 2013). Тем не менее, со средним временем роста положительной культуры на жидкой среде MGIT в течение 14 дней (Chihota V. et al., 2010), большинство результатов секвенирования могут быть доступны более чем через 2 недели, что достаточно долго для принятия решения о начале терапии. Кроме того, в какой степени даже ограниченная культура отражает исходный состав образца остается неизвестным, особенно в тех случаях, когда пациент страдает от микст инфекции, вызванной несколькими штаммами, широко распространенной в развивающихся странах, где она наблюдалась на уровнях до 19% случаев (Warren R. et al., 2004).

Недавно описан метод с использованием биотинилированных линкеров РНК, разработанных специально для захвата туберкулезной ДНК непосредственно из инфицированных образцов мокроты, что позволяет проводить секвенирование генома без получения культуры (Brown A. et al., 2015). Полученные результаты сравнивали с таковыми у обычных молекулярных и культуральных методов и выявили высокий уровень соответствия между фенотипической устойчивостью и прогнозируемой резистентностью, основанной на генотипических данных. Выявление известных мутаций резистентности в течение недели с момента получения образца открывает перспективы для персональной, а не эмпирической терапии туберкулеза с лекарственной устойчивостью, включая использование противомикробных щадящих схем, что приводит к улучшению результатов.

Тем не менее, направление усилий только в эту сторону не дает оптимистических прогнозов. На фоне роста числа случаев МЛУ-ТБ в странах с

высоким бременем туберкулеза достижение глобальных целей сокращения на 50% частоты возникновения новых случаев инфекции и снижения смертности на две трети становится крайне сложным. Моделирование сценариев развития эпидемического процесса ТБ в Китае показывает, что даже при самых оптимальных условиях лечения, ухода за больными и контроля МЛУ-ТБ, приближение к индикаторным показателям проблематично (Lin H. et al., 2015).

1.2. Достижения современной молекулярной эпидемиологии туберкулеза

1.2.1 Молекулярно-биологические методы, используемые в эпидемиологических исследованиях возбудителя туберкулеза

Молекулярная эпидемиология используется в качестве комплементарного инструмента для достижения целей общей эпидемиологии. Универсальные маркеры, несущие характеристики локальных популяций МБТ, могут быть сравнены с глобальной базой данных. Сочетание сполиготипирования, MIRU-VNTR типирования по 24 локусам и SNPs, полученные по данным полногеномного секвенирования (WGS), в настоящее время заменили традиционные оценки ПДРФ анализа (Sola C. et al., 2001; Supply P. et al., 2006; Demay C. et al., 2012; Schurch A.C., vanSoolingen D., 2012). Ограничение составляют лишь недостаточное количество информации о локальных молекулярно-эпидемиологических характеристиках МБТ, позволяющих составить более точную картину циркулирующих популяций возбудителя и построить достоверные сценарии их возникновения и дальнейшей истории распространения.

Для идентификации профилей анализируемых изолятов предложен широкий ресурс доступных веб-сервисов. Они позволяют описывать изоляты МБТ по отдельности или в сравнении с эталонными штаммами из основных линий микобактериального комплекса. В настоящее время MIRU-VNTRplus веб-

инструменты (<http://www.miru-vntrplus.org>) доступны для анализа профилей изолятов в сочетании с другими дополнительными данными типирования, в том числе сполиготипов, регионов различия (RD), SNPs антимикробных генов-мишеней и информации о лекарственной чувствительности (Weniger T. et al., 2010; SITVIT). В дополнение к традиционным методам генотипирования T. Kohl et al., (2014) недавно предоставили еще один инструмент, обеспечивающий расширение подхода к стандартизированной системе WGS по данным мультилокусного типирования (cgMLST). Для точного и быстрого определения сполиготипов доступен ресурс SpolPred (Coll F. et al., 2012). Программное обеспечение KvarQ и PhyResSE позволяют определить субтипы МБТ основных генетических семейств по SNP-штрих кодам, а также потенциальные гены устойчивости к противомикробным препаратам на основе анализа SNP непосредственно из NGS коротких ридов (Steiner A. et al., 2014; Feuerriegel S. et al., 2015). PolyTB и PhyTB предоставляют обширную карту геномных вариаций МБТ (Coll F. et al., 2014; Benavente E. et al., 2015).

Генетические характеристики возбудителя ТБ заняли свое место в ретроспективном и проспективном анализе эпидемиологической ситуации. Использование больших массивов генетических данных становится возможным при адаптации высокоразрешающих методов к условиям рутинных наблюдений. Так MIRU-VNTR-типирование, используемое для идентификации клонов и отслеживания передачи, в ручном использовании весьма громоздко, отнимает много времени, требует достаточной квалификации проведения, тем самым препятствует ее повсеместному осуществлению и распространению. Новый автоматизированный подход с высокой пропускной способностью, использующий систему капиллярного электрофореза облегчает MIRU-VNTR генотипирование и обеспечивает надежные результаты (Gauthier M. et al., 2015). Ограничением использования этого подхода являются более высокие экономические затраты по сравнению с ручным воспроизведением метода, поэтому во многих случаях в странах с ограниченными ресурсами, он пока недоступен.

Хотя WGS обеспечивает адекватное решение многих проблем для молекулярной эпидемиологии, традиционные методы генотипирования по-

прежнему эффективно используются. Несмотря на имеющиеся ограничения использования MIRU-VNTR-типирования для оценки текущей передачи инфекции и дифференциации реинфекции по сравнению с WGS, этот метод приобрел глобальное распространение и позволил уже создать прочный информационный ресурс о популяционных особенностях МБТ как на территориях низкой заболеваемости ТБ, так и в регионах с высоким его бременем. Важным условием использования MIRU-VNTR-типирования является дизайн исследования, включающего как клинико-эпидемиологические данные о пациенте, так и размер кластера, что снижает вероятность смещения выборки и получения ошибочных выводов о недавней трансмиссии (Mears J. et al., 2015). Поэтому на современном этапе развития молекулярной эпидемиологии наиболее перспективным направлением является разработка мультиинструментов - «все в одном» - для реализации как традиционных, так и недавно разработанных методов. В качестве такого веб-инструмента создан Total Genotyping Solution tuberculosis для облегчения анализа филогенетических данных мультиформатов генотипирования (NGS-next-generation DNA sequencing, основных геномных вариаций нуклеотидных последовательностей, сполиготипирования, анализа IS6110 и VNTRs) (Sekizuka T. et al., 2015).

Имея такой арсенал инструментов исследования современные достижения молекулярной эпидемиологии могут быть использованы для ответа на ряд вопросов, связанных с передачей инфекции и расследованием вспышек ТБ как в ретроспективе, так и в мониторинге. Одним из достижений применения молекулярно-эпидемиологических инструментов стала возможность разграничения случаев недавней передачи и реактивации ТБ на популяционном уровне оценки. Для этого используются сравнительные данные, методы генотипирования которых обладают высокой дискриминирующей силой (Gardy J. et al., 2011; Schurch A., vanSoolingen D., 2012; Roetzer A. et al., 2013). Наличие кластеризующихся профилей определяется как случай активной трансмиссии. Кластер определяется как группа изолятов МБТ с идентичными генотипическими профилями (Огарков О.Б., 2014). Кластеризация изолятов должна подтверждаться традиционными

эпидемиологическими данными о возможной связи случаев заболевания, информация о которой не всегда оказывается доступной. Накоплен целый ряд опубликованных работ по этой теме.

Исследование результатов полногеномного секвенирования изолятов вспышки туберкулеза из 41 случая, произошедшей в течение 3-х лет в Британской Колумбии (Канада), выявило клональный ее характер (Gardy J. et al. (2011)). Результаты показали, что генотипирование и отслеживание контактов в одиночку ограничивает возможности оценки истинной динамики вспышки. Только по данным полногеномного секвенирования штаммов МБТ, полученных от больных, участвующих в цепи трансмиссии ТБ, были выявлены два генетически различных источника инфекции, отстоящих по времени от начала вспышки на семь лет. Несмотря на то, что штаммы характеризовали идентичные генотипы MIRU-VNTR, авторы предположили две сопутствующие волны заражения. Комплексный анализ эпидемиологических и филогенетических данных позволил обнаружить несколько событий передачи после формирования очага инфекции, вызванного общим предком. В данном случае предполагалась ведущая роль социальных факторов общины, а не генетических свойств возбудителя. Дальнейшее эпидемиологическое расследование показало, что начало вспышки совпало с зарегистрированным подъемом частоты приема кокаина в группе социального риска, приведшем к цепи распространения инфекции по двум каналам.

Проспективные исследования случаев ТБ за более чем десятилетний период в Гамбурге (Германия) выявили крупный очаг инфекции, давший более 80 случаев заболевания, вызванного штаммом МБТ из рода Гарлем (Roetzer A. et al., 2013). Авторам удалось выявить высокую степень корреляции между данными полногеномного секвенирования с пространственно-временным распределением случаев вспышки, 86 изолятов по 85 SNPs были подразделены на семь кластеров (от двух до 24 изолятов каждый), и еще определены 36 уникальных SNP профилей. Результаты показали, что первые изоляты вспышки, обнаруженной в 1997 году, были ложно сгруппированы по данным ПДРФ анализа и MIRU-VNTR генотипирования (24 локуса). Полногеномное секвенирование дало возможность

выявить отдельный клон «Hamburg» в группе изолятов начала вспышки, который спустя год стал распространяться, независимо от различий в социальной среде ранних случаев. С помощью отслеживания географического распределения случаев и наложения их на филогенетическую модель изолятов, построенную по данным SNPs, определены цепи передачи инфекта с участием 31 пациента. Моделирование данных клона Hamburg также помогло предположительно установить время его появления – за три-четыре года до регистрации первых случаев вспышки органами эпидемиологического надзора.

D. Stucki et al (2015) недавно опубликовали данные о применении так называемого «точечного» секвенирования (targeted WGS) для установления истории группы случаев заболевания ТБ в Берне (Швейцария). На основе геномных последовательностей изолятов из трех исторических вспышек был разработан набор SNP для выявления новых случаев. Скринингу была подвергнута выборка более полутора тысяч изолятов, среди которых выявлено около семидесяти случаев, связанных со вспышкой заболевания ТБ. Основная часть когорты приходилась на первую половину 90-х годов прошлого века, но наблюдались случаи регистрации ТБ до 2011 года. Геномный анализ штаммов позволил предположить происхождение вспышки из одного общего источника с последующим формированием трех кластеров. Этот вид генотипирования обеспечил возможность осуществить экспресс-идентификацию изолятов вспышки в коллекции штаммом больных туберкулезом. Таким образом, целевое использование генетических данных дает подробное понимание динамики передачи, а комбинированный подход может быть применен для отслеживания возбудителя в режиме реального времени и при высоком разрешении.

По результатам генотипирования ДНК МБТ, полученных от больных туберкулезом в странах с низкой распространенностью ТБ, такой подход позволяет выявить вклад иммигрантов в общий показатель заболеваемости (Walker T. et al., 2014). Так, имеющие общий (кластерный) профиль изоляты, полученные от рожденных в изучаемой стране и иммигрантов, свидетельствуют о недавней передаче инфекта. Наличие уникального (не кластеризованного) профиля скорее

дает представление о реактивации латентного ТБ. Таким образом становится возможным оценить динамику передачи между двумя популяциями (коренного населения и иммигрантов) по так называемому вкладу импортируемых штаммов, если таковой имеется, в текущие передачи ТБ коренного населения. Такой подход имеет свои преимущества при анализе случаев с недавними иммигрантами, когда можно определить наиболее вероятный период и место заражения МБТ.

Эпидемиологические расследования с использованием полногеномных данных в большинстве случаев были проведены в развитых странах с низким бременем ТБ (Wlodarska M et al, 2015). Стали появляться результаты подобных исследований и в странах с высокими показателями заболеваемости и распространенности ТБ. Была проведена сравнительная оценка традиционных методов VNTR и типирования и WGS для целей эпидемиологических исследований по изучению недавних передач микобактерий туберкулеза в Китае (Luo T. et al, 2014). Для идентифицированных с помощью VNTR 24 типирования и разделенных на три кластера штаммов было осуществлено WGS 32 (76,2%) из 42 штаммов. Были вычислены попарные геномные расстояния между штаммами в пределах каждого кластера. У половины штаммов были выявлены геномные различия ≥ 100 SNP, что отражало отсутствие цепи передачи. У трети штаммов на основе данных WGS-геномных расстояний ≤ 5 SNP подтвердили эпидемиологические связи передачи инфекционного агента.

Эти результаты указывают на то, что WGS обеспечивает надежное решение для отслеживания передачи микобактерий туберкулеза в местах с высоким бременем ТБ. Высокое разрешение WGS особенно полезно для целей подтверждения или исключения возможности прямых событий передачи, определенных традиционными методами типирования (Luo T. et al, 2014).

Перспективное исследование цепи трансмиссии с использованием инструментов полногеномного секвенирования в регионах с высокой распространенностью ТБ является сложной задачей в связи с наличием множественных сетей передачи и возможных источников инфекции. Тем не менее, необходимость понимания путей распространения туберкулеза в регионах с

высокой распространенностью ТБ имеет наибольшее значение для сохранения здоровья населения.

В Малави (Восточная Африка) анализ данных около 1700 больных ТБ с использованием WGS показал, что на протяжении 2005-2010 гг. при регистрации новых случаев ТБ 38% пациентов имели признаки недавней инфекции (Guerra-Assunção J. et al., 2015). При этом самый высокий уровень недавней трансмиссии (65%) принадлежал МБТ определенной генетической линии (Beijing), которая в исследуемой популяции возбудителя составляла всего 4,4 %, но более часто поражала молодых пациентов. В старших возрастных группах больных менее часто прослеживалась связь со следами недавней трансмиссии, особенно у больных, живущих за пределами региона изучения. На этом фоне никакой прямой ассоциации с полом, ВИЧ-статусом, бактериовыделением, устойчивостью к изониазиду и установленными цепочками передачи не было выявлено. В ходе исследования не отмечено никаких значимых различий по характеристикам у больных с первичным ТБ и несколькими эпизодами лечения. Однако случаи подтвержденной истории передачи с положительным мазком и хроническим течением имели немного больше полиморфизмов, чем те, что бы ли с отрицательным мазком в последующих эпизодах лечения; у ВИЧ-отрицательных пациентов с повторами лечения количество полиморфизмов были больше, чем у ВИЧ-положительных с хроническим течением ТБ.

В результате подобных популяционных исследований удалось рассчитать частоту мутаций МБТ при передаче от человека к человеку с учетом эпидемиологических данных об источнике инфекции и временного интервала между датами развития заболевания ТБ. Она составила в среднем 0,45 SNPs в год с вариацией значения в зависимости от принадлежности возбудителя к определенной генетической линии. Самая высокая частота обнаружена у МБТ Beijing генотипа – 0,11 SNPs в год, на фоне более распространенных в регионе Малави штаммов Индо-Океанического (0,58) и Евро-Американского (0,40) семейств (Guerra-Assunção J. et al., 2015).

Таким образом, геномные данные, совместимые с эпидемиологической информацией о цепях передачи возбудителя, способствуют более эффективному его отслеживанию, чем другие известные методы рутинного типирования. Еще в 2009 году Niemann S. et al. показал, что WGS данные выявили геномную гетерогенность между лекарственно-чувствительными и лекарственно-устойчивыми изолятами с идентичными по IS6110 профилю и 23 из 24 MIRU-VNTR локусов характеристиками. Такая степень неоднородности не обнаруживается с использованием обычных общепринятых методов генотипирования, и некоторые аспекты динамики передачи МБТ могут быть пропущены или неверно истолкованы. Когда общее генетическое разнообразие циркулирующих клонов ограничено, то стандартное генотипирование не может отличить рецидив и экзогенное повторное заражение. Bryant J.M. et al (2013) показал, что WGS облегчает дифференциацию рецидивов и повторного случая заражения при наличии небольших (от 0 до 6 SNPs) и больших (1306 до 1419 SNPs) дистанций. Анализ числа гетерозиготных позиций по данным полногеномного секвенирования, проведенный Guerra-Assunção J. et al. (2015), выявил несколько иные границы различия случаев реинфекции или смешанной инфекции. Рецидив определялся при наличии разницы в не более 10 SNPs данных в образцах ДНК МБТ одного больного, а суперинфекция – соответственно в случае различий более чем 100 SNPs. При анализе 66 пар ДНК возбудителя случаи рецидива туберкулеза характеризовались практически одинаковыми (в ряде случаев отличия в одной полосе) ПДРФ паттернами, а при реинфекции профили были различными. Частота реинфекции и смешанной культуры МБТ напрямую зависела от ВИЧ-статуса больных ТБ. Повторные случаи ТБ у ВИЧ-негативных пациентов, встречающиеся в количестве 1-5 на 100 случаев ТБ, наиболее часто возникающие в первые два года после окончания лечения первого эпизода, были в подавляющем большинстве рецидивами, то есть реактивацией существующего очага инфекции. У ВИЧ-инфицированных больных ТБ каждый пятый случай последующего эпизода ТБ был вызван повторным случаем заражения (Guerra-Assunção J. et al., 2015). Интересным фактом является отсутствие подтвержденного микст ТБ в изученном регионе (Малави), особенно в группе

сочетанной ВИЧ-ТБ инфекции. В других регионах Юго-Восточной Африки частота обнаружения микст-инфицирования у ВИЧ-ТБ пациентов достигает 10% при использовании ПДРФ анализа (van Rie A. et al., 2005).

Использование традиционных методов типирования, наряду с WGS, позволяет обнаружить роль генотипической принадлежности штамма МБТ при реинфекции. В исследовании реинфицирования штаммы, вызвавшие повторные случаи ТБ, в большинстве случаев принадлежали доминирующему ЕАI (Восточно-Африканско-Индийскому) генетическому семейству (Guerra-Assunção J., et al. (2015) . Однако при этом была обнаружена более высокая частота Восточно-Азиатской генетической линии, имеющей лишь 4-7% в общей популяции региона (Crampin A. et al., 2010). Ограничениями применения полногеномного секвенирования являются требования к ДНК, достигаемые предварительным бактериальным обогащением путем культивирования, и поэтому в большинстве исследований вспышек носят ретроспективный характер (Roetzer A. et al., 2013).

1.2.2 Сценарии происхождения и направление эволюции МБТ

Основу для значительных успехов распространения МБТ, которые по существу носят преимущественно клональный характер существования (Supply P. et al., 2003), обеспечивает генетическое разнообразие. Выявлены различные генетические маркеры, позволяющие не только классифицировать и описывать существующие клоны, но и строить различные модели и сценарии их происхождения и эволюции, как в глобальном масштабе, так и в локальных ситуациях.

Первоначально изучение генетики возбудителя ТБ дало возможность обосновать сделанные ранее выводы о географическом распределении микобактерий туберкулеза на основе данных полиморфизма больших последовательностей (LSPs). Были определены родословные группы: Восточно-африканско-индийская, Западно-африканская 1 и Западно-африканская 2, Индо-

океаническая, Евро-Американская и Восточно-Азиатская (Hirsh A. et al, 2004; Gagneux S. et al, 2006). Классификация профилей сполиготипов – классификационных маркеров - согласовалась с вышеуказанным делением по LSPs группам (Gagneux S., Small P.M., 2007). Глобальная база сполиготипов на тот момент включала все известные генетические семейства: Восточно-африканско-индийское (EAI), Beijing, Центральное-Азиатское (CAS), и Западно-африканское, сопоставимое с группой Западной Африки 1 и Западной Африки 2 по LSPs. Ряд сполигопрофилей, таких как Латино-Американско-Средиземноморские (ЛИАМ), Харлем (H), T, S и X, вместе, приходились на LSPs евро-американской линии (Reed M. et al., 2009). Эти и другие инструменты генотипирования оказались полезными для оценки географического распределения штаммов МБТ в соответствии с современными и древними миграциями человека (Gagneux S., Small P., 2007).

В дальнейшем с появлением более тонких инструментов изучения и накоплением информации в глобальном масштабе такого рода характеристиками стали единичные нуклеотидные полиморфизмы - SNPs, время накопления которых рассчитано по частоте мутаций. В качестве маркеров использовались также MIRU - VNTRs – локусы, содержащие переменные числа tandemных повторов генетических элементов (MIRUs), названных микобактериальными перемежающимися повторяющимися единицами (MIRU_S) (Wirth T. et al., 2008; Merker K., et al., 2015), которые ведут себя как выборочные нейтральные филогенетические маркеры. Для установления времени дивергенции и снижения степени погрешности моделирования важным условием является использование большого (24 локуса) количества локусов.

Построение молекулярных часов опирается на экспериментальные данные по изменчивости и эволюции маркеров в клинических изолятах, полученных от инфицированных пациентов и моделей животных (Bryant J. et al, 2013; Roetzer A. et al., 2013). Скорость мутации в одном локусе MIRU рассчитана в среднем как $1,4 \cdot 10^{-3}$ (Wirth T. et al., 2008). Это соизмеримо с мутационными частотами SNPs, рассчитанными для долгосрочных событий МТВС, включающих как активную форму ТБ, так и его латентную фазу (Ford C. et al., 2011). В результате такого

моделирования было предположено, что наиболее общий предок МТВС появился около 40000 лет назад от своего прародителя в Восточной Африке, в регионе, откуда началось распространение современной человеческой популяции примерно в тот же период (Wirth T. et al., 2008).

Если в месте формирования предка МТВС современные исследователи сходятся на Африке, то время его возникновения и дивергенции в настоящее время обсуждается в широких границах (Wirth T. et al., 2008; Comas I. et al., 2013; Bos K. et al., 2014). Приведенная выше частота мутации в одном локусе $MIRU_S$ оказалась выше, чем в модели, построенной на SNPs, - МТВС70, со скоростью изменений— $2,58 \times 10^{-9}$. Эта модель предполагает дату возникновения предка микобактериального комплекса 70000 лет назад (Comas I. et al., 2013). В модели МТВС-Holocene, использованная частота мутации МТВС— $4,6 \times 10^{-8} \pm 1 \times 10^{-8}$ в год, приближает моделируемую дату возникновения к 5300 годам (Bos K. et al., 2014).

Каждая группа авторов обнаруживала ряд связей модельных точек с масштабными изменениями человечества. Считается, что возбудитель туберкулеза оказал значительное селективное давление на эволюцию человека, помогая изменить характер иммунных реакций. Наблюдаются различия этих реакций в популяциях человека. Накоплены сообщения о связи между генетическими вариантами человека и конкретными генетическими линиями МБТ (Caws M. et al., 2008; vanCrevel R. et al., 2009).

На основе данных о географической близости происхождения предков возбудителя и хозяина были классифицированы симпатрические хозяин-патоген отношения (когда хозяин и возбудитель имеют общее географическое происхождение предков), и аллопатрические (когда хозяин и возбудитель смешиваются из географически неперекрывающихся регионов (Pasipanodya J.G. et al. 2013). Более стабильные связи между популяциями МБТ и человека формируются при симпатрических отношениях (Gagneux S., 2012). Эти данные помогают при моделировании времени дивергенции генетических линий возбудителя туберкулеза.

Так, K. Bos et al. (2014) приводят археологические доказательства возникновения туберкулеза в Южной Америке в доколумбовую эпоху. Эти данные вступают в противоречие устоявшимся ранее представлениям о том, что современные штаммы микобактерий туберкулеза из Северной и Южной Америки тесно связаны с европейскими, давая основание предполагать трансмиссию возбудителя туберкулеза с миграциями европейцев в Новый Свет (Wirth T. et al., 2008; Reed M. et al., 2009). Сравнительный анализ геномики современных изолятов и трех геномов 1000-летних микобактерий из перуанских человеческих скелетов, представляет доказательства доколумбового туберкулеза. Древние штаммы отличались от известных человеческих адаптированных форм МТВС и наиболее тесно филогенетически связаны с теми, что адаптированы к тюленям и морским львам. В совокупности такой анализ позволил предложить самую последнюю временную точку возникновения общего предка для МТВС менее 6000 лет назад, который поддерживает голоценовое распространение заболевания туберкулезом. Эти результаты свидетельствуют о возможности вовлечения морских млекопитающих в распространение болезни для человека через океан (Bos K. et al., 2014).

Прослеживая смоделированный путь развития по долгосрочным молекулярным часам, спустя 10-20 тысяч лет от момента возникновения МТВС произошло формирование двух основных родословных, одна из которых дала начало распространения МТВС от человека к животным (Wirth T. et al., 2008). По данным I. Comas et al. (2013) такие события могли произойти около 70000 тысяч лет назад (Рисунок 1.1). К наиболее старым генетически обособленным семействам, поражающим человека, относят ЕА1, а также Восточно-африканско-индийскую, Западно-африканскую 1 и Западно-африканскую 2, Индо-океаническую линии. Время зарождения их датируют в 13700 и 7000 лет, соответственно по данным T. Wirth et al. (2008), или еще более древним 64-73 тысячи лет по I. Comas et al. (2013).

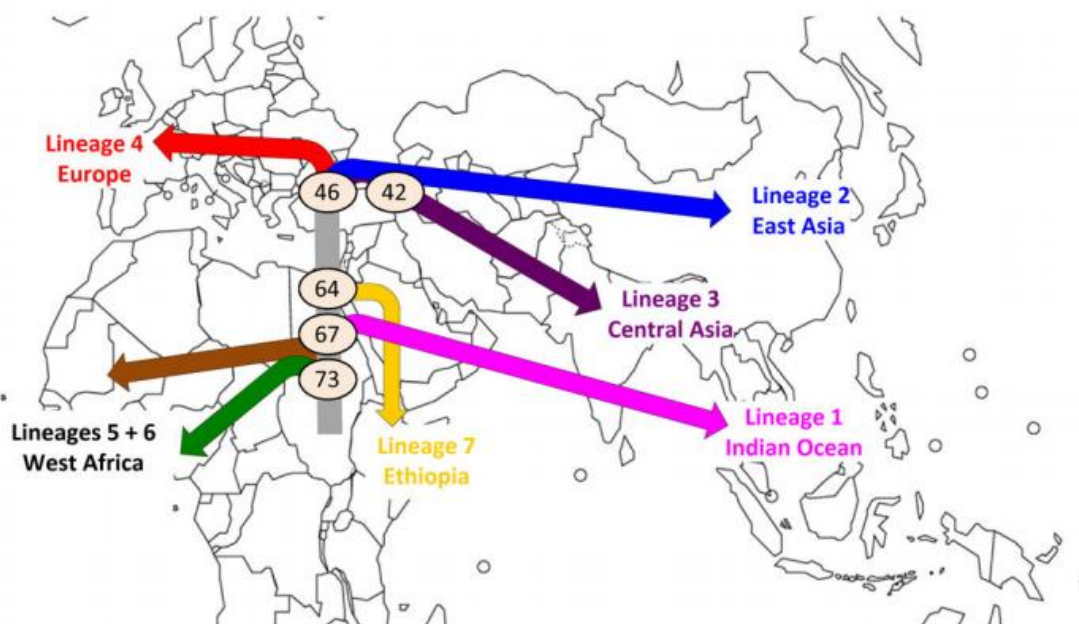


Рисунок 1.1 Моделирование времени первичной экспансии основных генетических семейств микобактериального комплекса в мире (цифры указывают тысячи лет) Comas I. et al. , 2013. Lineage 1 Indian Ocean – Семейство 1 Индо-океаническая линия; Lineage 2 East Asia – Семейство 2 Восточно-азиатская линия; Lineage3 Central Asia –Центрально-азиатская линия; Lineage4 Europe –Европейская линия; Lineage 5+6 West Africa – Западно-африканская линия; Lineage 7 Ethopia – Эфиопская линия

Эти модельные шкалы древних событий становятся отправными точками и для уточнения происхождения современных клонов МБТ, распространившихся по всему миру или приобретших локальное положение. Филогенетические построения также позволяют уточнять классификацию популяции МТВС в соответствии их датировкой и географическим происхождением. Сценарий I. Comas et al. (2013) дал возможность переформировать семь основных филогенетических родословных, обозначенных происхождением от 1 до 7 (см. Рисунок 1.1). Эти семь клональных групп хорошо сопоставимы с ранее предложенными классификациями (Hirsh A. et

al, 2004; Gagneux S., DeRiemer K. et al, 2006). Также они показывают сильные биогеографические ассоциации, которые могли произойти в результате совместной диверсификации различных человеческих популяций.

Наиболее «молодыми» генетическими линиями являются Восточно-Азиатская, Центрально-Азиатская и Евро-Американская линии. Они отнесены соответственно к 2,3 и 4 родословным по I. Comas et al. (2013). Генетическая линия 2, которая доминирует в Восточной Азии, является одним из самых удачных вариантов МТВС; более четверти глобальной эпидемии туберкулеза вызвана штаммами этой линии (Hanekom M. et al. 2011; Mokrousov I., 2015). Она содержит штаммы, которые в основном принадлежат к так называемому семейству Beijing (Hershberg R. et al., 2008). Это семейство штаммов привлекает большое внимание из-за глобального проявления его отдельных субтипов в последние десятилетия (Parwati I. et al., 2010; Hanekom M. et al. 2011; Mokrousov I., 2015), его тенденции вызывать вспышки болезни (Mokrousov I. et al., 2012; Hanekom M. et al. 2013; Mokrousov I., 2015), и его ассоциации с устойчивостью к антибиотикам (Mokrousov I. et al., 2006; Lasunskaja E. et al., 2010; Parwati I. et al., 2010).

Успешность распространения отдельных субтипов связывают с важным фактором - особенностями взаимодействия популяций патогена и хозяина в конкретных условиях его проживания, а также миграционными потоками. Таким образом, патогенные свойства генотипа отличаются среди эндемичных и спорадических штаммов. Например, в Южной Америке и в некоторых ближайших соседей бывшего Советского Союза / России, таких как Болгария и Румыния, были обнаружены на сегодняшний день некоренные изоляты генотипа Beijing. В Бразилии такие изоляты носят чрезвычайно спорадический характер, а высокая частота генотипа Beijing в Перу может быть связана только с одним фактором - значительным человеческим притоком из Восточной Азии (Mokrousov I., 2015). Глобальное распространение некоторых клонов генотипа Beijing, наиболее вероятно, определяется генетикой человеческой популяции и притоком пришлого населения, но не простым миграционным обменом. Высокая частота в странах Балтии генотипа Beijing связывается с большим наплывом русских мигрантов после

Второй мировой войны. В отличие от этого, указанный генотип не найден в местных популяциях Восточной Европы, несмотря на тесные связи с Россией/СССР в новейшей истории и в историческом прошлом.

Таким образом, такого рода резистентность человека развивается в локальной популяции через сосуществование с исторически сложившимися местными клонами, действуя против новых клонов (Mokrousov I. 2013). При этом следует отметить, что взаимодействие между адаптированными к местным условиям штаммами МБТ туберкулеза и географически соответствующей популяцией хозяина в целом зависит от функционального иммунного ответа, но эти симпатрические взаимодействия могут быть сорваны ВИЧ-инфекцией (Fenner L. et al. 2013).

Взаимоотношения человека-хозяина и МБТ обеспечиваются сложными механизмами, находящимися под контролем генетических и средовых факторов. Широкая распространенность штаммов Beijing предположительно связана, по крайней мере частично, с его способностью изменять врожденные иммунные реакции и секрецию цитокинов и хемокинов фагоцитов человека, как показано на модели макрофагов (Wang C. et al., 2010). Среди населения Юго-восточной Азии были получены корреляции между распространенностью инфекционного процесса и поражением генотипом Beijing. Во Вьетнаме TLR2 T597C вариант больных был связан с диссеминацией в другие органы и генерализацией ТБ, вызванного штаммами Beijing (Thuong N.T. et al., 2007; Caws M. et al., 2008) Исследование, проведенное в Индонезии, выявило специфическую связь между двумя полиморфизмами SLC11A1 с чувствительностью к туберкулезу, вызванному штаммами Beijing (van Crevel R. et al., 2009). Исследование человеческой DC-SIGN - 336 аллелем в Российской славянской популяции (Огарков О.Б. и др., 2010) не показывают какую-либо ассоциацию в условиях общего сравнения. Однако, стратификация по генотипам штаммов МБТ позволила обнаружить связь генотипа Beijing и больных с -336G аллелью DC-SIGN гена, который более часто встречался у умерших мужчин.

Современный успех отдельных клонов генотипа Beijing делает необходимым изучение его исторического прошлого с целью осмысления настоящего состояния и

наиболее достоверного прогнозирования будущего пандемии ТБ, вызванной им. Именно поэтому так стремительно растут базы данных полногеномной идентификации штаммов различных его субтипов.

МТВС-70 (Comas I. et al., 2013) датируют возникновение Восточно-Азиатской генетической линии 32-42 тысячи лет назад, которое совпадает с археологическими свидетельствами анатомически современных людей в Восточной Азии. Первую экспансию предполагают 6-11 тысяч лет назад, сопоставляя с ее с появлением сельского хозяйства в Китае 8000 лет назад. Последующее распространение штаммов Beijing (3000-5000 лет назад), совпадает по времени с распространением сельского хозяйства в соседних регионах (Рисунок 1.2)

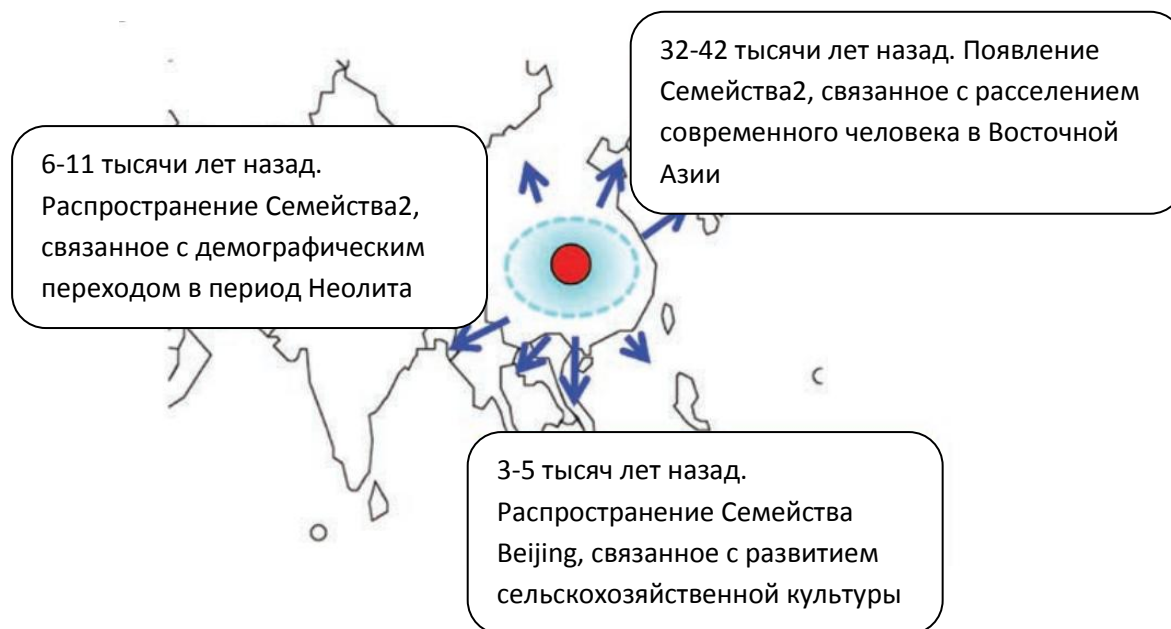


Рисунок 1.2 Временная модель зарождения и волн распространения генотипа Beijing по (Comas I. et al. , 2013)

Расчет времени возникновения общего предка - TMRCA (time to most recent common ancestor) M. Merker et al., (2015) показал, что генотип Beijing мог быть образован гораздо позже - 6600 лет назад, а его самым «молодым» клоном всего - 200-250 лет. Это согласуется с убедительной гипотезой демографических изменений отдельных генотипов. С помощью байесовской статистики данных было показано активное увеличение скорости экспансии генетической линии Beijing по сравнению

с EAI (Wirth T. et al., 2008). Согласно этой временной модели примерно 180 лет назад, на которое приходится датировка широкой экспансии клонов МТВС, совпадающая с началом человеческого демографического взрыва и промышленной революции, произошло 500-кратное увеличение размера этого клона (Wirth T et al., 2008).

Другими исследователями (Luo T. et al., 2015) были применены молекулярные часы, используемые в МТВС-70 (Comas I. et al., 2013), и построена модель возникновения генотипа Beijing, имеющая некоторые расхождения с описанной выше. Т. Luo с соавторами охарактеризовали глобальное разнообразие семейства Beijing на основе результатов полногеномного секвенирования 358 геномов и показали высокое генетическое разнообразие эндемичных в Восточной Азии штаммов семейства Beijing по сравнению с недавно распространившимися его представителями во всем мире. Эти новые штаммы в основном принадлежат к более однородному подтипу, известному как «современный» Beijing.

Филогеографические построения этих авторов показывают, что семейство Beijing, скорее всего, возникло около 30000 лет назад в Юго- Восточной Азии, и сопровождалось расселением современного человечества в этом регионе. Объединив геномные данные человека и около двух тысяч штаммов возбудителя туберкулеза со всего Китая, они обнаружили, что "современные" субтипы Beijing получили первое широкое распространение в северном Китае во время эпохи неолита, а впоследствии волны экспансии захватили и другие регионы с миграциями местного населения Хан. Эти результаты распространения семейства Beijing коррелируют во времени с этапами расселения современных людей в Восточной Азии. Приведенные выше данные согласуются с более ранними исследованиями китайских изолятов Wan K. et al. (2011), которые обнаружили присутствие на юге Китая штаммов, представляющих ранний древний Beijing в регионе Гуанси (Wan K. et al., 2011), но их филогенетические данные свидетельствуют о более позднем времени возникновения, по сравнению с Северо-восточными китайскими штаммами (Mokrousov I., 2015). В конечном счете, нашла подтверждение гипотеза

происхождения и первичного распространения генотипа Beijing в результате последовательного возникновения на юге и севере Китая (Luo T. et al., 2015).

Доминирование "современного" подтипа Beijing в Восточной Азии и его недавнее глобальное появление некоторые авторы связывают с проявлениями гипервирулентности (Kato- Kato-Maeda M, et al. 2012; Luo T. et al., 2015). Последняя, по их предположениям, могла быть отражением адаптации к увеличению плотности населения, связанному с сельскохозяйственной революцией в северном Китае. Подобного рода глобальные филогенетические исследования требуют насыщения информацией о локальных биогеографических историях и распределениях различных клонов МБТ, потому что недавние адаптации к местной популяции хозяина играют важную роль. Генетическое разнообразие влияет на активность передачи и динамику резистентности МБТ (DeRiemer K. et al., 2006).

Согласно данным глобального генотипирования, большинство штаммов Beijing из распространенных в других, кроме Китая, географических местах показали высокую степень генетического сходства (Bifani P. et al., 2002). Надежным маркером штаммов Beijing считают сочетание специфического спוליгопрофиля с отсутствием 1-34 спейсеров, наличие маркерных делеций RD105/207 и профиля MIRU-VNTR. Такое подробное определение необходимо вследствие открытия штаммов псевдо-Beijing с девятью типичными спוליгопрофилями Beijing (Fenner L. et al., 2011). Следует также отметить, что на основе других эволюционных маркеров (*mutT2* и *mutT4* генов, NTF регион) выделяют древние и современные клоны. Древние Beijing штаммы с интактным NTF регионом и дикий тип аллеля *mutT2*-58 могут быть дополнительно дифференцированы по наличию/отсутствию области RD181 и SNP в *mutT4*-48. Большие делеционные маркеры позволяют отличить прото-Beijing штаммы, занимающие промежуточное место в историческом развитии по делеции в RD105 при наличии интактного RD207 (Yin Q. et al., 2016). Самая высокая распространенность (до 90%) и разнообразие (HGI 0.80-0.95) генотипа Beijing сохраняется в Северном Китае.

Было высказано предположение, что движущей силой экспансии отдельных штаммов этого семейства стала вакцинация БЦЖ, которая была широко

распространенной в странах Восточной Азии (van Soolingen D. et al., 1995). Однако лабораторные эксперименты (Gey van Pittius N. et al., 2011), а также многие эпидемиологические исследования не смогли найти какую-либо четкую связь между вакцинацией БЦЖ и штаммами Beijing (Shi C. et al., 2007; Kremer K. et al., 2009; van Crevel R. et al., 2001).

Кроме того, мировое распространение семейства Beijing может быть связано, как уже указывалось выше, с его ассоциацией с лекарственной устойчивостью (Glynn J.R. et al., 2002; Anonymous, 2006). Связь между лекарственной устойчивостью и штаммами Beijing в первую очередь наблюдается в регионах, где это семейство появилось недавно (например, Куба, Южная Африка, страны бывшего Советского Союза, Северной Европы) (Toungousova O. et al., 2006), но не в Восточной Азии, где семейство имеет эндемическое распространение (Couvin D. et al., 2015). С генотипом Beijing связывают треть всех случаев ТБ в мире, которые получили развитие у пациентов в возрасте до 20 лет (Couvin D., 2015).

Географическая специфика играет важную роль в оценке распространения субтипов генотипа Beijing и проявления его успешных свойств активной трансмиссии и лекарственной устойчивости. Отмечают также градиенты некоторых типов этого генотипа. Так, например, субтип, определяемый по MIRU-VNTR-12 в SITVIT как MIT 17, преобладает по всей Евразии, а субтип MIT 16 более распространен в России и странах бывшего Советского Союза и Китае (Yuan X. et al., 2013), субтип MIT 99 – в прибрежных районах Восточной Азии, Южной Африке и Австралии (Mokrousov I., 2015).

На основе данных многомерного шкаливания основных субтипов генотипа Beijing (вариант анализа главных компонент) I. Mokrousov (2015) было показано, что география является основным фактором генетического разнообразия МБТ. Тем не менее, это утверждение является более сложным и чтобы объяснить наблюдаемую картину должны быть приняты во внимание временные и пространственные критерии. Похоже, что оба критерия - большое расстояние по воде (но не по суше), а также продолжительное время были обязаны производить наиболее выраженный эффект (Mokrousov I., 2015). На примере случая Южной

Африки, согласно таким данным моделирования, генотип Beijing мог быть завезен в 17-м веке через работоторговлю голландской Ост-Индской компанией. Один из факторов (время) отсутствует в случае Перу: импорт штаммов Beijing начался только с 19-го века. Тем не менее, популяция МБТ из Перу может также иметь Евразийское происхождение. Что касается последнего, то интересно отметить, как российская и вьетнамская популяции МБТ, согласно моделированию того же автора, накладываются друг на друга и с различными частями большого китайского кластера. В случае с Россией наблюдается историческая комбинация географической близости с Китаем и фактора недавнего распространения, подпитываемого массовым смешиванием населения в 20-м веке (Синьков В. И др., 2010).

Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что, несмотря на разноречивые модели построения происхождения основных генотипов МБТ, в сценарии о распространения современных клонов, имеющих наибольший успех, большую роль сыграли факторы отбора, обеспечивающие повышенную активность в формировании лекарственной устойчивости и трансмиссивности.

1.3 Лекарственная устойчивость и трансмиссивность успешных современных клонов МБТ

В последнее время появились штаммы МБТ, которые устойчивы к большинству или всем эффективным антибиотикам (Velayati A. et al., 2009; Gandhi N. et al., 2010; Dheda K. et al., 2014). Учитывая низкую частоту мутаций *M. tuberculosis* и его медленную скорость репликации, неясно, каким образом бактерия приобретает устойчивость ко многим антибиотикам, особенно в условиях одновременного применения четырех и более препаратов лечения (Ford C.V. et al., 2011).

Филогенетическое моделирование возникновения лекарственной устойчивости среди клинических изолятов микобактерий туберкулеза Южной Африки показало, что выявленный региональный предок современных МЛУ вариантов штаммов на

заре эпохи антибиотиков получил мутации к первой линии противотуберкулезных препаратов (Cohen K.A. et al., 2015). После накопления ступенчатых компенсаторных мутаций резистентности в течение 40 лет и до взрыва ВИЧ в этом регионе, привели к МЛУ и ШЛУ. Эти результаты показывают, что лекарственно-устойчивые штаммы, циркулирующие сегодня, отражают уязвимость нынешних усилий по борьбе с туберкулезом. В лекарственно-устойчивом туберкулезе устойчивость к изониазиду была в подавляющем большинстве начальной мутацией в пути приобретения МЛУ. Другие исследования представляют доказательства, что МЛУ- и ШЛУ-штаммы возбудителя туберкулеза эволюционировали независимо друг от друга движимые позитивной селекцией эры антибиотиков (Liu CH. et al., 2012). И в тоже время полногеномное секвенирование изолятов МБТ показывает важность приобретения новых мутаций на фоне уже имеющихся в возникновении множественной лекарственной устойчивости (Casali N. et al., 2012; Sun G. et al., 2012).

На жизнеспособность циркулирующих штаммов значительное влияние оказывают антибиотики, изменения в окружающей среде, генотип и стресс, вызванный конкуренцией с другими штаммами (Groll A-V. et al., 2010). Действие отбора сопровождается необходимостью не только выживания, но и сохранения способности передавать болезнь (Normark B-H, Normark S., 2002). В качестве примера активной приспособляемости к меняющимся условиям среды наиболее часто приводится эффективность штаммов генотипа Beijing, которые приобретают устойчивость к лекарствам, уклоняются от действия поствакцинального иммунитета БЦЖ, что вызвало рост случаев МЛУ-ТБ (Hanekom M., et al., 2007). Указанные выше эффекты связывают с так называемым «фитнесом» - репродуктивным успехом и равным среднему вкладу в генофонд следующего поколения (Википедия. [https://en.wikipedia.org/wiki/Fitness_\(biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Fitness_(biology))). Было показано более длительное время генерации и скорость роста лекарственно-чувствительных изолятов генетической линии CAS по сравнению с лекарственно-устойчивыми штаммами, принадлежащих к Beijing и MANU клонам (Bhatter P. et al., 2012). На этом фоне медленно растущие МБТ CAS не успевают выработать компенсаторную мутацию, обеспечивающая

устойчивость к рифампицину (при частоте мутаций в *rpoB* гене, равной 10^{-10}), что дает высокую цену адаптации. В противоположность этому, выявленный повышенный фитнес лекарственной устойчивых штаммов генотипа Beijing, может быть связан с конкретными компенсаторными механизмами, связанными со скоростью роста и размножению в присутствии других клонов (Hanekom M, et al., 2007).

Однако отмечается, что в районах эндемичного распространения клонов *non-Beijing* местные штаммы успешно адаптированы, и это дает им преимущество в ограничении расширения вклада штаммов генотипа Beijing в эпидемических процесс ТБ (Bhatter P. et al., 2012; Hang N.T. et al., 2015). Так, устойчивые штаммы семейства MANU показывают высокий уровень фитнеса в присутствии CAS и лекарственно чувствительного Beijing, но не растут в присутствии чувствительных MANU клонов. Это может быть объяснением доминирования лекарственно чувствительного клона MANU на Индостане. Взаимное ингибирование MANU лекарственно устойчивого клона чувствительными штаммами может свидетельствовать о межклеточных коммуникациях, способных ограничивать плотность популяции и модулировать их поведение в ответ на окружающую среду (Bhatter P. et al., 2012).

Наблюдения других исследователей показывают, что даже в отсутствие давления антибиотиков, резистентные штаммы с относительно низкой базовой скоростью роста, тем не менее могут сохраняться в сочетанной инфекции в организме хозяина, обеспечивая возможности для выбора, но не конкуренции с другими восприимчивыми штаммами (Sergeev R. et al., 2011) целом для конкурирующих штаммов разных генотипов существенное влияние оказывает фитнес штамма, а не сама мутация, приведшая к резистентности. Таким образом, восприимчивые к противотуберкулезным препаратам клоны MANU, имеющие высокие показатели фитнеса на ограниченной территории (Мумбаи, Индия), имеют преимущества, обеспечивающие им доминирование над глобально распространенными Beijing штаммами и CAS, что может иметь благоприятный прогноз для контроля ТБ для данной территории.

В целом, штаммам Beijing присваивают селективные преимущества по сравнению со штаммами из других родов микобактериального комплекса по способности приобретать устойчивость к противотуберкулезным препаратам. Это свойство, в первую очередь, связывают с повышенной мутационной активностью генов, ответственных за формирование лекарственной устойчивости на фоне компенсаторных мутаций (Jurriaan E. et al., 2012; Ford C. et al., 2013), снижающих цену приспособляемости в условиях давления антибиотиков, что, в конечном счете, могло бы приводить к увеличению распространенности и / или более быстрому прогрессированию болезни после инфицирования. Тем не менее, имеются данные, свидетельствующие об отсутствии повышенных частот мутаций у генотипа Beijing, по сравнению с non-Beijing штаммами при высоких концентрациях противотуберкулезных препаратов первой линии (Werngren J. et al., 2003).

Учитывая, что резистентность к антибиотикам у микобактерий туберкулеза формируется посредством хромосомных мутаций, и то, что новые мутации устойчивости к антибиотикам могут возникать несколько раз в течение лечения одного эпизода ТБ (Sun G. et al., 2012), изменение мутационной активности у некоторых вариантов МБТ может давать значительные преимущества в распространении отдельных его клонов. Этот факт и определяет повышенное внимание к изучению механизмов резистентности у различных генетических семейств МБТ.

Экспериментальные исследования, связанные с изучением естественного жизненного цикла микобактерий, как облигатного патогена человека, проведенные за пределами инфицированного человека - будь то *in vitro* или в *in vivo* - на модельных системах, имеют ограниченные возможности обобщения конкретных аспектов взаимодействия хозяин-патоген. Хотя достижения в экспериментальной микобактериологии открыли ключевые возможности проникновения в суть метаболических и регуляторных путей, которые являются критическими для выживания МБТ и патогенеза, остается чрезвычайно трудно точно определить физиологический статус микобактерий на разных стадиях инфекции и в дискретной анатомической и клеточной (микро) средах. Однако, несмотря на существующие

барьеры для перевода наблюдений из фундаментальных исследований в практические результаты, это направление имеет большие перспективы.

Сравнение способности штаммов МБТ противостоять противотуберкулезным препаратам *in vitro* было проведено на чувствительных штаммах Beijing и EAI из Вьетнама. Было осуществлено определение частоты и диапазона времени возникновения мутаций у этих штаммов во время воздействия различных доз препаратов (Jurgiaan E.M. et al., 2012). Частоты мутаций на воздействие изониазида, моксифлоксацина и амикацина были схожими у сравниваемых изолятов. Однако частота мутаций к рифампицину у штаммов Beijing была значительно выше (в диапазоне от $1,6 \times 10^{-5}$ до $5,4 \times 10^{-3}$) по сравнению со штаммами EAI (от $6,3 \times 10^{-8}$ до $3,8 \times 10^{-4}$). Поскольку рифампицин является наиболее широко используемым противотуберкулезным препаратом, то выявленный факт имеет большое значение.

Для штаммов генотипа Beijing, увеличение частоты мутаций при воздействии рифампицина может быть связано с миссенс мутацией в генах *mut*, которые могут изменить механизм восстановления ДНК, и как следствие, частота формирования резистентных мутантов может увеличиться, несмотря на снижение фитнеса (Ebrahimi-Rad M, et al., 2003). Недавние исследования липидов рифампицин устойчивых мутантов двух генетически различных штаммов - CDC1551 и Beijing W - обнаружили количественные изменения (> 2 раза, $p < 0,05$) в более чем 100 липидов в каждом мутанте. Сосредоточив внимание на молекулярных событиях, которые происходят среди большинства мутантов различного генетического происхождения, было обнаружено, что мутации резистентности к рифампицину приводят к изменению концентраций микобактина сидерофоров и ацилированных сульфогликолипидов бактериальной стенки МБТ (Lahiri N. et al., 2016).

Анализ же экспериментальных данных развития рифампицин-устойчивых мутантов среди штаммов Beijing, но не штаммов EAI, показал, что их отбор происходил в широком диапазоне концентраций антибиотика. Теми же авторами было установлено, что для достижения 100% бактерицидного эффекта требуется большая концентрация рифампицина у отдельных штаммов Beijing, особенно при их высокой плотности *in vitro*, что имеет важное клиническое значение. Рифампицин-

устойчивые мутанты не возникали при низкой плотности возбудителя в эксперименте ни в случае штаммов Beijing, ни EAI, то есть накопление возбудителя в очаге поражения имеет критическое значение для формирования резистентности к рифампицину, независимо от генетического варианта возбудителя (Jurriaan E. et al., 2012).

Устойчивость к рифампицину кодируется множественными мутациями в области гена *rpoB*. Штаммы, в которых есть большее число потенциальных мутаций, которые обеспечивали бы устойчивость к препарату, более быстро приобретают устойчивость к рифампицину. Анализ мутаций штаммов Beijing показал широкий диапазон замен в гене *rpoB*: CAC → GAC (H526D), CAC → TAC (H526Y) и TCG → TTG (S531L) (Jurriaan E.M. et al., 2012).

Другими авторами были выявлены различия в частоте мутаций, которые предсказывают значительно более высокую вероятность того, что у пациентов, инфицированных чувствительными штаммами, будет возникать множественная лекарственная устойчивость бактерий в процессе лечения противотуберкулезными препаратами первого ряда (Ford C. et al., 2013). Штаммы Beijing приобретали устойчивость к рифампицину (2 мкг/мл) со значительно более высокой скоростью (10-кратной разницей), чем представители Евро-американского семейства. При этом вышеописанное увеличение скорости приобретения резистентности поддерживалось 10-кратным варьированием концентрации рифампицина (0,5 мкг / мл - 5 мкг / мл).

Увеличение частоты появления резистентных мутантов Beijing было связано с более высокой исходной скоростью (до воздействия рифампицина) мутаций не только в гене *rpoB*, но и генах, способствующих приобретению резистентности к изониазиду, этамбутолу (Ford C. et al., 2013), что отражает мультипликативные эффекты повышенного риска приобретения устойчивости к каждому отдельному препарату и формированию МЛУ. Наряду с этим, обнаружено, что штаммы Beijing имеют больший набор полиморфизмов в генах репликации, рекомбинации и репарации ДНК по сравнению с штаммами Евро-американского генетического семейства, проявляя повышенную вероятность того, что они являются более изменчивыми, чем другие штаммы (Mestre O. et al., 2011).

Разработка стохастической имитационной модели эволюции лекарственной устойчивости в организме больного ТБ с целью оценки потенциального клинического влияния наблюдаемых различий в частоте мутаций между Beijing и Евро-американскими штаммами позволила выявить повышенный риск развития МЛУ (в 22 раза) у пораженных W-Beijing (штамм HN878) до лечения по сравнению с пациентами, инфицированными Евро-американским штаммом (широко используемым в экспериментальных исследованиях - CDC1551) (Ford C. et al., 2013). В моделях животных W-Beijing штамм HN878 считается "гипервирулентным", поскольку заражение им приводит к увеличению смертности, и с ним связывают развитие иммунопатологии у инфицированных животных (Ordway D. et al., 2007). В недавних экспериментах было показано, что клинический изолят HN878 индуцирует надежную продукцию IL-1 через TLR-2-зависимый механизм, который поддерживает мощный ответ через Интерлейкин 17 (IL-17). Ранее отмечалось, что IL-17 является необязательным для первичного иммунитета против МБТ на модели лабораторного адаптированного штамма H37Rv. Оказалось, что лабораторный адаптированный штамм H37Rv или менее вирулентный клинический изолят CDC1551 не требуют IL-17 для защитного иммунитета против инфекции, в то время как инфекция, вызванная штаммом HN878 требует IL-17 для раннего защитного иммунитета. Показана также роль IL-17 в опосредованном защитном иммунитете против инфекции HN878 через сигнализацию IL-17 с рецептором в некроветворных клетках, опосредующих индукцию хемокинов, CXCL-13, который необходим для локализации Т-клеток в пределах лимфоидных фолликулов легких (Gopal R. et al., 2014).

Следует еще раз подчеркнуть, что в вышеописанных экспериментальных исследованиях формирования резистентности (феномен увеличения частот мутаций) был обнаружен у клона W Beijing, который наиболее тесно связан со случаями МЛУ-ТБ и его распространение носит эпидемический характер в ряде регионов. Экстраполяция выводов об уникальности свойств отдельных клонов генотипа Beijing на все Восточно-Азиатское семейство невозможна вследствие их широкой гетерогенности, но выявление и мониторинг успешных клонов, обладающих

выявленными свойствами приобретает важное клинико-эпидемиологическое значение.

Приобретение МЛУ напрямую связывают с бактериальной нагрузкой МБТ в организме больного, которая создает благоприятные условия для формирования резистентности к противотуберкулезным препаратам. Поэтому раннее и активное выявления случаев ТБ, вызванных клонами МБТ, с повышенной вирулентностью, иммуномодулирующим действием и значительным потенциалом для мутации резистентности остается лучшей надеждой обуздания эпидемии лекарственной устойчивости. Экспресс диагностические процедуры выявления успешных W Beijing клонов МБТ из мокроты и других биологических материалов и адекватная контролируемая терапия могут стать решающим моментом управления эпидемией МЛУ ТБ на территориях активного его распространения.

Экспериментальные исследования, связанные с изучением естественного жизненного цикла микобактерий, как облигатного патогена человека, проведенные за пределами инфицированного человека - будь то *in vitro* или в *in vivo* - на модельных системах, имеют ограниченные возможности обобщения конкретных аспектов взаимодействия хозяин-патоген. Хотя достижения в экспериментальной микобактериологии открыли ключевые возможности проникновения в суть метаболических и регуляторных путей, которые являются критическими для выживания МБТ и патогенеза, остается чрезвычайно трудно точно определить физиологический статус микобактерий на разных стадиях инфекции и в дискретной анатомической и клеточной средах. Однако, несмотря на существующие барьеры для перевода наблюдений из фундаментальных исследований в практические результаты, это направление имеет большие перспективы.

На основе результатов обнаружения ряда генов, связанных с регуляцией факторов патогенности (гены локуса *plc ABC* и *plc D*, кодирующие фосфолипазу C; ген *lipR*, кодирующий структуру фермента липазы, ответственной за метаболизм липидов и формирование клеточной оболочки; ген *pks15/1*, кодирующий фермент поликетидсинтазу Pks15/1, участвующую в образовании фенольных гликолипидов, которые подавляют образование Т-лимфоцитов и передачу сигналов в иммунной

системе с помощью цитокинов) описан их полиморфизм и ассоциированность с генотипической принадлежностью как у клинических изолятов Евро-Американского происхождения (Reed M., et al., 2004; Viana-Niero C. et al., 2004; Krishnan N. et al., 2011), так и среди российских штаммов (Концевая И., и др., 2014). Установленная связь полиморфизмов *pks15/1* и *dosT* с локальными клонами Beijing, проявляется общими для этого генотипа мутациями (Constant P. et al., 2002) Инсерции в гене *pks15/1*, которые приводят к увеличению продукции фенольных гликолипидов и сопровождают повышение вирулентности, связывают с усилением патогенных свойств именно у штаммов генотипа Beijing (Gagneux S., Small P., 2007; Концевая И. и др., 2014). Другое преимущество штаммов Beijing получили в результате мутации в гене *dosT*, для которой установлена связь с гиперэкспрессией генов системы DosR в условиях гипоксии и высокой концентрации оксида азота (Fallow A. et al., 2010). К профилю этих двух генов добавляется факт выявления связи с множественной лекарственной устойчивостью, хотя ассоциация генов факторов вирулентности и МЛУ имеют опосредованный характер. У штаммов из Самарской области вставки в гене *pks15/1* (RR=0,727, 95 % CI=0,64–0,83) и замены в гене *dosT* (RR=0,724, 95 % CI=0,64–0,82) встречались чаще в группе с МЛУ и ШЛУ. Напротив, на примере самарских штаммов было показано, что чувствительность к ПТП связана с дикими вариантами генов *dosT* и *pks15/1* и полиморфизмами в генах *plcA* и *lipR*. (Концевая И. и др., 2014).

Дальнейшее исследование этих полиморфизмов и их связи с выживаемостью пациентов с ТБ показало отсутствие какого либо влияния на результат взаимодействия на уровне организм-патоген. То есть факторы, связанные с патогенностью (полиморфизмы в генах *plcA*, *plcB*, *PLCC*, *lipR*, *dosT* и *pks15/1*) не оказывают никакого влияния на выживаемость пациентов. Но туберкулез, вызванный определенными клонами Beijing (клады А и В), был связан с низкой выживаемостью по сравнению с другими штаммами этого же генотипа (Ignatyeva O. et al., 2015).

Описанные выше данные подтверждают накопление эволюционно успешными клонами МБТ уникальных свойств вирулентности и лекарственной устойчивости,

которые являются важными факторами развития эпидемического процесса ТБ. Несмотря на то, что механизмы их влияния различны, распространенность определенных полиморфизмов генов повышенной вирулентности усиливает активность заражения и развития патологического процесса. Эти процессы обеспечивают увеличение трансмиссии штаммов, приобретших лекарственную устойчивость, приводящей к увеличению и поддержанию опасного резервуара инфекции.

1.4 Распространенность различных генотипов МБТ у больных ТБ – ВИЧ

Больные ВИЧ-инфекцией имеют высокие риски для развития активных форм туберкулеза (Reid A. et al, 2006). ТБ - ведущая причина смерти среди ВИЧ-инфицированных с низким уровнем CD клеток в странах, отягощенных эпидемией туберкулеза. Еще более усугубляет течение ВИЧ-инфекции заражение изначально устойчивыми формами возбудителя ТБ или развитие МЛУ в ходе лечения ТБ (Найговзина Н. и др., 2009; Виноградова Т.Н. и др., 2011; Day J. et al., 2004; Podlekareva D., et al., 2006). Туберкулез центральной нервной системы, вызванный МЛУ формами МБТ, является фатальным без быстрой диагностики и использования второй линии противотуберкулезной терапии. Именно эта форма ТБ чаще встречается у ВИЧ-позитивных больных людей. Кроме того, ВИЧ-инфекция вносит свой вклад в рост ТБ с МЛУ за счет увеличения доли клинических форм ВИЧ-ТБ, сопровождающихся бактериовыделением.

Поэтому важнейшим направлением контроля туберкулеза становится ограничение и предотвращение циркуляции МЛУ штаммов для снижения риска суперинфицирования ВИЧ-позитивных пациентов. Если при нозокомиальном заражении штаммами МБТ с МЛУ у ВИЧ-инфицированных без ВААРТ смертность достигает 70% случаев, особенно при ранних рецидивах ТБ (Ritacco V. et al., 1997; Вартамян Ф., Шаховский К., 2007), то в открытых популяциях значимой связи между МЛУ-ТБ и ВИЧ-инфекцией не выявлено (Espinal M. et al. 2001; Богословская

Е. и др., 2004; Балабанова Я. и др., 2006; Богородская Е., и др., 2007; Eker B. et al., 2008). Некоторые исследования свидетельствуют о повышенных частотах МЛУ-ТБ у ВИЧ-инфицированных в африканских странах с высоким бременем ТБ (MacArthur A. et al., 2001; Demissie M. et al., 2001; Weyer K. et al., 2003). Влияние ВИЧ-инфекции, как специфического фактора развития МЛУ связывают с наличием иммуносупрессии и мальадсорбции, лечением ВИЧ-инфекции и других оппортунистических инфекций (Peloquin C.A. et al., 1996; Morehead R., 2001; Pereira M. et al., 2005; Tappero J.W. et al., 2005; Tamhane A. et al., 2013; McGrath M. et al., 2014).

Недавнее исследование крупной вспышки МЛУ-ТБ в Южной Америке на основе результатов эволюционного анализа и результатов реконструкции сети передач возбудителя показывает, что ВИЧ-инфекция не оказывает значительного влияния на заразность или частоту мутаций МТБ у пациентов, и она не связана с увеличением частоты возникновения резистентности у пациентов на протяжении эпизодов лечения ТБ. Эти результаты указывают на то, что эпидемия ВИЧ служит усилителем вспышек ТБ, обеспечивая резервуар восприимчивых хозяев, однако при этом инфекция ВИЧ не является непосредственным фактором для возникновения и передачи устойчивых штаммов (Eldholm V. et al., 2016)

Достижение высокой эффективности лечения МЛУ-ТБ у ВИЧ-инфицированных становится сложно выполнимой задачей (Park et al., 1996; Finlay et al., 2004). Изучение исходов терапии у ВИЧ-инфицированных пациентов с туберкулезом даже при доступности адекватной терапии обнаруживает более высокую смертность МЛУ-ТБ, чем у тех, кто не имел ТБ с МЛУ (Mannheimer S.B. et al., 1997; Girardi E. et al., 2005; Morozova et al., 2006; Gupta R.K. et al., 2015). В исследовании, проведенных 20 лет назад, более 60% ВИЧ-инфицированных пациентов с МЛУ-ТБ умирали во время лечения, по сравнению с 26% ВИЧ-инфицированных пациентов с чувствительным к антибиотикам туберкулезом (Mannheimer S. et al., 1997). При этом средняя выживаемость этой сложной группы пациентов была от 14,1 до 22 месяцев (Park M. et al., 1996). Спустя десять лет при внедрении новой практики ведения МЛУ случаев, когда эффективность курса терапии могла достигать 70% - 80%,

ВИЧ-инфицированные пациенты давали в половине случаев неблагоприятный исход этой формы ТБ по сравнению с 27% ВИЧ-инфицированных больных туберкулезом без МЛУ (Nunes E. et al, 2003; Leimane V. et al., 2005). Однако даже с улучшением диагностического и терапевтического потенциала только половина пациентов с ВИЧ выживает через полгода после старта лечения МЛУ-ТБ, особенно при повторных курсах лечения (Мошкович Г., и др., 2009; Пьянзова Т. и др., 2014; Нечаева О., 2015; Trinh Q. et al., 2016).

Опасность заражения от ВИЧ-инфицированных, больных ТБ лиц, представляется неоднозначной, учитывая большую частоту ограниченных и внелегочных форм ТБ у этой группы пациентов по сравнению с общей популяцией. В целом при развитии легочных форм ТБ с бактериовыделением значимых различий в величине риска заражения от ВИЧ-инфицированных не было выявлено (Cusciani M. et al., 2001). В отдельных случаях была показана более высокая вероятность трансмиссии при домашних контактах с ВИЧ-отрицательными лицами, чем с ВИЧ-положительными (Carvalho A. et al., 2001; Kwan C., Ernst J., 2013). Это связывают с тем, что в мокроте ВИЧ-ТБ больных обнаруживается меньшее содержание МБТ за счет меньшей степени распада легочной ткани и редуцирования каверн (Валиев Р. и др., 2005; Matsuoka S. et al., 2004; Fenner L. et al., 2012). Вместе с тем, при низком уровне CD клеток у ВИЧ-инфицированных прогрессирование ТБ и вероятность рецидивов возрастает, что приводит к развитию клинически и рентгенологически проявленных признаков заболевания, при распознавании которых могут быть сокращены риски для передачи инфекта другим лицам (Tamhane A. et al., 2009; Brust J. et al., 2013).

По данным современной литературы у ВИЧ-инфицированных с низким уровнем количества CD4 лимфоцитов обнаруживается не только повышенная частота микст генотипов МБТ в одном образце, но генетически различающиеся изоляты возбудителя ТБ, выделенные из крови и мокроты (von Reyn C. et al., 2011; Adams L. et al., 2012; Ssenooba W. et al., 2015). При этом исследователями сделано предположение о различном потенциале патогенности у отдельных генетических линий МБТ, возникающем при поликлональных инфекциях в разных пораженных

системах организма больного. Эти данные отражают не только высокую распространенность смешанных инфекций у ВИЧ-инфицированных пациентов. Подобного рода данные парных образцов увеличивают возможность обнаружения микст инфекции, пропущенной в результате анализа только одного образца от больного, поскольку в культуре *in vitro* в большинстве случаев возможно преобладание одного доминантного штамма (Martin A. et al., 2010).

Наличие микст-генотипов МБТ наиболее часто ассоциировано с суперинфицированием, которое может иметь как немедленный эффект в течение одного эпизода лечения, так отсроченное действие на протяжении хронического или рецидивирующего течения туберкулеза (Uchiya K. et al., 2013; Shin S. et al., 2014). Суперинфицирование МТБ может привести к немедленному клиническому случаю болезни и/или развитию тяжелых форм заболевания ТБ, особенно у пациентов с ВИЧ-инфекцией (Leeds I. et al., 2010). В других случаях наблюдается интервал между вероятным повторным заражением и развитием туберкулеза из латентной формы в отличных по локализации участках организма с вовлечением легких или только внелегочной локализацией (Barrios-Payan J. et al., 2012; Behr M. et al., 2014).

Многочисленные наблюдения популяции больных сочетанной коинфекции ТБ-ВИЧ обнаружили широкое разнообразие штаммов МБТ, обладающих различной вирулентностью (Cruciani M. et al., 2001; Gagneux S. et al., 2006; Nicol M., Wilkinson R., 2008; Middelkoop K. et al., 2014). Успешность распространения отдельных клонов МБТ среди ВИЧ-инфицированных не была связана с социальными факторами (Gagneux S. et al., 2006; Middelkoop K. et al., 2014). Активно распространяющиеся штаммы были связаны с лекарственной устойчивостью, но слабо связаны с ВИЧ-инфекцией в популяции эпидемического уровня поражения этим заболеванием. Наиболее вероятно, что характеристики возбудителя, играют большую роль в успехе отдельных штаммов по сравнению с социальными факторами и условиями среды макроорганизма (Middelkoop K. et al., 2014).

В условиях совместного развития двух эпидемий туберкулеза и ВИЧ-инфекции на некоторых территориях России, в том числе и Восточносибирского региона, имеет высокую актуальность установление генотипической

принадлежности возбудителя, особенно для людей, живущих с ВИЧ-инфекцией. Доминирование штаммов генотипа Beijing в изучаемом регионе, эпидемические клоны которого имеют повышенную способность к развитию диссеминированных, внелегочных и генерализованных форм ТБ (Lopez B. et al., 2003; Thwaites G. et al. 2008), несут еще большую опасность для ослабленного иммунитета ВИЧ-инфицированных больных ТБ, особенно в условиях развития МЛУ.

1.5 Распространенность различных генотипов МБТ в Северной Азии и прилежащих к ней регионов Азии и Европы

Полученные в разных регионах России молекулярно-эпидемиологические данные о возбудителе ТБ свидетельствуют о гетерогенности циркулирующей популяции *M. tuberculosis*, ее локальных особенностях. Периодический обзор разобщенных по времени и территории результатов исследований позволяет выявить динамику общих закономерностей проявления свойств возбудителя (Мокроусов И.В. и др., 2012; Дымова М.А. и др., 2012, 2013; Умпелева Т.В. и др. 2013; Casali N. et al., 2012, 2014; Mokrousov I., 2013, 2015). Прослеживается устойчивая тенденция сохранения неблагоприятной эпидемической ситуации по туберкулезу, поддерживаемая распространением мультирезистентных штаммов возбудителя различных генотипов в отдельных регионах России, стран СНГ и бывшего СССР. При этом во многих случаях в структуре популяции *M. tuberculosis* доминируют штаммы генетического семейства Beijing. Тем не менее, большая часть Северной Азии - субрегиона Евразии, состоящего из азиатской части России (в период существования Российской империи и СССР — без Средней Азии), в состав которой входят Уральский, Сибирский и Дальневосточный федеральные округа (Википедия https://ru.wikipedia.org/Северная_Азия), длительный период имела значительные пробелы в исследовании этого региона.

Общая картина распространения различных генотипов МБТ на изучаемой территории складывается из результатов исследований штаммов из Уральского региона, Томской, Новосибирской, Кемеровской Иркутской, Сахалинской областей,

Республики Тыва, Красноярского и Приморского края. Локальные особенности распространения отдельных клонов доминирующего генотипа Beijing и других генетических линий были описаны с помощью доступных на момент исследования молекулярно-генетических методов идентификации генотипов и характеристик лекарственной устойчивости, оцениваемой по наличию соответствующих мутаций.

По Уральскому региону стали доступны результаты оценки популяции *M. tuberculosis*, когда было проведено исследование в Свердловской области (Kovalev S.Y. et al., 2005). Согласно этой работе MIRU-VNTR паттерны, образующие наибольшие кластеры принадлежали генотипу Beijing и Ural. В целом половина выборки относилась к генотипу Beijing, кластеризация профилей которого достигала 88%. Последующее изучение уральской популяции *M. tuberculosis* было проведено на 178 изолятах, выделенных в 2009–2011 гг. от впервые выявленных эпидемиологически несвязанных больных. MIRU-VNTR профили (15 локусов) генотипа Beijing составили 55,1%, изоляты которых в более половины случаев несли мутации в генах устойчивости к изониазиду и рифампицину (*rpoB* Ser531→Leu и *katG* Ser315→Thr1). Гетерогенность изолятов Beijing проявилась в виде 50 профилей VNTR. Самый крупный кластер включал четверть изолятов Beijing. Еще большая неоднородность выявлена среди non-Beijing изолятов - 64 VNTR-профиля групп LAM, Ural, Haarlem и др. Мультирезистентные изоляты LAM и Ural, как и изоляты Beijing, имели значительное представительство в общей выборке (соответственно 30,4 и 28,6%). При этом сочетание мутаций у этих двух генотипов к рифампицину и изониазиду было иным, чем у Beijing. Большинство МЛУ изолятов LAM имело мутации в *rpoB* гене - Asp516→Val и *katG* гене - Ser315→Thr1, *inhA*_T15. Изоляты генотипа Ural с МЛУ были наиболее вариабельными по спектру мутаций к рифампицину (Умпелева Т.В. и др., 2013).

Генетическое разнообразие штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на целом ряде территорий Северной Азии, было описано группой исследователей по данным Новосибирской области, Республики Тыва, Красноярского и Приморского краев и о. Сахалин (Дымова М. и др., 2013). Обобщенная оценка изолятов показала доминирование семейства Beijing в выборке с наибольшей частотой встречаемости

отдельных субтипов с профилями MIRU-VNTR 15 –233325153533424 у 34,9% (226/968) изолятов, 233325173533424 – у 17,6% (114/968) изолятов и более редких клонов в 1-8% случаев, которые также относились к этой генетической линии. В данном исследовании были обнаружены МЛУ штаммы в 33,8% (492/968) случаях. Между принадлежностью к семейству Beijing и наличием МЛУ выявлена ассоциация, напротив, для изолятов LAM, Haarlem и для группы T обнаружено отсутствие такой связи, ранее описываемой для LAM на других территориях России (Casali N. et al., 2014) что могло служить дополнительной характеристикой локальной популяции МБТ Сибири и Дальнего Востока.

Общая характеристика Новосибирской области сводилась к тому, что 47% из 106 изолятов были идентифицированы как Beijing, восемь из которых (16%) имели MIRU-VNTR 15 профиль 233325153533424 и восемь (16%) – 233325173533424, которые являются наиболее распространенными в России. Исследование мутаций устойчивости к изониазиду на 48 изолятах позволило определить генетическую резистентность по наличию в 42 (87,5%) случаях замен Ser (315) → Thr в гене *katG* и одному варианту замены T(в положении 34 промоторной области) гена *ahpC*. Устойчивость к рифампицину у 31 изолята установлена в 19 (61%) случаях по мутациям TCG → TTG в кодоне 531 гена *rpoB*. Дополнительно к этому, два штамма имели мутацию GAC → GTC в кодоне 516 гена *rpoB* и два других — замену в кодоне 526 гена *rpoB*, что привело к замещению His→Asn в одном случае и замещению его His→Asp в другом. В кодоне 533 гена *rpoB* содержалась еще одна мутация у одного изолята - CTG → CCG. В целом такое разнообразие мутаций к основным противотуберкулезным антибиотикам характеризует широкие возможности штаммов противостоять терапии, особенно это проявилось у изолятов, принадлежащих генотипу Beijing (R = 0,2, P = 0,032) (Dymova M. et al., 2011). В Томской области обнаружено 27% штаммов в выборке из 77 штаммов, среди которых также преобладали случаи МЛУ (Татьков С. и др., 2008).

В Иркутской области скрининговые исследования МБТ проводились с 2000 года (Огарков О. и др., 2002). Описан спектр гетерогенных клонов и дана подробная характеристика генотипа Ural методами ERIC-PCR и MIRU-VNTR -12

генотипирования (Медведева Т. и др., 2007). Выявлена смена ведущей роли ятрогенного воздействия на формирование МЛУ в Иркутской области, где стали активно передаваться изначально лекарственно устойчивые штаммы МБТ эпидемически распространяющихся клонов генотипа Beijing и Ural (Огарков О.Б. и др., 2007).

В Европейской части России молекулярно-генетические исследования возбудителя туберкулеза проводятся активно в течение почти двадцати лет и накоплены достоверные данные о локальных популяциях на Северо-западе России (Ленинградская, Калининградская, Псковская, Смоленская, Архангельская области, Республика Карелия), в Центральной России (Московская, Тульская области, Калужская, Нижегородская), их связях с клинико-эпидемиологическими проявлениями туберкулеза у больных, в том числе и МЛУ. На основе результатов мониторинговых исследований МБТ также получены данные о повсеместном доминировании клонов Beijing с некоторой вариацией по регионам. Предложена схема генотипирования российских штаммов Beijing для разграничения субтипов по гипервариабельным локусам MIRU-VNTR (Mokrousov I et al., 2008), и non-Beijing штаммов на основе сполиготипирования и по MIRU-VNTR 15 локусам (Мокроусов И. др., 2012; Нарвская О. и др., 2014; Скорняков С. и др., 2014). Оценены возможности использования молекулярно-генетических методов в расследованиях вспышек в медико-социальных учреждениях, которые позволили выявить смешанную инфекцию, являющуюся результатом активации латентного ТБ, случаем суперинфекции и нозокомиального заражения (Антушева Е. и др., 2014). Получена важная информация об относительной обособленности циркуляции штаммов МБТ в пенитенциарной системе на примерах Самарской, Тульской и Архангельской областей (Концевая И.и др., 2011, 2014; Салина Т., Морозова Т., 2014).

Собрана общая картина распределения основных генотипов МБТ по данным MIRU-VNTR- и сполиго- типирования в Европейской части России, и прилегающих к ней территорий Европы и Азии, которая может быть представлена следующим образом (Рисунок 1.3). Доминирование штаммов генотипа Beijing сопровождается

варьирующей до 10-15% по территориям долей генотипов Ural, LAM, T Haarlem (Mokrousov I. et al., 2012).

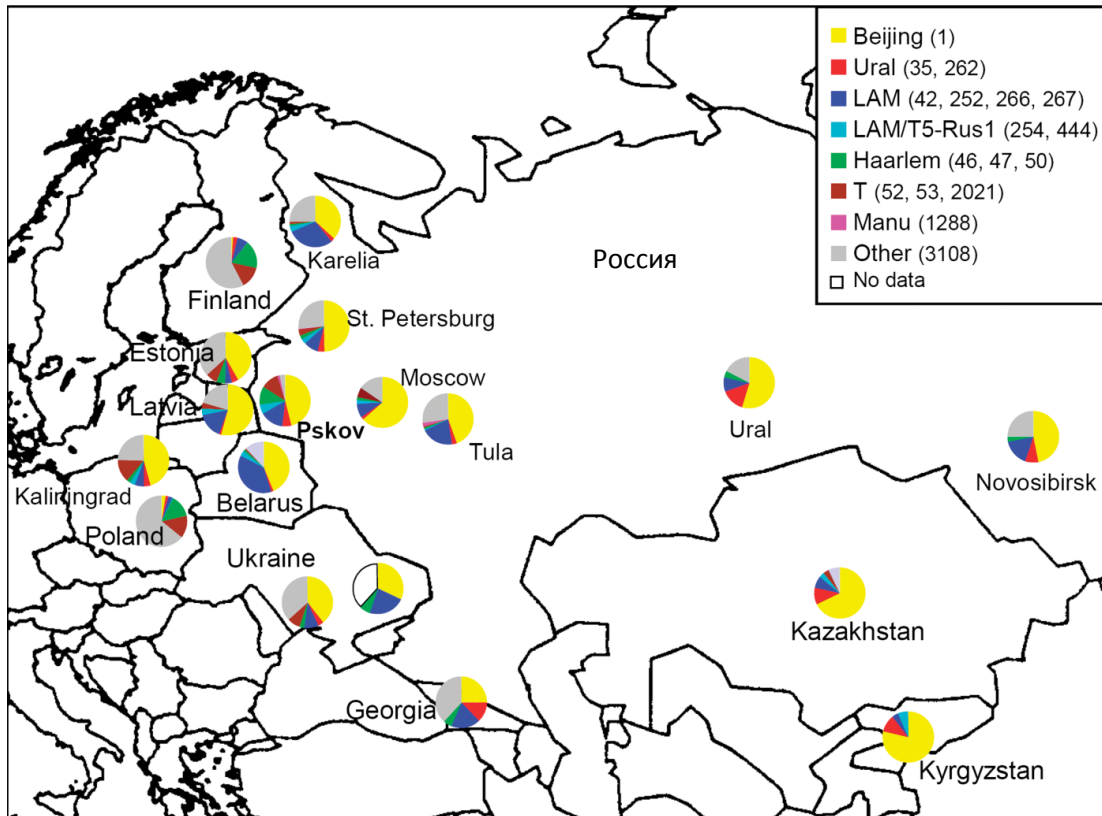


Рисунок 1.3 Географическое распределение основных сполитотипов и генетических семейств, выявленных штаммов М туберкулезом в различных районах России, бывшего Советского Союза и Северной Европы (Mokrousov I. et al., 2012).

Для того, чтобы получить представление об общем разнообразии и географическом распределении субтипов генотипа Beijing первоначально были предложены классификации на основе данных сполито- и MIRU-VNTR-12 типирования (Mokrousov I. et al., 2008). Как видно из Рисунка 1.4, в России были выявлены два основных MIRU типа – M2 (223325153533) и M11 (223325173533), штаммы с 12 локусными профилями которых обнаруживались не только в странах бывшего СССР, но и Юго-Восточной Азии, в том числе и Китае. Разнообразие вариантов генотипа Beijing было ниже, чем в Китае и других близлежащих к нему странах Юго-Восточной Азии, что впервые предположило эпидемический характер распространения современных штаммов МБТ по территории России (Mokrousov I et al., 2008).

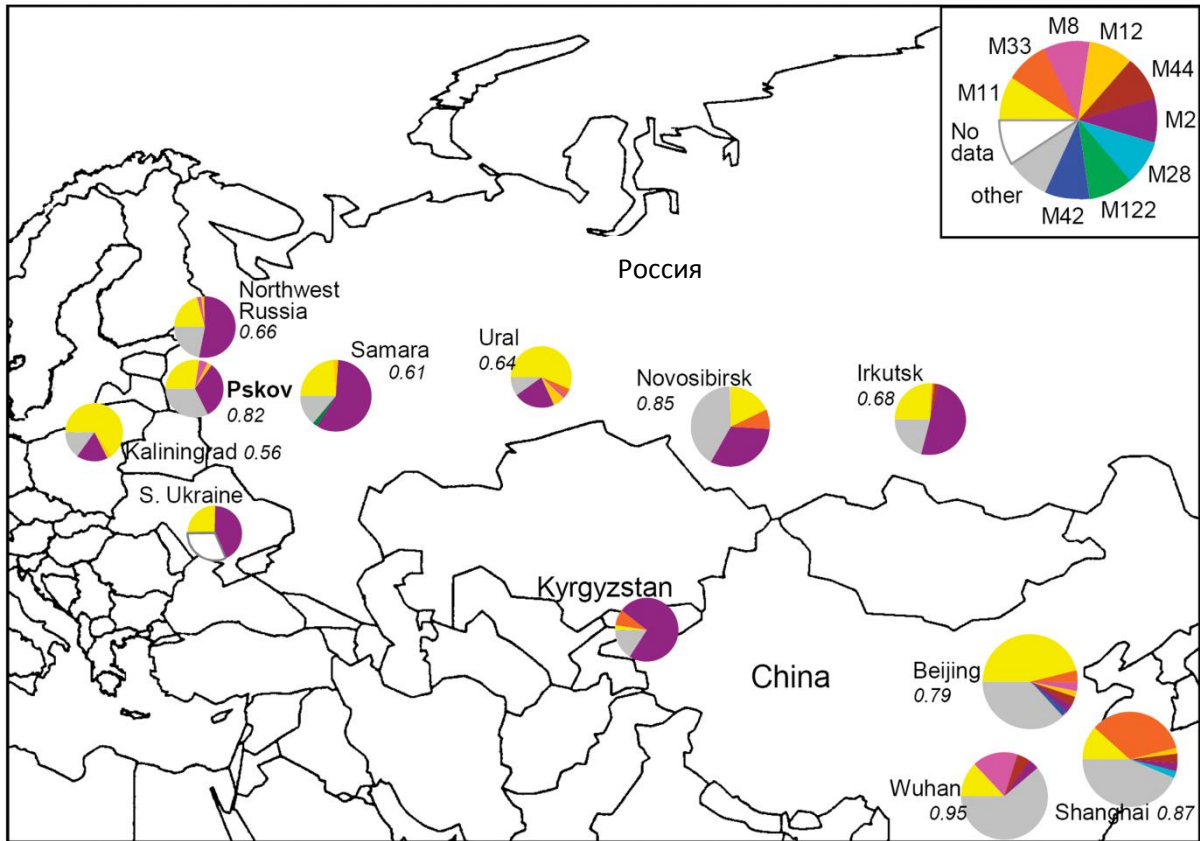


Рисунок 1.4 Географическое распределение основных типов MIRU генотипа Beijing, выявленных в регионах бывшего Советского Союза и Азии (Mokrousov I. et al., 2012).

Однако, дальнейшее изучение мировой филогеографии субтипов этого генотипа с помощью комплекса 24-MIRU-VNTR, данных полногеномного секвенирования, а также использования уникальных генетических маркеров для отдельных кластеров показало значимые различия в клональной структуре российских, центрально-азиатских и южно-азиатских штаммов Beijing, не видимые при классификации MIRU-VNTR-12.

Для выявления кластера B0/W 148 генотипа Beijing был предложен метод идентификации по наличию инсерции IS6110 в локусе Rv2664/Rv2665 ДНК МБТ (Мокроусов И.В. и др., 2012). Идентификация клонового кластера W, который вызвал вспышку МЛУ-ТБ в Нью-Йорке в середине 1990-х годов (Bifani P., et al., 2002), так называемый Gran Canaria Beijing штамм GC1237, или тип # 100-32 (MIRU-VNTRplus.org) или B0/W148, играет важную роль, так как именно с ним

связывают передачу МЛУ-ТБ в России. Первоначально он был обнаружен на Северо-западе России и назван B0 на основе данных профиля IS6110-RFLP (Нарвская О. и др., 1999). Затем другими исследователями был классифицирован по тем же параметрам как W148 (Bifani P. et al., 2002). Его циркуляция обнаружена также в странах бывшего СССР (Casali N. et al., 2014). Анализ мирового распределения кластера B0/W148 позволил выявить, что этот штамм является наиболее успешным российским клоном (Mokrousov I., 2008; 2013). По профилю 24-MIRU-VNTR типирования кластер CC2, который описан по мировым данным, пересекается с B0/W148 и прочно ассоциируется с МЛУ. Именно у этого клона отмечен рост численности популяции в 10 раз быстрее, чем у других штаммов Beijing, эпидемически распространяющихся по всей России (но не бывшей советской Средней Азии). Место его возникновения связывают с Западной Сибирью, а широкое распространение за ее пределы было связано с массовым оттоком населения из этого региона в европейскую Россию в 1960-1980 годы (Mokrousov I., 2013, 2015). Автором обнаружено, что исторически недавнее и филогенетически подтвержденное успешное распространение Beijing B0/W148 было ассоциировано с широким применением современного режима противотуберкулезной химиотерапии и исключительной способностью B0/W148 быстро приобретать лекарственную устойчивость (Mokrousov I., 2013, 2015).

Недавние исследования независимо друг от друга "заново открыли" этот клоновый кластер и назвали его Восточно-европейским субсемейством (Casali N, et al., 2014) Европейским кластером (De Beer J. et al., 2014), Восточно-Европейским кластером (Jiao W. et al., 2015), и CC2 клональным комплексом (Merker M. et al., 2015). Второй по значимости в распространении МЛУ-ТБ в России описан как русско-азиатский клон, определяемый по 24-MIRU-VNTR как CC1 (Merker M. et al., 2015) (Рисунок 1.5). Он соответствует профилю, впервые описанному на Северо-западе России по данным IS6110- RFLP как A0-кластер (Mokrousov I. et al, 2008).

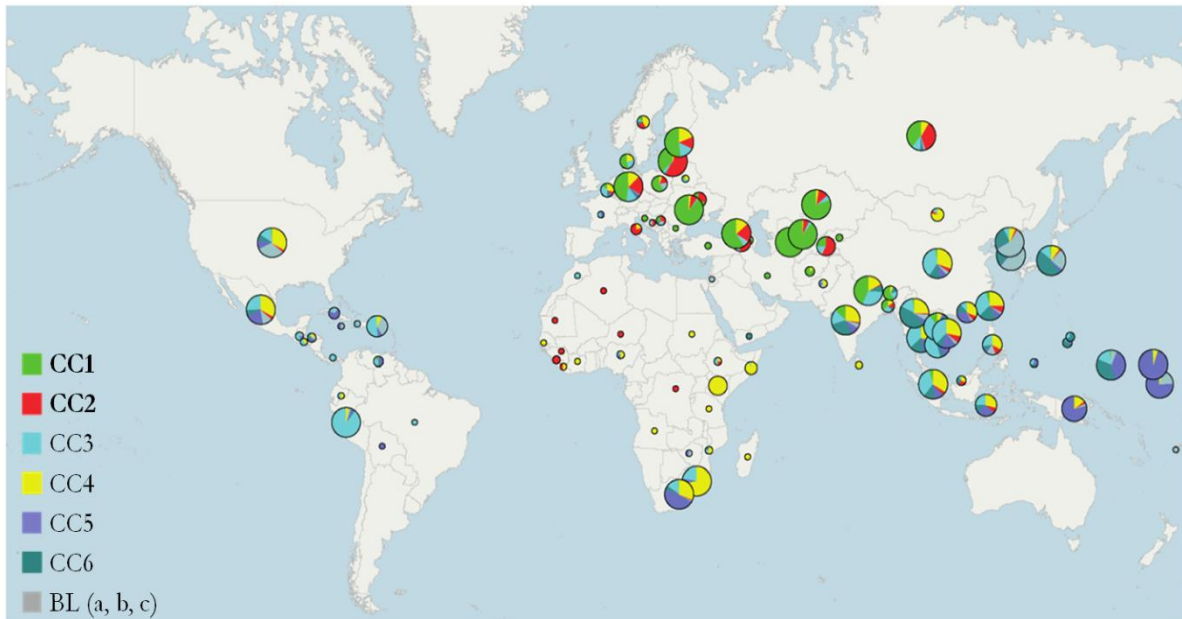


Рисунок 1.5 Мировое распределение клональных комплексов (CC и BL) генотипа Beijing. Каждый круг соответствует стране, размеры окружности пропорциональны числу штаммов (Merker M. et al., 2015)

Кроме подробного изучения генотипа Beijing, в России определена весомая роль генотипа LAM, составляющего не менее пятой части в выборках из Северо-западных территорий России (Dubiley S. et al., 2010; Вязовая А. и др., 2012). С использованием надежных филогенетических маркеров была изучена эволюция LAM и его основных субсемейств в России и соседних с ней странах. Новый подход увеличил в два раза частоту LAM в России и Казахстане, и в четыре раза в Беларуси за счет пересмотра молекулярных характеристик T1 или T5-RUS1 профилей штаммов, большинство из которых образовывали субсемейство эндемичного российского происхождения LAM-RUS (Mokrousov I., 2015). Осуществлен анализ семейства Ural, штаммы которого имеют наибольшую распространенность в регионе Черного моря, где определяется первичный источник его зарождения (Mokrousov I., 2013). Штаммы семейства Ural отмечаются невысоким уровнем трансмиссивности и устойчивой ассоциацией с лекарственной устойчивостью (только на ряде территорий европейской части бывшего СССР), позволяющих сохранять десятую долю в общей микобактериальной популяции (Медведева Т. и др., 2004; Kovalev S. et al., 2005; Огарков О. и др., 2007; Mokrousov I., 2013, 2015).

На основе полученных данных по России, прилегающим к ней территориям стран СНГ и бывшего СССР, а также глобальной информации была выявлена географическая приуроченность тех же основных клонов генотипа Beijing и предложены модели их распространения (Mokrousov I., 2012; Синьков В. И др., 2013; Mokrousov I., 2014). Этими исследованиями определена тенденция увеличения общей доли генотипа Beijing с запада на восток территории Евразии, охватывающей Россию и бывшие республики СССР. Если в Псковской области генотип Beijing обнаруживался в 44,4 % случаев (Вязовая А. и др., 2012), то в Иркутской области он составлял 67% (Огарков О.Б. и др., 2007). На этом фоне кластер B0/W 148 распространен неравномерно от 27% в Псковской области до 55% в Калининградской области (Mokrousov I., 2014).

Моделирование генотипообразования отдельных генотипов МБТ из России, Эстонии, Латвии, Финляндии и Польше, как части Российской империи, и двух европейских стран дало возможность обосновать гипотезу наличия единого источника российских, эстонских и латвийских штаммов, объединенных общим сполиготипом ST1 (Синьков В. И др., 2013). Это также позволило авторам предположить экспансию данного семейства штаммов на территорию СССР в недавнем историческом прошлом из Китая. Установленные особенности распространения генотипа на территории Российской Федерации свидетельствует о быстром распространении его двух субтипов с разительными отличиями во взаимосвязи с лекарственной устойчивостью на территории России и КНР (Mokrousov I., 2014). Лежащая в основе этого феномена гипотеза о том, что одни субтипы могут быть более вирулентными и трансмиссивными, чем другие (Hanekom et al., 2013), дала возможность объяснить существование «эпидемической модели» в странах бывшего СССР, очевидно, связанной с историей взаимоотношений популяций хозяина и возбудителя туберкулеза этих стран. Модель распространения клонов генотипа Beijing в Китае может быть ассоциирована с длительным давлением естественного отбора в течение многих веков, приведших к взаимной адаптации китайцев и МБТ генотипа Beijing, а адаптационная история

эпидемических клонов в России еще не закончена и происходит в текущее время (Синьков В.В. и др., 2013; Mokrousov I., 2012).

Эти представления находят подтверждение в сравнительной оценке структуры генотипов в северо-восточных провинциях Китая (исторически называемой Манчжурии, к которой относятся провинции Хэйлунцзян, Цзилинь, Ляонин и восточная часть Внутренней Монголии), граничащих с Россией, где спектр штаммов отличается широким разнообразием. Генотип Beijing присутствует у 90 % клинических изолятов из провинции Хэйлунцзян, представляющих современные сублинии, в 92,8% случаев они имеют вид в основном двух доминантных клонов, имеющих отличия от российских профилей (Li D. et al., 2014). В двух других северных провинциях Цзилинь и Ляонин профили штаммов по 24 VNTR локусам не имели значимых отличий от Хэйлунцзян. Вместе с тем, среди недавних случаев трансмиссии обнаруживаются штаммы с профилями, отвечающими по профилям MIRU-VNTR 15 штаммам повсеместно циркулирующего штамма CC1 (MIT 16) (Luo T. et al., 2014).

В целом по Китаю выявлено географическое распределение современных и древних субсемейств Beijing (Yin Qing-qin et al., 2016). При условном разделении территории Китая на пять частей по географическому положению, особенностям ведения сельского хозяйства в свете различных этнокультурных и исторических традиций (Север, Центр, Юг, Тибет и Синьцзян-уйгурская часть) проявляется градиент роста современных вариантов Beijing с Юга на Север. Кроме того, в Северном Китае частота ранних древних вариантов Beijing уменьшается с запада на восток, достигая самого низкого уровня в Маньчжурии. На этом фоне сохраняются высокие частоты распространения древнего Beijing в провинциях Ганьсу и Тибете, что связывают с относительной их изолированностью от соседних регионов на самых ранних этапах эволюции генотипа Beijing (Yin Qing-qin et al., 2016).

Широкое распространение штаммов МБТ с вышеуказанными характеристиками (CC1 (MIT 16)) обнаружено в Казахстане, который граничит с Северной Азией на юге. Генотипирование изолятов этой территории показало присутствие штаммов Beijing в 67% случаев с абсолютным доминированием одного

кластера, по профилю 24-MIRU-VNTR и сполиготипирования, отвечающего #94-32 MIRU-VNTRplus (CC1 (MIT 16)) (Skiba Y. et al., 2015). Половина МЛУ изолятов отнесена к тому же генетическому семейству – 58 %. У изолятов МБТ с ШЛУ другой группой исследователей из Казахстана был оценен профиль резистентных мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *embB*, *gyrA*, *gyrB* и *rrs* и *inhA*, который позволил выявить высокие частоты мутаций в этих генах. Как и в регионах России, доминирующей мутацией в гене *katG* обнаружены в 315-м кодоне (n = 53; 91,4%), в гене *rpoB* - в 531-м кодоне (n = 45; 77,6%), в гене *rrs* - в положении 1 401 A/G (n = 33; 56,9%). В *gyrA* – в 94-м кодоне обнаружена дополнительная замена аспарагиновой кислоты цистеином (Тарлыков Р. и др., 2015).

Структура генотипов из Монголии, также граничащей с Северной Азией на юге, содержала в большинстве случаев штаммы Beijing. В выборке 112 изолятов были оценены локусы RD9, RD7, TbD1, RD105, RD750. Это позволило дать обобщенную оценку присутствия Восточно-азиатской линии штаммов, в которую входит генотип Beijing, в 58% случаев. Все ДНК изолятов сохранили локусы RD9, RD7, RD750 и имели делецию в TbD1 (Кириллова Н., 2011). Ранее методами ПДРФ анализа 27 монгольских штаммов были получены 17 профилей генотипа Beijing (van Soolingen D. et al., 1995). Более подробное изучение молекулярной эпидемиологии штаммов в Монголии проведены только недавно (Gurjav U., et al., 2016). Опубликовано исследование, в котором приведены доказательства трансграничного распространения МЛУ-ТБ вдоль железнодорожной магистрали с последующей диссеминацией по территории Монголии (Gurjav U., et al., 2015). С целью пространственной и временной оценки эволюции МЛУ-ТБ в Монголии был проанализированы частоты его появления с 2003 по 2012 годы, и обнаружено, что увеличение числа случаев наблюдались последовательно в провинциях, которые обслуживаются железной дорогой. Статистический анализ выявил три «горячие» точки, где относительный риск МЛУ-ТБ был значительно выше, чем в остальной части страны. Это - Улан-Батор, соседние с ним, три северные и одна восточная провинции, представляющие собой важные остановки в пути на железнодорожной магистрали, связывающей Монголию, Россию и Китай. Хотя авторы указывают на

ранее проведенные исследования, которые установили большую схожесть между монгольскими и китайскими изолятами, подтверждая приграничное распространение этих штаммов из Китая, однозначной роли передачи МЛУ штаммов из соседних стран не установлено.

Следует заметить, что в Монголии железнодорожный транспорт обеспечивает почти 80% грузовых и 30% пассажирских перевозок, поддерживая экономические ресурсы малонаселенной страны (<https://www.votpusk.ru/story/article.asp?ID=13261#ixzz4OudCZtXH>). Поэтому более очевидно, что железная дорога связывает основные населенные пункты Монголии, где концентрируются очаги туберкулезной инфекции, в том числе и МЛУ-ТБ, и создаются, вероятно, дополнительные условия для активной трансмиссии в результате внутренней миграции. Но вероятность трансграничной передачи МЛУ-ТБ остается недоказанной, и для подтверждения предложенной U. Gurjav et al. (2015) гипотезы требуются подробные характеристики циркулирующих на сопредельных территориях штаммов МБТ.

Таким образом, за двадцатилетний период мирового изучения популяции МБТ молекулярно-биологическими методами раскрыты фундаментальные основы генетического разнообразия возбудителя туберкулеза; предложены сценарии происхождения его основных генетических семейств; обнаружена географическая приуроченность доминирования отдельных генотипов в разных регионах мира; определены современные клоны и оценена «успешная» экспансия одних при устойчивой циркуляции других клонов возбудителя туберкулеза. Также установлена связь потоков миграционных процессов и характера взаимоотношений с популяцией хозяина на распространение эпидемических вариантов возбудителя ТБ в мировом масштабе, приобретения опасных тенденций передачи МЛУ-ТБ штаммов. Широкие возможности полногеномного секвенирования раскрыли возможность разграничения суперинфекции и рецидивов туберкулеза; восстановления истории цепи передачи и расследование вспышек заболевания в ретроспективе и при мониторинговых исследованиях. Практическое применение молекулярно-биологических инструментов в эпидемиологии дало возможность создать

адекватные схемы для генотипирования локальных популяций, которые позволяют оценить динамику изменений, и обеспечить реальные пути реализации противотуберкулезных мер.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека». Она была одобрена экспертизой независимого комитета по биомедицинской этике ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» на этапе планирования молекулярно-эпидемиологических исследований (Выписка 2.1 заседания от 03.04.2012) и дополнительно для осуществления раздела биомедицинских исследований.

Фактический материал набран на базе управления Роспотребнадзора по Иркутской области, ОГБУЗ «Иркутская областная туберкулезная больница» (г. Иркутск), ГБУ Республики Саха (Якутия) НПЦ «Фтизиатрия» (г. Якутск), ГБУЗ «Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер имени Г.Д. Дугаровой» (г. Улан-Удэ), ГКУЗ «Забайкальский краевой противотуберкулезный диспансер № 2» (Агинское), Национальный центр инфекционных заболеваний (Улан-Батор, Монголия). В работе использованы методики, требующие информированного согласия пациентов либо их официальных представителей в разделе изучения возбудителя у больных ТБ, сочетанным с ВИЧ-инфекцией. Вышеуказанный раздел исследования выполнен в рамках проекта РФФИ 13-04-91445 НИЗ_а «Исследование движущих сил эпидемии ВИЧ/МЛУ-ТБ: роль генотипов возбудителя туберкулеза и измененной фармакокинетики антиретровирусных и противотуберкулезных препаратов у больных из Восточной Сибири», «информированное согласие на участие» было одобрено экспертизой независимого комитета по биомедицинской этике ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» от и IRB-HSR #17142 (Университет Виржинии, США) от 11.11. 2014. Раздел исследования, посвященный решению задач 5 и 6, выполнен при поддержке гранта РФФИ 15-04-00632 А

«Анализ генетического полиморфизма *Mycobacterium tuberculosis* от больных из контрастных возрастных групп для реконструкции распространения субтипа H17 пандемического генотипа Пекин в Восточной Сибири и Саха (Якутии) в XX веке»).

2.1. Материалы исследования

Объектом настоящего исследования является заболеваемость туберкулезом, для этого нами была проведена комплексная оценка эпидемиологических показателей, а также характеристик популяции возбудителя и хозяина. Для решения задачи 1 были проанализированы статистические показатели, характеризующие эпидемиологическую ситуацию по туберкулезу на отдельных территориях изучения (Иркутская область, республика Бурятия, Забайкальский край, республика Якутия), так и федеральные показатели (Центрального, Северо-Западного, Южного, Северо-Кавказского, Приволжского, Уральского, Сибирского, Дальневосточного и Крымского федеральных округов (ЦФО, СЗФО, ЮФО, СКФО, ПФО, СФО, ДФО и КФО)). Ретроспективный анализ динамики эпидемического процесса туберкулеза за 2005 – 2015 гг. осуществлен по данным информационных бюллетеней «Инфекционная заболеваемость в субъектах Российской Федерации» за 2005 – 2015 гг.; статистических материалов, представленных в аналитических отчетах Федерального Центра мониторинга и противодействия распространению туберкулеза за 2007, 2011 и 2015 гг. Проанализированы заболеваемость, распространенность и смертность населения по РФ и по отдельным ее федеральным округам. Территория РФ была условно разделена на европейскую и азиатскую части. В европейскую вошли - ЦФО, СЗФО, ЮФО, СКФО, ПФО и КФО, азиатскую - СФО и ДФО. Для европейской и азиатской части страны проведено сравнение рассчитанных показателей заболеваемости, распространенности, смертности. Для сравнительной оценки бремени туберкулеза в анализ также были включены данные заболеваемости ТБ в странах, граничащих с Россией, за 2008 – 2011 гг.

С целью эпидемиологической оценки величины резервуара сочетанной инфекции туберкулеза и ВИЧ-инфекции в изучаемом регионе (задача 4) дополнительно проанализированы заболеваемость и пораженность ВИЧ-инфекцией

и ВИЧ-ассоциированным туберкулезом. Для этого в ретроспективный эпидемиологический анализ включены статистические показатели заболеваемости (1995-2016 гг) и пораженности (1998-2016 гг.) ВИЧ-инфекцией в РФ и территориях изучения (Иркутская область, республика Бурятия, Забайкальский край, республика Якутия), а также данные заболеваемости (1999-2016 гг.), распространенности (1999-2016 гг.) и смертности (2005-2016 гг.) от ВИЧ-ассоциированного туберкулеза.

Популяция возбудителя туберкулеза была оценена по выборочным данным собранной коллекции из 1657 штаммов *M. tuberculosis*, полученных от больных туберкулезом, проживающих на изучаемых территориях (для выполнения *задач 2,3,5 и 6*). В анализ были включены выборки изолятов от больных, поступивших на стационарное лечение в Иркутскую областную клиническую туберкулезную больницу (Иркутская область), в Республиканский противотуберкулезный диспансер и туберкулезную больницу УФСИН (республика Бурятия), НПЦ «Фтизиатрия» (республика Саха (Якутия)), в противотуберкулезный диспансер Агинского автономного округа (Забайкальский край), Центр по контролю инфекционных заболеваний (Монголия).

Первичная информация о штаммах включала данные об идентификации и выделении чистой культуры МБТ, которые осуществлялись в специализированных лабораториях выше перечисленных учреждений согласно Приказу № 109 от 21 марта 2003 г. Министерства здравоохранения РФ «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации». Кроме того был для реализации *задачи 3* использованы данные лекарственной устойчивости выделенных штаммов. Информация об устойчивости изолятов МБТ к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого и второго ряда получена из стандартной документации, составляемой в учреждениях фтизиатрической службы при проведении бактериологического теста на лекарственную чувствительность, выполняемого методом абсолютных концентраций на ПТП на плотной среде Левенштейна – Йенсена у больных с бактериовыделением по результатам посева клинического материала (согласно приказу №109 от 21 марта 2003 года «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации»)

и с помощью автоматизированной системы на бактериологическом анализаторе ВАСТЕС MGIT 960.

Для апробации разработанного метода выявления субтипа СС2/W148 (*задача 6*) было проведено два этапа исследований. На первом этапе для оценки специфичности метода были использованы штаммы, полученные с твердой питательной среды Левенштейна–Йенсена и идентифицированные как *M. tuberculosis*. Всего было использовано 650 штаммов со всех исследуемых регионов. Дополнительно для оценки частоты ложноположительных и ложноотрицательных результатов были использованы 10 штаммов нетуберкулезных микобактерий, полученных и идентифицированных культуральными методами на плотных питательных средах. На втором этапе апробации метода были использованы 78 клинических образцов (69 – мокроты, 6 – ликвора и 3 – биопсийных образца), полученные и исследованные в бактериологической лаборатории ОБГУЗ Иркутской областной клинической туберкулезной больницы.

Оценка популяции хозяина была проведена на основе клинико-эпидемиологической информации о больных, которая включала пол, национальность, возраст, диагноз и дата его установления/изменения, число эпизодов лечения и их результаты, наличие сопутствующей патологии, эпидемиологический анамнез.

В разделе работы «Эпидемиологическая оценка резервуара инфекции туберкулеза, сочетанного с ВИЧ инфекцией» (*задача 4*) проведены когортные исследования генетической гетерогенности возбудителя в группах больных туберкулезом с наличием ВИЧ-инфекции и без нее. Клинико-эпидемиологические данные были получены из историй болезней пациентов, поступивших на стационарное лечение в туберкулезные больницы Иркутской области и Бурятии. Первоначально была отобрана коллекция 399 штаммов МБТ от 190 пациентов с ТБ и ВИЧ и 209 – от больных ТБ без ВИЧ-инфекции. Оценка половозрастной структуры, представленная в Таблице 2.1, показала, что несмотря на отсутствие значимых различий по средним величинам (Медиане), обнаружены отличия по

дисперсии в группах больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией и без этой сопутствующей патологии. Выявленные различия отмечены как группе мужчин, так и женщин.

Таблица 2.1

Распределение больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ и без ВИЧ-инфекции по полу и возрасту, Me [95% ДИ]

Пол/ группы	Пациенты с ВИЧ-туберкулезом, n=190	Больные туберкулезом без ВИЧ-инфекции, n=209	Общая когорта, n=399
Мужчины, n=284	33,0[19,5-46,5]	40,0[12,9-67,5]	35,0[12,4-57,6]
Женщины, n=115	32,0[19,5-44,5]	38,0[11,0-65,7]	34,0[11,7-54,3]
Оба пола, n=399	33,0[19,7-46,3]	39,0[11,8-66,2]	34,0[11,6-56,3]

Примечание: Полужирный шрифт – статистическая значимость различий показателей в группах больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией и без нее.

В группу без ВИЧ-инфекции исходно вошли пациенты с более широкой вариационной характеристикой возраста. Поэтому была проведена стратификация по году рождения больных, и в группу с монотуберкулезом отобраны пациенты в диапазоне 1955-1991 гг. рождения, совпадающего с когортой больных ВИЧ-ТБ. После стратификации группы больных с монотуберкулезом различий по полу и возрасту не обнаружено (Таблица 2.2). Таким образом, когорное исследование проведено на выборке 354 случаев туберкулеза. Основная группа представлена 190 пациентами с ВИЧ-ТБ (66,8% (127/190) мужчин), а группа сравнения - 164 больными туберкулезом (73,2% (120/164)).

Таблица 2.2

Распределение больных туберкулезом, ассоциированным с ВИЧ и без ВИЧ-инфекции по полу и возрасту *после стратификации по дате рождения,*

Me [95% ДИ]

Пол/ группы	Пациенты с ВИЧ-туберкулезом, n=190	Больные туберкулезом без ВИЧ-инфекции, n=164	Общая когорта, n=354
Мужчины, n=247	33,0[19,5-46,5]	35,0[14,3-57,0]	34,0[16,6-52,8]
Женщины, n=107	32,0[19,5-44,5]	38,0[19,0-55,5]	33,0[17,1-50,1]
Оба пола, n=354	33,0[19,7-46,3]	35,0[14,8-56,6]	33,0[16,0-52,0]

В разделе «*Моделирование распространения эпидемически значимых клонов *M. tuberculosis* в Северной Азии по молекулярно-генетическим данным*» было проведено сравнение популяционной структуры штаммов МБТ, полученных от больных ТБ из контрастных по возрасту групп. Когорту «молодых» составили пациенты до 25-ти лет, родившиеся в 1990 году и позже. В группу «пожилых» вошли больные ТБ 60-ти лет и старше, родившиеся в 1959 году и ранее. Из коллекции Саха (Якутии) в исследование штаммов, полученных их «контрастных» по возрасту групп пациентов, отобраны ДНК 153 изолята МБТ. Когорту «молодых» составляли 80 пациентов, родившихся, начиная с 1990 года, а группу «пожилых» - 73 человека, родившихся до 1959 года включительно. В выборку вошли преимущественно впервые выявленные случаи ТБ как в группе «молодых» пациентов - 64/73, так и «пожилых» больных - 77/80. В обеих группах были случаи неоднократных (от одного до трех) эпизодов лечения ТБ (7/73 в когорте «пожилых» и 2/80 – «молодых»), а также рецидивов (два пациента из группы до 1959 года рождения и один - после 1990 года рождения). Все случаи рецидивов и эпизодов повторного лечения анализировались персонифицировано, исходя из гипотезы исследования. Контрастные по возрасту группы значимо не отличались по национальной

принадлежности. Штаммы выделены преимущественно от лиц якутской (83 штаммов) и славянской (56 штамма) национальностей. Большинство штаммов - 92 образца были выделены от мужчин.

В коллекции штаммов из Иркутской области для вышеописанного сравнительного анализа популяционной структуры МБТ отобраны 160 штаммов из контрастных по возрасту групп, которые значимо не отличались по национальной принадлежности. Штаммы выделены преимущественно от лиц славянской (156 штамма) национальности. Большинство штаммов - 111 образцов были выделены от мужчин. Когорту «молодых» составляли 59 пациентов, родившихся, начиная с 1990 года, а группу «пожилых» - 101 человека, родившихся до 1959 года включительно.

2.2 Методы исследования

В работе использованы две группы основных эпидемиологических методов: описательные и аналитические (Власов В., 2005; Зуева Л. И др., 2009; Савилов Е. и др., 2011; Общая эпидемиология с основами доказательной медицины..., 2012). Весь материал статистически обработан. В целом дизайн работы представлен в Таблице 2.3. При составлении дизайна исследований мы исходили из представленных в главе 1 современных подходов к оценке популяции возбудителя ТБ эпидемиологическими и молекулярно-генетическими методами. Исследование включало шесть основных этапов:

1. Эпидемиологическая оценка резервуара инфекции ТБ и ВИЧ-ассоциированного ТБ
2. Анализ структуры молекулярно-генетической гетерогенности популяции МБТ
3. Изучение роли различных клонов *M. tuberculosis* в распространении МЛУ туберкулеза.
4. Изучение распространенности различных генотипов *M. tuberculosis* у больных ВИЧ-ТБ
5. Моделирование распространения эпидемически значимых генотипов/субтипов *M. tuberculosis* по молекулярно-генетическим данным

6. Разработка и апробация метода выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing *M. tuberculosis*

Таблица 2.3

Дизайн исследования

Территория исследования	Период, годы	Методы	Размер выборки штаммов
1. Эпидемиологическая оценка резервуара инфекции ТБ и ВИЧ-ассоциированного ТБ			
Федеральные округа РФ	2002-2015	Ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости, распространенности и смертности от ТБ, ВИЧ-ассоциированного ТБ	
Иркутская область			
Республика Бурятия			
Забайкальский край			
Республика Саха (Якутия)			
2. Анализ структуры молекулярно-генетической гетерогенности популяции <i>M. tuberculosis</i> в Северной Азии			
Иркутская область	2010-2015	Сплошной мониторинг, картирование, Выборочные исследования штаммов от пациентов из контрастных возрастных групп; Филогеографическое моделирование	719
Республика Бурятия	2010-2014		338
Забайкальский край	2012-2015		29
Республика Саха (Якутия)	2010-2015		378
Монголия	2012-2014		195
3. Изучение роли различных клонов <i>M. tuberculosis</i> в распространении МЛТУ туберкулеза			
Иркутская область	2010-2015	Оценка лекарственной чувствительности штаммов МБТ по фенотипическим свойствам; аналитические методы (исследования «случай-контроль»)	598
Республика Бурятия	2010-2014		306
Забайкальский край	2012-2015		27
Республика Саха (Якутия)	2010-2015		351
Монголия	2012-2014		71
Иркутская область	2010-2014	Оценка лекарственной чувствительности штаммов МБТ по генотипическим свойствам	26
Республика Саха (Якутия)	2010-2013		23
4. Изучение распространенности различных генотипов <i>M. tuberculosis</i> у больных ВИЧ-ТБ на изучаемых территориях			
Иркутская область,	2010-2015	Выборочные исследования штаммов от больных ТБ из групп с ВИЧ-инфекцией и негативным ВИЧ-статусом; аналитические методы (исследования «случай-контроль»)	298
Республика Бурятия			56
5. Моделирование распространения эпидемически значимых генотипов/субтипов <i>M. tuberculosis</i> в Северной Азии по молекулярно-генетическим данным			
Иркутская область	2010-2015	Филогенетическое моделирование	
Республика Бурятия	2010-2014		
Забайкальский край	2012-2015		
Республика Саха (Якутия)	2010-2015		
Монголия	2012-2014		
6. Разработка и апробация метода выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing <i>M. tuberculosis</i> (650 штаммов <i>M. tuberculosis</i> ; 10 штаммов нетуберкулезных микобактерий, 78 клинических образцов)			

Описательные эпидемиологические методы

1. Ретроспективный эпидемиологический анализ показателей (заболеваемости, распространенности и смертности) туберкулеза и ВИЧ-ассоциированного туберкулеза среди совокупного населения отдельных территорий Сибирского федерального округа (Иркутская область, Республика Бурятия, Забайкальский край) и Дальневосточного федерального округа (Республика Саха (Якутия)), включая оценку величины показателей, их многолетней динамики в сопоставлении с аналогичными показателями РФ за 2002-2015 гг. Кроме того, рассчитаны коэффициенты корреляции между заболеваемостью туберкулезом в РФ и странах, граничащих с ней. Для повышения надежности получаемых результатов использовали метод так называемого «вертикального» анализа (Савилов Е.Д. и др., 2011), в котором динамический ряд пар наблюдения за отдельные годы выстраивается в один сплошной динамический ряд.

В методику ретроспективного анализа также был включен метод ранжирования данных (от минимальных величин к максимальным) по изучаемым регионам и во временном интервале с последующим сложением числа рангов и определением интегрального показателя и коэффициента наглядности K_n (Савилов Е.Д. и др., 2011) по формуле:

$$K_n = \left(1 - \frac{S_x - S_p}{S_x - S_y} \right) \times 100,$$

где S_x – наибольшая сумма рангов, S_p - сумма рангов отдельного населенного пункта, S_y - наименьшая сумма рангов. При использовании коэффициента наглядности K_n возрастание показателя означает ухудшение эпидемиологической ситуации.

2. Анализ структуры молекулярно-генетической гетерогенности популяции *M. tuberculosis* в Северной Азии по выборочным данным 1657 штаммов, который осуществлен на основе результатов молекулярно-эпидемиологического мониторинга за 2010-2015 гг.

3. Анализ лекарственной устойчивости по выборочным данным популяции *M. tuberculosis* в Северной Азии (1286 штаммов), который выполнен по результатам

молекулярно-эпидемиологического мониторинга за 2010-2015 гг. и данным теста фенотипической и генотипической лекарственной устойчивости выделенных штаммов.

Аналитические эпидемиологические методы

Когортный анализ использован при выявлении распространенности МЛУ, и микст-инфекции (заболевания туберкулезом, вызванным двумя генотипами/субтипами МБТ) и оценки результатов стационарной фазы лечения у больных с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом. Применена выкопировка медицинской документации (медицинская карта стационарного больного ф. 003/у). Для эпидемиологической оценки результатов лечения с точки зрения опасности больного ТБ был использован критерий прекращения бактериовыделения, документированного по результатам трехкратного бактериологического исследования клинических образцов.

Исследования случай-контроль использован при ретроспективном выявлении факторов риска развития МЛУ туберкулеза, вызванного разными генотипами/субтипами МБТ, при хронизации или рецидиве инфекционного процесса. Критерием включения в группу «случай» было наличие МЛУ и ШЛУ возбудителя у больных туберкулезом, а в группу «контроль» - другие результаты теста лекарственной устойчивости (сохраненная чувствительность МБТ к ПТП основного и резервного ряда, полирезистентность - устойчивость к ПТП, за исключением рифампицина и изониазида). Рассчитаны отношения шансов развития МЛУ при ТБ, вызванном определенным генотипом/ субтипом МБТ в случае экспозиции (хронизации или рецидиве инфекционного процесса) к частоте случаев развития МЛУ при отсутствии экспозиции (первичной МЛУ – лекарственной устойчивости МБТ, возникшей до начала лечения ПТП).

Молекулярно-генетические и филогенетические исследования

Выделение геномной ДНК и генотипирование осуществляли следующим образом. Экстракцию ДНК изолятов МБТ проводили из убитых культур. Для инактивации одну- две колонии со среды Левеншейна-Йенсена ресуспендировали в 500 мкл 1% смеси N-acetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide в 50% изопропиловом спирте. Перед выделением образцы центрифугировали, ДНК выделяли из осадка набором ДНК-сорб В (Интерлабсервис, Россия) согласно протоколу производителя. MIRU-VNTR генотипирование проводили по 24 локусам по протоколу сайта MIRUVNTRplus. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для MIRU-VNTR-генотипирования изолятов МБТ, представлены в Таблице 2.4.

Таблица 2.4

Структура использованных праймеров для 24-локусного MIRU-VNTR-генотипирования изолятов МБТ

Локус	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')
MIRU 2	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT	TACTCGGACGCCGGCTCAAAAT
MIRU 4	GCGCGAGAGCCCGAACTGC	GCGCAGCAGAAACGCCAGC
MIRU 10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC	GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT
MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
MIRU 20	TCGGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG	GGAGACCGCGACCAGGTA CTTGTA
MIRU 23	CTGTCGATGGCCGCAACAAAACG	AGCTCAACGGGTTCGCCCTTTTGTC
MIRU 24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	CATAGGCGACCAGGCGAATAG
MIRU 27	TCGAAAGCCTCTGCGTGCCAGTAA	GCGATGTGAGCGTGCCACTCAA
MIRU 31	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	GTGCCGACGTGGTCTTGAT
MIRU 39	CGCATCGACAAACTGGAGCCAAAC	CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT
MIRU 40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT	GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA

Продолжение Таблицы 2.4

Локус	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')
Mtub 04	CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCCGGGATTCTTC
Mtub 21	AGATCCCAGTTGTTCGTCGTC	CAACATCGCCTGGTTCTGTA
Mtub 29	GCCAGCCGCCGTGCATAAACCT	AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC
Mtub 30	CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT	ACTTGAACCCCCACGCCATTAGTA
Mtub 34	GGTGCGCACCTGCTCCAGATAA	GGCTCTCATTGCTGGAGGGTTGTAC
Mtub 39	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC	TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG
ETR A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
ETR B	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT	CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC
ETR C	CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT	AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA
QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG	CGAAGTGAATGGTGGCAT
QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGAT	CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT
QUB-4156c	TGACCACGGATTGCTCTAGT	GCCGGCGTCCATGTT

Генотипы семейства Beijing дополнительно субтипировали по участкам генома RD105, RD 142, RD 150, RD 181, RD 207 по Reed M. et al. (2009). Олигонуклеотидные праймеры, использованные для делеционного анализа изолятов МБТ, представлены в Таблице 2.5. В дополнение к прямому праймеру (RD-F), специфичному к начальному региону каждого полиморфизма протяжённых геномных последовательностей, для однозначной идентификации штаммов использовались два обратных праймера – один внутренний по отношению к делеции (RD-Rint) и один, расположенный непосредственно по окончании полиморфизма (RD-Rdel).

Структура использованных праймеров для делеционного анализа (Reed M. et. al., 2009)

Полиморфизмы протяжённых геномных последовательностей	Праймер	Последовательность праймера (5'→3')
RD105	RD105-F	GGTCATATCACGCGTTCGTG
	RD105-R _{int}	TGCGGTCAAAGCACGCCTTG
	RD105-R _{del}	GGTGGCCCAGAAACCACCA
RD207	RD207-F	GTCTGACGACTGACAGGGTG
	RD207-R _{int}	CACGATGGCCACCTCCATG
	RD207-R _{del}	CGTTGCGTGCTCGACGCTG
RD181	RD181-F	CAACAGCACCAGCATCGGAC
	RD181-R _{int}	CTGCCGGTCTTAGTCTGCTC
	RD181-R _{del}	CTTGCTATCGGCGTCGTTGC
RD150	RD150-F	CCATCCTGGCGTTGGTTGG
	RD150-R _{int}	GCCATCGCGACGGTCAATG
	RD150-R _{del}	CCGAGGACCTTACTGCGTG
RD142	RD142-F	GGAGGACACATGTCGCAACAC
	RD142-R _{int}	CGTGCAGCACGAACACCAC
	RD142-R _{del}	GTCGCAGCGGAGTAGATC

Первичную идентификацию генотипов МБТ осуществляли с помощью пакета филогенетических программ сайта MIRUVNTRplus. Для уточнения распространенности полученных профилей так же использовался ресурс открытой базы данных SITVIT. Выявление субтипа B0/W148 генотипа Beijing проводили с помощью теста, основанного на обнаружении инсерции инвертированной IS6110, расположенной в межгенной области Rv2664 и Rv2665 генов (Mokrousov I et al., 2012). Параллельно был осуществлен тест на выявление CC2/W148 по собственной разработке, позволяющей идентифицировать наличие специфической для W148 штаммов динуклеотидной делеции 2541-2542delCA в гене *kdpD*, описанной Merker M. et al, (2015). Дополнительно с помощью пакета программ сайта MIRUVNTRplus

осуществляли MLVA MtbC 15-9 идентификацию в соответствии со стандартной номенклатурой и филогенетический анализ полученных MIRU-VNTR паттернов. MIRU-VNTR-профили штаммов, идентифицированных как генотип Beijing, сравнивали с базой данных Merker M. et al. (2015), где приведены 1550 уникальных паттернов этого генотипа, распределенных по семи клональным комплексам (clonal complexes -CCs).

Уровень кластеризации (clustering rate) определяли по формуле (Supply P. et al., 2006):

$$CR = (n_c - c)/n,$$

где n_c – общее количество кластеризованных штаммов, c – количество кластеров, n – общее количество штаммов. За кластер принимали филогенетическую группу, состоящую из двух или более идентичных по 24-м локусам штаммов.

ПЦР проводили в варианте с электрофорезной детекцией на термоциклерах фирмы БИС-М (Россия) или с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе LightCycler Nano (Roche). Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезированы НПФ “Синтол”, реагенты для ПЦР приобретали в компании Интерлабсервис.

ПЦР маркерных генов резистентности и определение их нуклеотидной последовательности осуществляли на базе Факультета Инфекционных болезней Университета штата Виржиния, США, как описано ранее (Campbell P. et al., 2011) на выборке из 49 ДНК, полученных из культур, выросших на плотной среде Левенштейна – Йенсена в 2010 году. Исследуемую группу составляли 25 штаммов из Саха (Якутии) и 24 штамма - из Иркутской области. Фенотипический профиль лекарственной устойчивости получен по результатам теста на лекарственную чувствительность методом абсолютных концентраций к рифампицину, изониазиду, стрептомицину, канамицину, этионамиду, офлоксацину, капреомицину и циклосерину.

Молекулярно-генетические исследования профиля резистентности также проведены с помощью микрофлюидной карты, основанной на массиве TaqMan специфичных для последовательности зондов, с использованием высокоразрешающего мелтинг анализа, обеспечивающего два уровня обнаружения мутаций. Массив для определения наличия мутаций резистентности в планшетах включал 27 пар праймеров и 40 TaqMan зондов, из которых 38 специфических зондов предназначались для наиболее распространенных мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью: *inhA*, *katG*, *rpoB*, *embB*, *rpsL*, *rrs*, *eis*, *gyrA* и *gyrB*. Два зонда были специфичны для *pncA* His57Asp (CAC → GAC) *M. bovis* и общей silent мутации Ser65Ser (TCC → TCT) для определения мутаций, связанных с развитием резистентности к пиразинамиду. Один праймер/зонд, специфичный для 16S мРНК *M. tuberculosis*, был включен в набор в качестве ПЦР-положительного контроля. Список исследованных мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда, включенных в микрофлюидный набор представлен в Таблице 2.6. Исследуемую группу составили 96 ДНК штаммов МБТ из Иркутской области, собранные в 2015 году.

Таблица 2.6

Исследованные мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью к противотуберкулезным препаратам

Антибиотик	Ген	Мутации
Рифампицин	<i>rpoB</i>	Leu511Pro, Gln513Leu, Gln513Glu, Asp516Val, His526Tyr, His526Asp, His526Leu, Ser531Leu, Ser531Trp, Leu533Pro
Изониазид	<i>inhA</i>	C(-15)T, T(-8)C
	<i>katG</i>	Ser315Thr(ACC)
	<i>katG+inhA</i>	Ser315Thr/C(-15)T, Ser315Thr/(T(-8)C

Продолжение Таблицы 2.6

Антибиотик	Ген	Мутации
Этамбутол	<i>embB</i>	Met306Val, Met306Ile (ATC), Met306Ile2 (ATA), Met306Leu, Asp328Tyr, Asp328Gly, Gly406Ala
Стрептомицин	<i>rpsL</i>	Lys43Arg, Lys88Arg, Lys88Met
	<i>rrs</i>	A514C, C517T, A906G
Амикацин	<i>rrs</i>	A1401G, G1484T
Канамицин	<i>rrs</i>	A1401G, G1484T
	<i>eis</i>	C(-14)T, G(-10)A
Фторхинолоны	<i>gyrA</i>	Ala90Val, Asp94Gly, Asp94Tyr, Asp94Ala
	<i>gyrB</i>	Ser447Phe, Asp461His, Asn499Asp, Glu501Asp

Филогенетические построения (глава 7) профилей МБТ, полученных от больных из контрастных по возрасту групп больных ТБ, осуществляли по профилям штаммов по MIRU-VNTR (24 локусам), которые с помощью программы MS Excel 2007 были перекодированы в бинарный формат и использовались для построения NJ древа программами Ugene (Okonechnikov K. et al., 2012) и FigTree (Morariu V. et al., 2008). Матрица генетических дистанций между исследуемыми и референсными профилями получена с помощью пакета программ сайта MIRUVNTRplus. Построение первичного UPGMA древа, анализ его методом наименьших квадратов (least squares) и построение временного древа (timetree) проведено программой MEGA 6.06. (Tamura K. et al., 2013) для реконструкции периодов возникновения штаммов генотипа S.

Для численной оценки вариабельности генетических локусов вычисляли индекс аллельного полиморфизма (h) по следующей формуле:

$$h = 1 - \sum x_i^2 \left(\frac{n_i}{n_i - 1} \right)$$

где x_i – частота встречаемости аллеля i в локусе, n – число штаммов, имеющих аллельный вариант i . На основании этих данных MIRU локусы были разделены на

группы с низкой (менее 0,3), средней (от 0,3 до 0,6) и высокой вариабельностью по величине индекса.

Для оценки разрешающей способности метода MIRU-VNTR-типирования рассчитывали индекс Хантера-Гастона (*HGDI*) (Hunter P., Gaston M., 1988), который вычисляется по следующей формуле:

$$HGDI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1),$$

где S – число 24-MIRU-VNTR-профилей, на которое используемый метод делит всю выборку штаммов, n_j – число штаммов с j -м профилем, N – общее число исследованных штаммов.

Статистические методы

Статистическая обработка данных проведена в редакторе электронных таблиц MS Office 2007 Excel 2007.12.0 и с помощью пакета статистических программ «Statistica for Windows» (версия 6.0) в соответствии с рекомендациями, изложенными в руководствах (Боровиков В.П., 1997; Петри А., 2009). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Первичные данные представлены в виде абсолютных (n) и относительных величин с доверительными интервалами (P , [ДИ_{0,95}]). Доверительный интервал не рассчитывали при $30\% > P > 70\%$. В таких случаях для вариационных рядов вычисляли медиану (Me) и вариацию минимально–максимальных значений показателей (Min – Max).

Статистическая значимость различий качественных признаков оценена по критерию χ^2 и его модификации -поправки Йетса при $P_{\text{абс}} < 10$; Возрастно-половые различия в группах определяли по критерию Манна-Уитни. При расчете характеристик метода выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing *M. tuberculosis* (специфичность, чувствительность и точность), а также для

оценки доли совпадений результатов вычисляли 95% доверительный интервал ($ДИ_{0,95}$).

Сравнение частот встречаемости признака в когортных исследованиях рассчитали относительный риск и доверительные интервалы к нему (ОР, $[ДИ_{0,95}]$), в исследованиях «случай–контроль» определяли отношение шансов и доверительные интервалы к нему (ОШ $[ДИ_{0,95}]$).

Темп прироста при оценке линейной тенденции динамики эпидемиологических показателей рассчитан по выровненным данным с использованием метода наименьших квадратов. Проверку моделей тренда на соответствие исходным данным проводили по коэффициенту достоверности аппроксимации (R^2), при его значениях в диапазоне 0,7–1,0 степень соответствия модели расценивали как приемлемая.

ГЛАВА 3 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МНОГОЛЕТНЕЙ ДИНАМИКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ТУБЕРКУЛЕЗА НА ИЗУЧАЕМЫХ ТЕРРИТОРИЯХ СЕВЕРНОЙ АЗИИ

3.1 Анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в изучаемом регионе Северной Азии

Изучаемые регионы Североазиатской части России относятся к эпидемиологически неблагополучным территориям по туберкулезу. Оценка заболеваемости ТБ по федеральным округам России свидетельствует о значимом ее увеличении в направлении с запада на восток. Отмечается более позднее начало снижения заболеваемости в азиатской части России, старт которого приходится на 2011 год, а в европейском регионе – на 2009 год (Таблица 3.1). Кроме того, в изучаемых регионах - Сибирском и Дальневосточном ФО проявлены наименьшие темпы отрицательного прироста уровней заболеваемости (Таблица 3.2).

Таблица 3.1

Показатели, характеризующие многолетнюю динамику эпидемического процесса ТБ в РФ и в её федеральных административных округах за 2002 – 2015 гг.

Территория	Показатели многолетней динамики эпидемического процесса туберкулеза											
	Заболеваемость				Распространенность т				Смертность			
	Me (⁰ /0000)	± m (⁰ /0000)	Темпы прироста (%)	P*	Me (⁰ /0000)	± m (⁰ /0000)	Темпы прироста (%)	P*	Me (⁰ /0000)	± m (⁰ /0000)	Темпы прироста (%)	P*
РФ	71,9	2,5	-3,5	< 0,01	172,8	8,0	-5,0	< 0,01	15,2	1,5	-9,8	< 0,01
ЦФО	50,9	1,3	-4,8	< 0,01	108,6	7,8	-8,0	< 0,01	9,5	1,2	-7,3	< 0,01
СЗФО	54,9	2,5	-3,9	< 0,01	114,5	6,7	-6,3	< 0,01	11,9	1,4	13,1	< 0,01
ЮФО	66,6	2,2	-2,2	< 0,05	204,0	8,2	6,4	< 0,01	16,5	1,3	-7,0	< 0,01
СКФО	44,9	2,9	-6,9	< 0,01	160,9	12,9	-7,3	< 0,01	7,3	1,0	10,3	< 0,01
ПФО	66,7	2,1	-2,9	< 0,01	156,6	6,2	-4,3	< 0,01	13,0	1,2	-9,1	< 0,01
УФО	87,6	3	-2,6	< 0,05	213,3	8,3	-3,2	< 0,01	18,4	1,5	-8,1	< 0,01
СФО	116,7	3,6	-3	< 0,01	274,7	10,2	-3,6	< 0,01	26,1	1,8	-7,7	< 0,01
ДФО	124,2	3,1	-2,6	< 0,05	286,4	6,2	-1,5	< 0,05	24,4	1,6	+4,2	< 0,01
КФО	68,5	0,4	-4,2	< 0,01	130,0	0,2	3,5	< 0,01	16,3	1,1	14,4	< 0,01

*- уровень значимости

Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом в Российской Федерации по федеральным округам за 2002-2015 гг.

Территория	Средняя Me(⁰ /0000)	Ошибка, m (⁰ /0000)	Средний темп прироста (%)
Северо-Кавказский ФО	49,0	7,9	-10,3
Центральный ФО	56,1	8,7	-3,7
Северо-западный ФО	59,4	7,0	-2,9
Приволжский ФО	71,7	7,2	-2,5
Южный ФО	73,8	7,2	-2,1
Уральский ФО	96,2	10,3	-2,4
Сибирский ФО	122,6	11,3	-2,0
Дальневосточный ФО	128,0	12,2	-0,6
Российская Федерация	77,8	9,0	-2,7

Сопоставление показателей, характеризующих динамику эпидемического процесса ТБ (Таблица 3.3), показывает, что заболеваемость и распространенность на азиатской территории России значимо ($p < 0,01$) превышали уровни европейской части. В азиатском регионе РФ обнаружено превышение в два и более раза (заболеваемость в 1,93; распространенность в 2,01 и смертность в 2,12). Кроме того, несмотря на то, что все сравниваемые показатели имели значимые ($p < 0,01$) тенденции к снижению, в тоже время показатели отрицательного прироста заболеваемости, распространенности и смертности в азиатской части России были более медленными по сравнению с территориями, расположенными в европейской части РФ (см. Таблица 3.3).

Показатели заболеваемости, распространенности и смертности от ТБ в европейском и азиатском регионах Российской Федерации за 2005 – 2015 гг.

Показатели	Me (⁰ /0000)	± m (⁰ /0000)	Темпы прироста(%)	р
Заболеваемость				
Российская федерация в целом	71,9	2,5	-3,5	< 0,01
Российская федерация без ЮФО, СКФО, КФО	74,8	2,6	-3,8	< 0,01
Европейская часть Российской Федерации без ЮФО, СКФО, КФО	62,5	2,4	-4,0	< 0,01
Азиатская часть Российской Федерации	119,6	3,5	-3,1	< 0,01
Распространенность				
Российская Федерация в целом	172,8	8,0	-5,0	< 0,01
Российская федерация без ЮФО, СКФО, КФО	168,5	7,8	-4,8	< 0,01
Европейская часть Российской Федерации без ЮФО, СКФО, КФО	138,4	7,3	-5,7	< 0,01
Азиатская часть Российской Федерации	277,5	9,2	-3,0	< 0,01
Смертность				
Российская Федерация в целом	15,2	1,5	-9,8	< 0,01
Российская федерация без ЮФО, СКФО, КФО	15,1	1,5	-10,0	< 0,01
Европейская часть Российской Федерации без ЮФО, СКФО, КФО	12,1	1,2	-10,9	< 0,01
Азиатская часть Российской Федерации	25,7	2,2	-7,5	< 0,01

3.2 Анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в изучаемых регионах Сибирского федерального округа

Иркутская область стабильно занимает одно из ведущих мест в первенстве по заболеваемости и распространенности ТБ в Сибирском федеральном округе и Сравнительный анализ статистических данных, характеризующих динамику эпидемического процесса туберкулёза на отдельных территориях СФО, свидетельствуют о значительном резервуаре инфекции в Иркутской области, проявляющемся в сохранении уровней заболеваемости и распространенности, несмотря на устойчивую тенденцию снижения показателей (Приложение, Таблица 3.4 и 3.5). Бурятия характеризуется также высокой активностью эпидемического процесса ТБ с выраженными тенденциями к спаду. Заболеваемость ($136,9 \pm 7,5 \text{ ‰}$) превышая региональный уровень СФО ($109,7 \pm 2,1 \text{ ‰}$), имеет выраженный тренд к уменьшению (см. Таблица 3.4). Распространенность туберкулеза в Бурятии ($285,9 \pm 26,1 \text{ ‰}$) удерживается на среднем уровне региона СФО ($296,8 \pm 13,7 \text{ ‰}$), но также значимо снижается (см. Таблица 3.5.).

В Забайкальском крае, в состав которого входит Агинский автономный округ эпидемиологическая ситуация определяется как благополучная по отношению к другим регионам СФО (см. Рисунок 3.1). В Забайкалье уровни заболеваемости ($98,6 \pm 4,3 \text{ ‰}$), распространенности ($218,8 \pm 4,3 \text{ ‰}$), и смертности ($19,6 \pm 1,5 \text{ ‰}$) превышают только показатели Томской области – наиболее благополучной территории СФО, а заболеваемость детей до 14 лет ($13,8 \pm 0,8 \text{ ‰}$) – самая низкая в федеральном округе. Эти данные, наряду с устойчивой тенденцией к снижению всех показателей за период 2002-2015 гг. свидетельствуют об улучшении эпидемиологической ситуации по ТБ на изучаемой территории (см. Таблица 3.4. и 3.5.).

Многолетняя динамика заболеваемости ТБ в ранжированном ряду
административных территорий СФО за 2002-2015 гг.

Территория	Me (⁰ /0000)	m(⁰ /0000)	Амплитуда (M _{max} - M _{min})	T _{np} (%)	Тенденция, p
Томская область	89,8	5,0	51,5	-4,0	<0,01
Забайкальский край	98,6	4,3	54,7	-4,2	<0,05
Красноярский край	100,8	1,7	21,1	-1,6	<0,01
Республика Хакасия	105,9	7,3	79,8	-6,1	<0,01
Республика Алтай	108,0	6,5	76,3	-5,9	>0,05
Омская область	110,2	4,5	48,6	-3,7	<0,01
Алтайский край	126,7	3,7	38,7	-3,0	<0,01
Новосибирская область	127,7	3,5	36,8	-2,8	<0,01
Кемеровская область	134,0	4,3	48,7	-3,7	<0,01
Иркутская область	132,2	2,9	33,3	-2,6	<0,05
Республика Бурятия	136,9	7,5	85,4	-6,6	<0,05
Республика Тыва	228,9	9,9	130,2	-10,0	<0,01

Многолетняя динамика распространенности ТБ в ранжированном ряду
административных территорий СФО за 2002-2015 гг.

Территория	Me (⁰ /0000)	m(⁰ /0000)	Амплитуда (M _{max} - M _{min})	T _{пр} (%)	Тенденция, p
Томская область	148,0	14,7	154,3	-11,9	<0,01
Забайкальский край	218,8	13,4	163,9	-12,6	<0,01
Красноярский край	265,3	14,8	189,9	-14,6	<0,05
Новосибирская область	275,8	16,3	195,4	-15,0	<0,01
Омская область	296,5	18,4	220,1	-16,9	<0,01
Республика Бурятия	285,9	26,1	320,0	-24,6	<0,01
Кемеровская область	289,3	18,2	205,0	-15,8	<0,01
Республика Хакасия	289,8	22,5	265,6	-20,4	<0,01
Республика Алтай	292,7	14,1	182,4	-14,0	>0,05
Алтайский край	337,0	11,9	148,0	-11,4	<0,05
Иркутская область	375,1	9,4	130,8	-10,1	>0,05
Республика Тыва	733,0	39,2	493,4	-38,0	>0,05

Расчет интегрального показателя по «сумме занятых мест» на основе среднемноголетних данных заболеваемости, распространенности смертности от ТБ

среди общего населения по регионам СФО позволяет охарактеризовать ситуацию в Иркутской области, как крайне неблагоприятную по сравнению с другими территориями ФО, за исключением лидера – республики Тыва. Интегральная оценка по показателям заболеваемости, распространенности, смертности среди общего населения, свидетельствует, что Бурятия представляет также высокие уровни динамики эпидемического процесса ТБ в СФО (Рисунок 3.1).

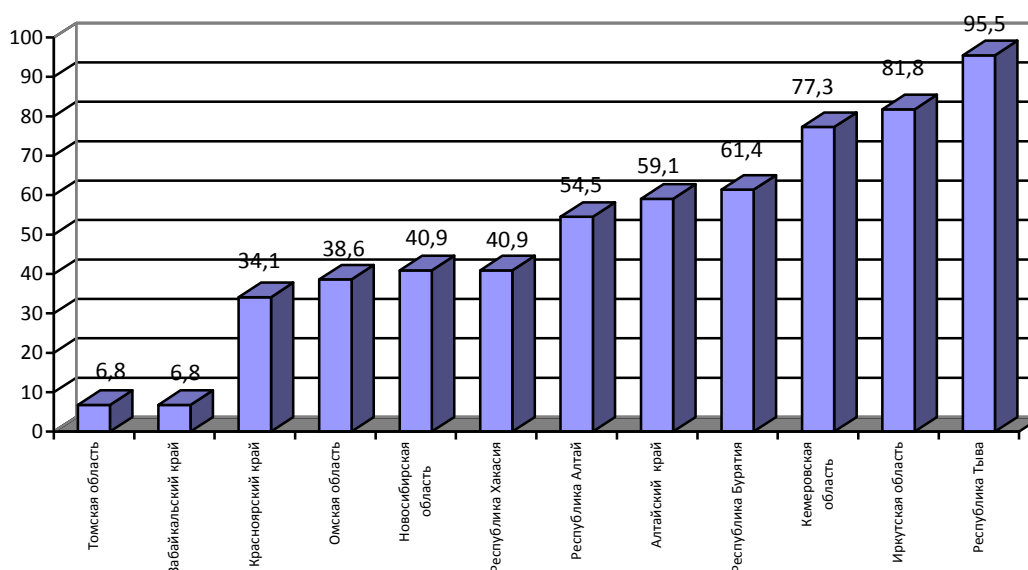


Рисунок 3.1 Оценка эпидемиологической ситуации по ТБ на отдельных территориях СФО за период 2002–2014 гг. по интегральному показателю, выраженному в коэффициентах наглядности (%).

Кроме того, в Иркутской области широкомасштабно развивается эпидемия ВИЧ-инфекции, обеспечивающая немалый вклад в заболеваемость ТБ (Туберкулез в Российской Федерации., 2015). Наряду с вышеуказанными проявлениями эпидемиологического неблагополучия по ТБ, Иркутская область является территорией с активными миграционными процессами на протяжении всего периода существования Российской империи, СССР и последующего периода развития Российской Федерации. Именно поэтому этот регион использован в качестве модели, на которой отслежены основные динамические изменения

популяции возбудителя ТБ по следам прежних экспансий и установлены основные тенденции распространения его «современных» вариантов.

3.3. Анализ эпидемиологической ситуации по туберкулезу в изучаемом регионе Дальневосточного федерального округа

Во всех регионах Крайнего Севера, в том числе и на территории России, в республике Саха (Якутия) туберкулез, по-прежнему, остается одним из наиболее распространенных инфекционных заболеваний. В 2015 году в Республике Саха (Якутия) показатель заболеваемости туберкулезом составил 69,7 на 100 тысяч населения, что на 17% больше, чем аналогичный показатель заболеваемости в среднем по РФ (Ситуация по туберкулезу в России в 2015 году..). Оценка динамики заболеваемости и распространенности ТБ по их средним величинам (Медиане), среднему темпу прироста за изучаемый период позволила получить комплексную оценку этих эпидемиологических показателей и в сравнительном плане охарактеризовать изучаемую территорию.

Использование интегральной оценки для вышеуказанных показателей позволило выявить, что Саха (Якутия) помимо невысоких уровней интенсивности эпидемического процесса ТБ ($Me = 78,6^{0/0000}$), имеет минимальный размах многолетних колебаний ($23,16^{0/0000}$), и на этом фоне отличается среди других территорий ДФО значимым снижением заболеваемости (средний темп прироста = -2,2 % в год) за период с 2002 по 2015 гг. и наиболее благоприятными тенденциями сокращения резервуара инфекции (Таблица 3.6 и 3.7). Анализ представленных в таблице 3.6 свидетельствует, что темпы снижения заболеваемости туберкулезом в Саха Якутии уступают только Амурской области. Еще одним надежным показателем, характеризующим эпидемиологическую ситуацию по ТБ, является смертность от этого заболевания, многолетние данные которого в Саха (Якутии) ($8,4 \pm 0,5^{0/000}$) ниже, чем в России ($17,2 \pm 1,0^{0/000}$) и ДФО ($26,4 \pm 1,4^{0/000}$). Это объективно отражает эффективность работы противотуберкулезной службы по

оказанию специализированной медицинской помощи населению, что в конечном счете, способствует повышению контроля эпидемиологической ситуации. В Саха (Якутии) в сравнении с изучаемыми территориями СФО - Иркутской областью и Республикой Бурятия наблюдается значимо более низкие среднегодовые показатели заболеваемости и распространенности туберкулеза (критерий t для относительных величин, $p < 0,01$).

Таблица 3.6

Многолетняя динамика заболеваемости ТБ в ранжированном ряду административных территорий ДФО за 2002-2015 гг.

Территория	Me (⁰ /0000)	M (⁰ /0000)	Амплитуда (M _{max} - M _{min})	T _{пр} (%)	K _н (%)	Тенденция	Ранг	
							M	K _н
Магаданская область	76,0	2,1	25,0	-0,9	12,5	>0,05	1	2
Саха (Якутия)	78,6	1,9	23,1	-2,2	6,3	<0,01	2	1
Камчатский край	87,8	2,3	27,3	0,1	37,5	>0,05	3	3
Сахалинская область	93,3	3,6	43,0	-0,5	46,9	>0,05	4	5
Чукотский АО	93,6	6,9	82,5	11,0	87,5	<0,01	5	8
Хабаровский край	125,5	3,1	37,4	-0,7	43,8	>0,05	6	4
Амурская область	134,9	6,3	76,0	-3,8	59,4	<0,01	7	6
Еврейская АО	166,1	4,8	58,1	-,03	68,8	>0,05	8	7
Приморский край	166,3	6,2	74,8	0,1	87,5	>0,05	9	9

Многолетняя динамика распространенности ТБ в ранжированном ряду административных территорий ДФО за 2002-2015 гг.

Территория	Me (⁰ /0000)	m(⁰ /0000)	Амплитуда (M _{max} - M _{min})	T _{пр} (%)	K _н (%)	Тенденция	Ранг	
							М	K _н
Республика Саха (Якутия)	202,5	7,2	86,1	-3,2	9,4	>0,05	1	1
Магаданская область	211,7	15,1	181	-6,8	40,6	>0,05	2	3
Камчатский край	231,6	9,4	113,3	-2,2	31,3	<0,01	3	2
Чукотский АО	253,7	11	132,4	2,8	53,1	>0,05	4	6
Хабаровский край	259,6	14,7	176,3	-4,6	43,8	>0,05	5	4
Сахалинская область	335,2	9,5	113,7	-2,1	43,8	<0,01	6	5
Приморский край	346,3	14,8	177,1	-2,0	68,8	>0,05	7	7
Еврейская АО	420,6	20	240,4	-3,2	78,1	>0,05	8	8
Амурская область	435,4	24,3	291,8	-4,6	81,3	<0,01	9	9

Таким образом, проводимый в рамках настоящего исследования эпидемиологический мониторинг охватывает регионы, включающие весь диапазон колебаний эпидемического процесса ТБ в Азиатской части России – относительно благополучных территорий (Забайкальский край), регионов типичной

эпидемиологической ситуации (Республики Саха (Якутия) до крайне неблагоприятных (Иркутская область и Республика Бурятия).

ГЛАВА 4. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПОПУЛЯЦИИ *M. TUBERCULOSIS* В СЕВЕРНОЙ АЗИИ

4.1. Общая характеристика гетерогенности популяции *M. tuberculosis*

Эпидемиологический мониторинг штаммов МБТ на территории Иркутской области, Республик Бурятия и Саха (Якутия) в течение пятилетнего периода позволил охарактеризовать спектр циркулирующей популяции возбудителя ТБ. Общая структура популяции МБТ на отдельных территориях Северной Азии оценена по результатам генотипирования выборки из 1463 штаммов, полученных за 2010-2015 годы наблюдения (абсолютные данные представлены в Приложении, Таблица 1). В целом две трети (907/1463 – 62,0%) коллекции составили представители генотипа Beijing (Таблица 4.1). При этом выявлена широкая вариация этого показателя на изучаемых территориях. Распространение штаммов генотипа Beijing в Саха (Якутии) (162/377 – 43,0%) носило менее выраженный характер, чем в остальных анализируемых регионах, и особенно по сравнению с Иркутской областью (509/719 – 70,8%) ($\chi^2=79,47$ $p<0,01$). Структура nonBeijing коллекции составлена из генотипов LAM (172/1463 – 11,8%), T (104/1463-7,1%), Ural (77/1463 – 5,3%), S (61/1463 – 4,2%), Haarlem (36/1463- 2,5%), H (21/1463 – 1,4%), X (16/1463 – 1,1%) и Uganda (13/1463 – 0,9%). Микст генотипы встречались в 2,3% случаев (33/1463). Не удалось классифицировать используемыми методами 1,7 % (25/1463) штаммов.

Генотипы МБТ, выделенных от больных ТБ на территориях Северной Азии (%)

Генотип/ Регион изучения	Саха (Якутия)	Иркутская область	Бурятия	Забайкальский край (Агинский АО)	Всего	P
Beijing	43,0	70,8	64,5	62,1	62,0	*P<0,01
H	1,3	1,4	1,8	0,0	1,4	**P<0,01
LAM	8,8	11,3	16,9	3,4	11,8	*P<0,01
T	13,3	4,7	3,8	24,1	7,1	P>0,05
S	13,5	0,7	1,2	3,4	4,2	*P<0,01
Haarlem	7,2	0,6	1,5	0,0	2,5	*P<0,01
X	1,6	1,1	0,6	0,0	1,1	P>0,05
Ural	6,9	3,6	7,4	0,0	5,3	P>0,05
Uganda	2,4	0,4	0,3	0,0	0,9	P>0,05
orphan	1,9	1,9	0,6	6,9	1,7	P>0,05
Mix генотипы	0,3	3,5	1,5	0,0	2,1	P>0,05
Итого, штаммов	377	719	338	29	1463	

* - Значимые P, полученные с использование критерия взаимной сопряженности χ^2 при сравнении абсолютных показателей распределения генотипов МБТ из Саха (Якутии) и других территорий изучения.

** - Значимые P, полученные с использование критерия взаимной сопряженности χ^2 при сравнении абсолютных показателей распределения генотипов МБТ из Бурятии и других территорий изучения

Частоты встречаемости non-Beijing генотипов также имели отличия по отдельным территориям изучения. Генотипы T, S и Haarlem присутствовали значительно чаще в Саха (Якутии), чем в Иркутской области и Бурятии (см. Таблица 4.1). При этом более низкий уровень генотипов T, S и Haarlem, который не отличался в Иркутской области и Бурятии, отражал общий характер этих минорных генотипов, описываемый в других регионах Северной Азии (Норкина О. и др., 2003; Думова М. et al., 2011; Умпелева Т. и др., 2013) и Европейской части России

(Балабанова Я. и др., 2006; Медведева Т. и др., 2007; Татьков С. и др., 2008; Вязовая А. и др., 2012; Концевая И. и др., 2014; Toungousova O. et al., 2003; 2011; Shemyakin I. et al., 2004). Еще одним отличием стали более высокие уровни генотипа LAM в Бурятии ($\chi^2=11,81$ $p<0,01$), нашедшие объяснения в особенностях выборки штаммов от больных ТБ из пенитенциарной системы, где обнаруживается более высокая доля этого генотипа не только на изучаемой территории, но и других регионах России (Drobniewski F. et al., 2003; Mokrousov I. al., 2009; Afanas'ev M. et al., 2011). Остальные минорные генотипы МБТ имели близкие частоты обнаружения.

Кроме вариабельного характера частоты встречаемости штаммов генотипа Beijing было обнаружено широкое разнообразие, для описания и установления географического распространения которого была использована классификация, представленная в SITVIT. Глобальная база SITVIT составлена на основе результатов генотипирования различными методами, в том числе более двух тысяч паттернов 12 локусов MIRU-VNTR и данных более семи тысяч профилей сполиготипирования. Сгруппированные по MIT - MIRU международному типу профили штаммов МБТ представлены в Таблице 4.2. и Приложении, Таблице 2. Нами было определено 39 вариантов Beijing, которые распределились следующим образом. Как видно из таблицы доминирующими среди Beijing на всех территориях изучения, за исключением Агинского АО, были штаммы с профилем MIT 16 (335/907 -37,0%), ранее описываемые как M2 (Mokrousov I., 2008), обнаруживаемые во всех регионах России и других точках Евразии, где проводились молекулярно-эпидемиологические исследования популяции МБТ. Оказалось, что частота обнаружения MIT 16 среди Beijing не различалась в Иркутской области (40,9% - 208/509) и Саха (Якутии) (45,7% - 74/162), но была значительно ниже в Бурятии (24,5% - 53/217), ($\chi^2=22,50$ $P<0,01$). Второе место по значимости были изоляты с профилями MIT 17 (253/905 -17,3%) – M11 (Mokrousov I., 2008), также распространенные в России. Доля штаммов этого субтипа варьировала без значимых различий на уровне 24,5-30,1% ($\chi^2=2,29$ $P>0,05$).

Субтипы Beijing, определяемые по SITVIT, на изучаемых территориях Северной Азии (%)

Генотип/ Регион изучения	Саха (Якутия)	Иркутская область	Бурятия	Забайкальский край (Агинский АО)	Всего
Beijing MIT 16	45,7	40,9	24,5	-	37,0
Beijing MIT 17	29,0	30,1	24,5	-	28,0
Beijing MIT 82	-	-	0,9	-	0,2
Beijing MIT 83	-	4,1	0,5	-	2,4
Beijing MIT 84	3,7	1,0	-	-	1,2
Beijing MIT 85	0,6	-	-	-	0,1
Beijing MIT 86	-	0,4	0,9	22,2	0,9
Beijing MIT 87	-	-	0,5	-	0,1
Beijing MIT 91	-	0,2	-	-	0,1
Beijing MIT 93	-	-	0,5	-	0,1
Beijing MIT 94	-	1,6	-	-	0,9
Beijing MIT 95	-	0,4	-	-	0,2
Beijing MIT 97	-	0,2	0,5	-	0,2
Beijing MIT 99	-	0,4	-	-	0,2
Beijing MIT 101	0,6	-	-	-	0,1
Beijing MIT 104	0,6	-	-	-	0,1
Beijing MIT 105	0,6	-	-	-	0,1
Beijing MIT 121	-	0,2	0,5	-	0,2
Beijing MIT 123	-	0,6	0,5	-	0,4
Beijing MIT 135	0,6	0,4	0,9	-	0,6
Beijing MIT 136	-	0,2	-	-	0,1
Beijing MIT 137	1,2	2,4	5,1	-	2,8
Beijing MIT 138	-	2,4	-	-	1,3
Beijing MIT 172	-	0,2	-	-	0,1
Beijing MIT 196	-	0,6	-	-	0,3
Beijing MIT 203	1,2	1,6	0,5	-	1,2
Beijing MIT 245	-	-	0,5	-	0,1
Beijing MIT 364	-	0,6	-	-	0,3
Beijing MIT 438	-	0,2	-	-	0,1
Beijing MIT 465	-	0,2	-	-	0,1
Beijing MIT 499	-	0,2	-	-	0,1
Beijing MIT 571	0,6	0,6	2,3	-	1,0
Beijing MIT 592	6,2	0,2	4,2	33,3	2,9
Beijing MIT 642	-	1,6	24,1	27,8	7,2
Beijing MIT 706	1,2	-	-	-	0,2
Beijing MIT 707	-	0,2	0,5	-	0,2
Beijing MIT 721	-	0,4	0,9	-	0,4
Beijing MIT 1012	-	1,6	-	-	0,9
Beijing MIT orphan	8,0	6,7	7,9	16,7	7,4
Beijing, abc.	162	509	216	18	905

Особый интерес представляет в исследуемой выборке генотип Beijing 642 (65/905- 7,2%), который можно рассматривать как «эндемичный» генотип, т.е. имеющий эпидемическое распространение на ограниченной территории, в данном случае на территории Бурятии и Агинского АО, потому как в других регионах Северной Азии, в том числе изучаемых нами, встречался в единичных количествах.

Неравномерно по территориям распределены и единичные изоляты Beijing с различными MIT. Если штаммы Beijing MIT 135, 137, 203, 571, 592 и ряд уникальных неклассифицированных штаммов (Orphan) были во всех регионах, то Beijing MIT 85, 101, 104, 105, 706 встречались только в Саха (Якутии), Beijing MIT 91, 364, 438, 465, 499 – в Иркутской области, Beijing MIT 87 в Бурятии. Общность минорных субтипов Beijing может свидетельствовать об их единой циркуляции в пределах всего региона изучения, а обнаружение единичных штаммов – о возможных заносах МБТ из других ареалов.

Анализ данных глобальной базы SITVIT показывает, что общие минорные субтипы Beijing обнаруживались как в других регионах как России, так и Юго-Восточной Азии, а также в Европейских странах, на Североамериканском и Австралийском континентах. Такое широкое распространение описанных выше субтипов Beijing за пределы Евразии в большинстве случаев связывают с волнами миграции из Юго-Восточной Азии (Bifani P. et al., 2002; Gilpin C. et al., 2008; Mokrousov I., 2015). Аналогичное сопоставление данных базы SITVIT со структурой единичных штаммов Beijing из Иркутской области раскрывает их сходство с российскими находками из Европейской и Уральской части страны и аналогичными образцами из Японии, Сингапура и стран ЕЭС. Напротив изоляты из Саха (Якутии) не были представлены в SITVIT российскими данными, а часто обнаруживались в коллекциях из других Юго-Восточных стран и реже в Европе, Америке и Южной Африке. Этот факт, как и иная, чем в Иркутской области и Бурятии, структура циркулирующей популяции МБТ, может свидетельствовать об уникальности истории возбудителя туберкулеза в Саха (Якутии).

Дальнейший клинико-эпидемиологический анализ показал, что генотипическая структура выборки МБТ неравномерна у больных с разными формами течения

туберкулеза (Таблица 4.3). Выявлено преобладание штаммов генотипа Beijing у пациентов с повторными эпизодами лечения ТБ, по сравнению с новыми случаями развития инфекции или ее рецидивами ($\chi^2=9,01$ $P<0,01$).

Таблица 4.3

Структура генотипов МБТ, выделенных от больных с разными формами течения ТБ на территориях Северной Азии (%)

Генотип/ группы больных	Общая выборка	Впервые выявленные случаи	Хроническое течение	Рецидив	P
Beijing	62,0	59,4	67,9	61,8	*P<0,01
Beijing MIT 16	22,9	23,9	20,4	26,5	*P<0,01
Beijing MIT 17	17,3	14,5	23,5	17,6	*P<0,01
Beijing MIT 642	4,4	3,4	7,0	0,0	P=0,49
LAM	11,8	11,6	12,2	11,8	P=0,55
T	7,1	8,8	3,6	2,9	*P<0,01
Ural	5,3	5,2	5,4	5,9	P=0,97
S	4,2	4,0	4,3	8,8	P=0,37
Haarlem	2,5	3,3	0,5	2,9	*P<0,01
H	1,4	1,7	0,9	0,0	P=0,41
X	1,1	1,3	0,7	0,0	P=0,47
Uganda	0,9	0,9	0,7	2,9	P=0,39
orphan	1,7	2,0	0,9	2,9	P=0,27
Mix генотипы	2,1	1,8	2,9	0,0	P=0,57
Итого, штаммов	1463	987	442	34	

* - Значимые P, полученные с использованием критерия взаимной сопряженности χ^2 при попарном сравнении абсолютных показателей распределения генотипов МБТ у впервые выявленных больных ТБ по сравнению со случаями хронического течения и рецидивов.

В то же время у впервые выявленных пациентов с ТБ была выше частота встречаемости генотипов T ($\chi^2=10,22$ $P<0,01$) и Haarlem ($\chi^2=10,66$ $P<0,01$).

Неравномерное распределение штаммов генотипа Beijing нашло объяснение в перераспределении доминирующих субтипов, определенных в рамках классификации SITVIT (Приложение, Таблица 3 и см. Таблица 4.3). На фоне высоких уровней частоты впервые выявленных случаев исключительно за счет Beijing MIT16 ($\chi^2=9,31$ $P<0,01$), хронические случаи, вызванные генотипом Beijing, перевешивали в общей структуре преобладанием второго по значимости субтипа - Beijing MIT17 ($\chi^2=10,40$; $p<0,01$) и MIT642 ($\chi^2=5,99$; $P=0,049$).

При рассмотрении генотипической структуры МБТ по территориям изучения оказалось, что Beijing MIT16 обеспечивает существенно большее количество впервые выявленных случаев ТБ (22,6% - 70/310), чем повторных эпизодов лечения (7,0% - 4/310) только в Саха (Якутии) ($\chi^2=15,85$; $P<0,01$). Такого значимого увеличения пропорции впервые выявленных случаев с Beijing MIT16 не наблюдалось в Иркутской области ($\chi^2=2,41$; $P=0,30$) и Бурятии ($\chi^2=2,33$ $P=0,31$). Также отмечено менее выраженным увеличение доли Beijing MIT17 в Иркутской области среди больных с хроническим течением ТБ ($\chi^2=4,79$; $P=0,09$). Однако установленный на общей выборке факт высокого уровня Beijing MIT17 ярко выражен у больных хроническим ТБ в Саха (Якутии) ($\chi^2=21,46$; $P<0,01$) и Бурятии ($\chi^2=6,03$; $P=0,048$).

Отличительной особенностью Саха (Якутии) стало обнаружение значительной частоты генотипа S среди больных с хроническим течением (29,8% - 17/57) и рецидивами ТБ (20% - 2/10) по сравнению с новыми случаями клинического развития инфекции (10,3% - 32/310) ($\chi^2=16,02$; $P<0,01$). Но характеристика течения ТБ у пациентов с ТБ, пораженных МБТ генотипа S, в единичных случаях выявленная в Иркутской области, Бурятии и Агинском АО, не обнаружила подобной картины, как и с генотипами T и Haarlem (Таблица 4.4). При отдельном рассмотрении частот Beijing MIT642 в Бурятии (28/120 – 23,3%) и Агинском АО (3/17) у хронических больных ТБ и рецидивами превышение их доли по сравнению с впервые выявленными также нивелировано ($\chi^2=5,11$; $P=0,07$).

Распределение генотипов МБТ, выделенных от больных с разными формами течения ТБ на территориях изучения (%)

Регион изучения/ Генотип	Beijing	LAM	H	T	S	Haarlem	X	Ural	Uganda	Orphan	mix	Итого, штаммов
Саха (Якутия)	43,0	8,8	1,3	13,3	13,5	7,2	1,6	6,9	2,4	1,9	0,3	377
Впервые выявленные	42,6	9,7	1,6	14,8	10,3	8,1	1,6	6,8	2,3	1,9	0,3	310
Хроническое течение	45,6	5,3	0,0	5,3	29,8	1,8	1,8	8,8	1,8	0,0	0,0	57
Рецидив	40,0	0,0	0,0	10,0	20,0	10,0	0,0	0,0	10,0	10,0	0,0	10
Иркутская область	70,8	11,3	1,4	4,7	0,7	0,6	1,1	3,6	0,4	1,9	3,5	719
Впервые выявленные	69,3	11,7	1,3	5,2	0,8	0,8	1,5	3,3	0,4	2,3	3,3	479
Хроническое течение	74,2	10,0	1,8	4,1	0,0	0,0	0,5	3,6	0,5	1,4	4,1	221
Рецидив	68,4	15,8	0,0	0,0	5,3	0,0	0,0	10,5	0,0	0,0	0,0	19
Бурятия	64,5	16,9	1,8	3,8	1,2	1,5	0,6	7,4	0,3	0,6	1,5	338
Впервые выявленные	62,4	15,1	3,2	5,9	1,6	2,2	0,5	7,5	0,0	1,1	0,5	186
Хроническое течение	66,7	19,0	0,0	1,4	0,7	0,7	0,7	7,5	0,7	0,0	2,7	147
Рецидив	80,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5
Забайкальский край (Агинский АО)	62,1	3,4	0,0	24,1	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	0,0	29
Впервые выявленные	50,0	0,0	0,0	41,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	12
Хроническое течение	70,6	5,9	0,0	11,8	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	5,9	0,0	17
Рецидив												0
Общая выборка	62,0	11,8	1,4	7,1	4,2	2,5	1,1	5,3	0,9	1,7	2,1	1463
Впервые выявленные	59,4	11,6	1,7	8,8	4,0	3,3	1,3	5,2	0,9	2,0	1,8	987
Хроническое течение	67,9	12,2	0,9	3,6	4,3	0,5	0,7	5,4	0,7	0,9	2,9	442
Рецидив	61,8	11,8	0,0	2,9	8,8	2,9	0,0	5,9	2,9	2,9	0,0	34

Таким образом, использование для эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя ТБ изучаемой территории Северной Азии данных 12 локусного MIRU-VNTR типирования и классификации по SITVIT дало возможность определить общие черты и характерные особенности отдельных регионов. Саха (Якутия) – уникальная территория, где уровень генотипа Beijing не превышал 43,0% с превалированием субтипа Beijing MIT16 у впервые выявленных случаев ТБ, а частоты штаммов генотипов S,T, Haarlem были выше, чем в остальных

исследуемых областях. Иркутская область отражает общие тенденции распространения современных российских вариантов МБТ на фоне высоких показателей распространенности доминирующих субтипов генотипа Beijing. В Бурятии снижение доли мажорных субтипов генотипа Beijing обусловлено присутствием уникальной группы штаммов MIT642, имеющих тенденцию к накоплению при хронизации ТБ. Выявление мажорных и минорных субтипов генотипа Beijing и сравнение их географического распространения с мировыми данными дает возможность построить гипотезы о путях трансмиссии доминирующих клонов в широком диапазоне расстояний Евразийского континента.

Дальнейший анализ генотипического разнообразия проведен на основе комплексного анализа данных 24 локусного MIRU-VNTR типирования, идентификации отдельных клонов генотипа Beijing и использования ряда классификаций с целью определения «эпидемических» вариантов возбудителя на изучаемых территориях.

В молекулярно-эпидемиологических исследованиях в России популяции МБТ штаммам генотипа LAM, отводят большое внимание, связанное с их широкой распространенностью, уступающей только генотипу Beijing. Генотип LAM в общей коллекции настоящего исследования присутствовал в близких по частоте обнаружения как у пациентов с первым эпизодом лечения (11,6% -114/987), так и у хронических больных (12,2% -53/442) и в случаях рецидивов (11,8% (4/34). Плотность циркуляции генотипа LAM не имела значимых различий у больных разных этнических групп ($\chi^2=0,007$ с поправкой Йетса; $p>0,05$). Такая сходность распределения штаммов генотипа LAM на фоне доминирования генотипа Beijing может отражать его давнюю циркуляцию на территории Северной Азии. Эта гипотеза основана на недавно проведенных исследованиях по восстановлению истории этого генотипа в России (Mokrousov I., et al., 2014). Генетическая группа LAM-RUS, которая наиболее вероятно возникла в Европейской части России, могла с волнами открытия Сибири получить распространение и в регионе Северной Азии. В качестве современного резервуара штаммов генотипа LAM принято считать пенитенциарную систему (Toungousova O.S., et al, 2003; Кузнецов С.И., и др., 2005;

Dubiley S., et al, 2010). При этом система УФСИН Бурятии, где были проведены выборочные исследования возбудителя ТБ у заключенных, является уникальной в том, что в ней отбывают заключение граждане, ранее проживавшие на всех исследуемых в настоящей работе территориях. Полученные нами данные свидетельствуют о выраженной связи популяций МБТ, циркулирующих среди больных из заключенных системы УФСИН и гражданского населения. Причем доля штаммов, отнесенных к LAM, была значимо выше среди больных с хроническими случаями туберкулеза ($\chi^2=35,3$; $p<0,001$).

Определенную долю в структуре популяции МБТ имели штаммы семейства S – 4,2% (61/1463) преимущественно за счет изолятов из Саха (Якутии) – 13,5% (51/377). Этот уникальный по величине и разнообразию кластер был выявлен у якутов, эвенков, эвенов и жителей славянской этнической группы без значимых различий по этническому признаку ($\chi^2=0,309$; $p>0,05$). Он содержал в большинстве случаев (74,5% - 38/51) идентичный MIRU-VNTR профиль - 233325153325141344222372 идентифицируемый по 12-ти локусам как MIT256. Подавляющее большинство штаммов семейства S были МЛУ (60,7% - 37/51), пять штаммов имели ШЛУ. Локальная распространенность S штаммов может быть связана с длительной циркуляцией в удаленных и малонаселенных регионах на Северо-востоке России. Частоты обнаружения штаммов этого генотипа в Иркутской области, Бурятии и Забайкальском крае находятся в пределах спорадических случаев выявления генотипа S в других регионах России. Вместе с тем, появление штаммов генотипа S только среди славянской этнической группы Бурятии и Иркутской области дает возможность предполагать наличие более частых и продолжительных контактов с жителями Саха (Якутии), чем среди бурят. Такое предположение согласуется с данными преобладания новых случаев туберкулеза, вызванного генотипом S в Иркутской области в молодом возрасте (средний возраст больных составил 34,3 года). В Саха (Якутии) группа штаммов, относящихся к семейству S, была выявлена среди больных с большей частотой среди пациентов с хроническими формами туберкулеза - 29,8% (17/57), чем среди впервые выявленных больных ТБ - 10,9% (32/310) и случаев рецидива - 20,0% (2/10) ($\chi^2=15,83$; $p<0,01$).

Штаммы семейства Ural представленные только в 5,3 % (77/1463) общей выборки, обнаружили широкое генетическое разнообразие на уровне 24 MIRU-VNTR локусов в виде 56 профилей (CR=0,22). В 22 случаях они по 12-локусному профилю соответствовали MIT171 по базе SITVIT, причем 14 из них были с идентичным 24-локусным профилем 227225113223353244423363. Также были выявлены паттерны, соответствующие MIT 197, 200, 354, 381, 647, 756, 976, и близкие к ним характеристики штаммов, не идентифицируемых SITVIT, но имеющие типичные черты для Ural по MIRU-VNTR (Медведева Т.В., и др., 2004). Более представительная группа семейства T (104/1463) также имела высоко вариабельные паттерны (CR=0,07). Только в 12 случаях они были сгруппированы в кластеры размером от двух до четырех штаммов, самый большой кластер давал MIRU-VNTR профиль 223125153324232224223352. Еще более гетерогенная группа профилей представляла семейство Haarlem (CR=0,05). Сюда вошли 36 штаммов с MIT 45,46,120,125,152,188, 740,781,1513 и девять - с Haarlem-подобными MIRU-VNTR профилями. Штаммы генотипа X отличались некластеризуемыми наборами данных 24 MIRU-VNTR локусов.

Таким образом, в настоящем исследовании была продемонстрирована эффективность комплексного применения трех молекулярно-эпидемиологических методов для определения структуры популяции МБТ, циркулирующей среди больных ТБ на значительной территории ранее малоисследованной Северной Азии. С помощью определения делеций RD регионах выявлено, что две трети штаммов исследуемой популяции принадлежат современному генотипу Beijing, который имеет большие вариационные колебания на изучаемой территории. Гетерогенность, описанная на основе результатов MIRU-VNTR типирования по 24-м локусам, обладает достаточной дискриминационной способностью, чтобы классифицировать штаммы по основным генетическим семействам МБТ. Это позволило представить характеристику основного резервуара инфекции – больных ТБ, у которых доминируют в основном два субтипа Beijing CC1 и CC2. Кроме того, определена роль отдельных клонов, получивших эндемичное распространение: Beijing BL7

(MIT 642) – в Бурятии и отдельных территориях Забайкальского края и клональная группа S генотипа – в Саха (Якутии).

1.2. Результаты эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в Иркутской области

По выборке из 719 образцов оценена популяционная структура *M. tuberculosis* и выявлены его эпидемически значимые варианты в Иркутской области. Классификация полученных паттернов MIRU-VNTR -24 осуществлялась в соответствии со стандартной номенклатурой MLVA MtbC 15-9, для штаммов Beijing проведена дополнительная группировка в соответствии с базой данных M. Merker et al. (2015), где уникальные паттерны этого генотипа, распределены по семи клональным комплексам.

Распределение основных генетических групп штаммов по MIRU-VNTR -24 отвечает описанной выше в разделе 4.1 когорте данным 12 локусного MIRU-VNTR типирования (см. Таблица 4.1). В настоящем разделе мы попытались соотнести различные классификационные позиции широко применяемых методов генетической идентификации МБТ и комплексно оценить доминирующую группу генотипа Beijing. Кластеризация общей выборки составила 0,56. Она была обусловлена наличием идентичных профилей MIRU-VNTR по 24 локусам за счет штаммов генотипа Beijing (CR=0,70), в основном его двух доминирующих субтипов (Таблица 4.5). Самые распространенные в выборке за пять лет динамического наблюдения в Иркутской области штаммы Beijing были уже сгруппированы в субтипы на основе 12 MIRU-VNTR локусов. Доминирующий субтип MIT16 (172/427), объединяющий идентичные по 12 локусам штаммы, в действительности является разнородной по набору из 24 MIRU-VNTR локусов группой.

Генотипы МБТ, выделенных от больных ТБ легких в Иркутской области

Генотип (субтип)/ Показатель	Число кластеров по 24 локусному профилю	Общее число кластеризованных изолятов	Частота кластеризации, CR	Штаммы с МЛУ, %
Beijing	27	324	0,70	41,5
Beijing MIT16	6	151	0,84	29,7
Beijing MIT17	4	115	0,82	58,2
Другие субтипы Beijing	17	58	0,34	39,3
T	1	3	0,08	24,0
Ural	1	2	0,05	3,0
LAM	7	18	0,19	36,2
H	-	-	-	33,3
X	-	-	-	16,7
Общий показатель	36	347	0,56	45,4

В представленной коллекции выявлено широкое разнообразие профилей MIRU-VNTR 24 штаммов, объединенных ранее по 12 локусам в субтип Beijing MIT 16. Описываемый субтип Beijing представлен штаммами с уникальными профилями и шестью кластерами, среди которых превалирует один наиболее крупный профиль 244233352644425153353823. Он присутствовал у 70,6% (122/172) штаммов Beijing MIT 16. Этот кластер в соответствии со стандартной номенклатурой MLVA MtbC 15-9 принадлежит известному профилю 99-32, циркулирующему в Евразии. На фоне высокого уровня кластеризации штаммов генотипа Beijing (0,70) подавляющее большинство идентичных изолятов соответствовало именно профилю 99-32.

По классификации M. Merker et al (2015) к группе Beijing CC1 были отнесены почти все MIT16 (167/172). Отнесенные к CC1 штаммы только в 13 случаях обнаружили специфические для B0/W148 инсерции инвертированной IS6110, в

остальных случаях (154/167) профили не имели этого генетического маркера, поэтому были причислены к nonB0/nonW148. На основе систематизации М. Merker (2015) к СС1 были также отнесены и ряд других минорных вариантов Beijing (Рисунок 4.1). В общей сложности в этот клональный комплекс вошли 199 штаммов. Вследствие того, что наиболее точная характеристика изолятов описываемого клонального комплекса Beijing получена на основе 24 MIRU-VNTR локусного типирования, то более корректно идентифицировать их как Beijing СС1, что и будет использовано ниже.

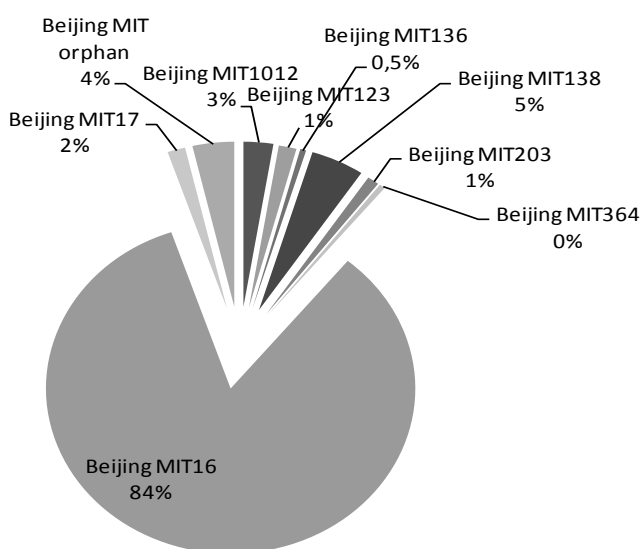


Рисунок 4.1 Состав клонального комплекса 1 (СС1) штаммов генотипа Beijing, сгруппированных по Merker М. (2015) и идентифицированных по профилям 12 локусного MIRU-VNTR типирования

Выделяя аналогичным образом другую распространенную в популяции МБТ Иркутской области группу штаммов, объединенную по 12 MIRU-VNTR локусам, субтип Beijing MIT 17, мы установили, что он представлял в основном варианты Beijing СС2 (113/135), также отвечающие классификации W148 по наличию специфической инвертированной инсерции IS 6110, за исключением только двух случаев несовпадения систематизации B0/W148 и СС2 (2/113). Согласно Merker М.

(2015), в Beijing CC2 включены и другие минорные варианты Beijing, также имеющие специфическую инвертированную инсерцию IS 6110 (Рисунок 4.2), которые в сумме составили 141 штамм.

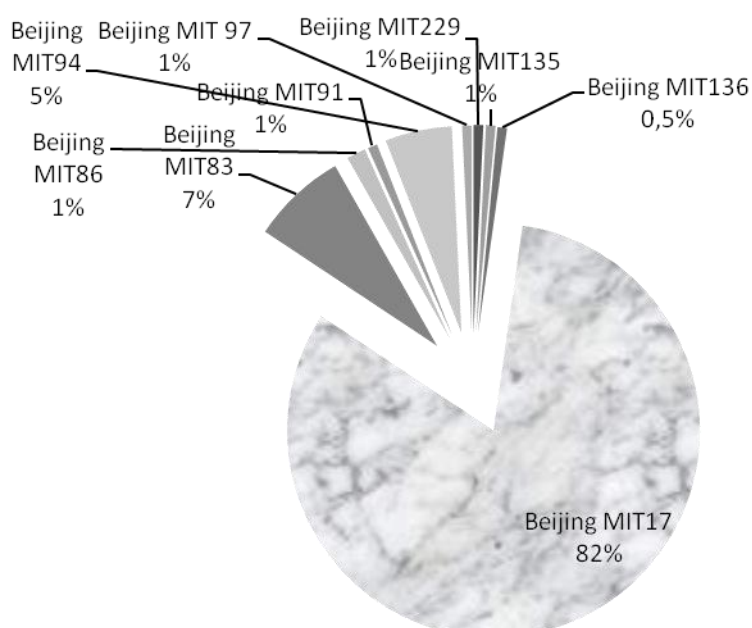


Рисунок 4.2. Состав клонального комплекса 2 (CC2) штаммов генотипа Beijing, сгруппированных по Merker M. (2015) и идентифицированных по профилям 12 локусного MIRU-VNTR типирования

Анализ распределения профилей, не вошедших в доминантные Beijing CC1 и CC2 группы показал, что клональный комплекс CC3 представлен 34 штаммами генотипа Beijing, из которых 6 изолятов, также классифицированы как W148. Клональный комплекс Beijing CC4 из 21 изолята в четырех случаях нес штаммы W148. Остальные группы (CC5, CC6, BL7 и не классифицированные профили) не включали штаммов со специфической инвертированной инсерцией IS 6110 (Рисунок. 4.3). Суммарно, в когорте из Иркутской области выявлено 199 штаммов клона W148, распределенных в трех клональных комплексах – Beijing CC1, CC2 и CC3. Отмеченный факт наибольшей встречаемости W148 среди Beijing CC2 (95% - 134/141), который образован группой штаммов с широкой вариацией профилей, а также наличие специфической инсерции у ряда изолятов с другими паттернами 24 MIRU-VNTR, требует более подробного изучения, его территориального

распределения и лекарственной устойчивости, что и осуществлено в последующих разделах настоящего исследования.

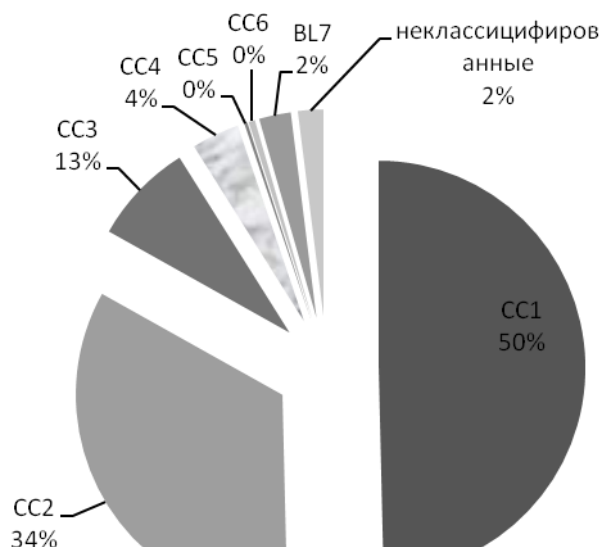


Рисунок 4.3 Структура штаммов генотипа Beijing, сгруппированных по Merker M. (2015) на основе 24 локусного MIRU-VNTR типирования

Заключительным этапом исследования иркутской популяции МБТ было осуществлено картирование пространственного распределения изучаемых штаммов по территории Иркутской области с целью выяснения роли железнодорожной магистрали в распространении эпидемических вариантов возбудителя туберкулеза. Для решения поставленной задачи был оценен генетический полиморфизм штаммов, циркулирующих в изучаемом регионе по населенным пунктам, находящимся в непосредственной близости от транспортных узлов и в населенных пунктах, расположенных на большом удалении от основных транспортных потоков (Таблица 4.6). Полученные данные о генотипической принадлежности штаммов МБТ были сгруппированы по районам и крупным городам Иркутской области и соотнесены с уровнями различных показателей (заболеваемостью ТБ, плотностью населения, расстояниями от областного центра по автотрассам, отдаленностью от железнодорожных станций, обеспеченность авиатранспортом для труднодоступных районов).

Распределение генотипов МБТ, выделенных от больных ТБ в районах Иркутской области, (абс.)

Генотип/ Район изучения	Beijing	LAM	T	Ural	S	Haarlem	H	X	Uganda	orphan	mix
Аларский	11	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Ангарский	11	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Баяндаевский	15	3	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Балаганский	3	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
Бодайбинский	2	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Боханский	26	8	3	1	-	-	-	1	1	1	1
Братский	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Жигаловский	8	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Заларинский	8	4	-	1	-	-	-	1	-	-	-
Зиминский	9	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Иркутск	126	20	2	5	2	1		3		2	8
Иркутско-сельский	61	11	7	4	1	1	2		1	4	2
Казачинско-Ленский	3	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Катангский	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Качугский	10	-	1	1	-	-	-	1		-	1
Киренский	1	-	1	-	-	-	-		1	-	
Куйтунский	18	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Мамско-Чуйский	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Нижеилимский	7	-	-	1			1		-	-	-
Нижеудинский	7	1	2	-	-	-	-	-	-		1
Нукутский	12	1	-	-	-	-	-	-	-	2	
Ольхонский	3	-	1	1		-	-	-	-	-	-
Осинский	16	3	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Саянск	7	-	-	1			1			1	1
Слюдянский	10	4	1	1	-	-	-	-	-	-	1
Тайшетский	8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
Тулунский	14	2	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Усольский	13	2	1	-	-	1	1	-	-	1	-
Усть-Илимский	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Усть-Кутский	9	-	-	1			1	-	-	-	1
Усть-Удинский	7	-	1	-		1	1				
Черемховский	11	-		-	-	-	-	-	-	-	1
Чунский	6	3	1	-	-	-	-	-	-	-	
Шелеховский	15	2	1	1	-	-	-	1	-	-	1
Эхирит-Булагатский	41	8	9	-	-	-	2	1	-	2	2
Общее количество	509	81	34	26	5	4	10	8	3	14	23

Проведенный анализ не выявил для каждого из выше перечисленных факторов прямой корреляционной связи с частотой обнаружения СС2/W148 (Таблица 4.7 и Приложение, Рис 1).

Таблица 4.7

Распределение штаммов W148/B0, выделенных от больных ТБ в районах Иркутской области, (%)

Генотип/ Регион изучения	Общий показатель	Впервые выявленные случаи	Хронические случаи	Рецидивы
Аларский	53,8	50,0	66,7	0,0
Ангарский	14,3	11,1	20,0	0,0
Баяндаевский	15,0	18,2	11,1	0,0
Балаганский	0,0	0,0	0,0	0,0
Бодайбинский	40,0	50,0	33,3	0,0
Боханский	23,8	24,1	23,1	0,0
Братский	14,3	0,0	50,0	0,0
Жигаловский	20,0	28,6	0,0	0,0
Заларинский	14,3	10,0	25,0	0,0
Зиминский	9,1	0,0	50,0	0,0
Иркутск	22,5	18,1	33,3	20,0
Иркутско-сельский	23,4	21,4	27,3	50,0
Казачинско-Ленский	0,0	0,0	0,0	0,0
Катангский	100,0	100,0	0,0	0,0
Качугский	42,9	12,5	83,3	0,0
Киренский	33,3	0,0	100,0	0,0
Куйтунский	10,0	18,2	0,0	0,0
Мамско-Чуйский	0,0	0,0	0,0	0,0
Нижеилимский	11,1	16,7	0,0	0,0
Нижеудинский	27,3	20,0	100,0	0,0
Нукутский	20,0	30,0	0,0	0,0
Ольхонский	60,0	100,0	50,0	0,0
Осинский	20,0	15,4	28,6	0,0
Саянск	45,5	62,5	0,0	0,0
Слюдянский	0,0	0,0	0,0	0,0
Тайшетский	77,8	66,7	100,0	0,0
Тулунский	22,2	25,0	20,0	0,0
Усольский	26,3	21,4	40,0	0,0
Усть-Илимский	40,0	0,0	66,7	0,0
Усть-Кутский	33,3	42,9	25,0	0,0
Усть-Удинский	30,0	33,3	33,3	0,0
Черемховский	25,0	33,3	20,0	0,0
Чунский	10,0	12,5	0,0	0,0
Шелеховский	19,0	8,3	37,5	0,0
Эхирит-Булагатский	27,7	27,8	27,6	0,0
Иркутская область	23,6	21,3	29,9	10,5

Таким образом, результаты динамического эпидемиологического мониторинга популяции МБТ в Иркутской области свидетельствуют о доминировании двух субтипов Beijing (CC1 и CC2/ W148) на фоне широкого разнообразия его минорных представителей и других генотипов non-Beijing.

4.3. Результаты эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в Саха (Якутии)

В результате эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя ТБ за 2010-2015 годы была собрана коллекция из 377 штаммов МБТ. Уникально низкая частота встречаемости штаммов генотипа Beijing в Саха (Якутии) - 43,0% - стала предметом изучения структуры и гетерогенности популяции МБТ. Поэтому для полученного массива MIRU-VNTR профилей было оценено генетическое разнообразие каждого полиморфного локуса MIRU-VNTR по индексу аллельного полиморфизма. Индекс дискриминации варьировал от 0 для MIRU 24 до 0,782 для QUB 26, вариабельность семи локусов была выше 0,6 (Mtud 04, MIRU 40, Mtud 21, Qub 11b, MIRU 26, MIRU 31, QUB 26), девять локусов показывали средние значения (ETR C, ETR D, MIRU 10, MIRU 16, ETR A, Mtud 30, Mtud 39, QUB-4156с, MIRU39), а восемь локусов имели индекс менее 0,3 (MIRU2, MIRU 20, Mtud 29, ETR B, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 27, Mtud 34).

Для 377 изолятов были получены 222 различных MIRU-VNTR профилей по 24-м локусам, 190 из которых соответствовали единичным штаммам, остальные 32 группы содержали от 2-х до 40-ти идентичных профилей. Частота кластеризации общей выборки составила 0,32. Для генотипа Beijing были характерны более низкие показатели аллельного полиморфизма по сравнению с общей выборкой (Таблица 4.8). Такой уровень генетического разнообразия связан, наиболее вероятно, с "эффектом основателя" т.е. относительно недавним распространением штаммов этого генотипа на территории Саха (Якутии).

Индекс аллельного полиморфизма для всех штаммов выборки и для штаммов
Beijing генотипа

Локус	Индекс, все штаммы	Индекс, Beijing
MIRU2	0,22	0,16
Mtud 04	0,73	0,29
ETR C	0,51	0,00
ETR D (MIRU-4)	0,37	0,00
MIRU 40	0,65	0,06
MIRU 10	0,53	0,03
MIRU 16	0,47	0,03
Mtud 21	0,75	0,22
MIRU 20	0,06	0,03
Qub 11b	0,78	0,43
ETR A	0,55	0,09
Mtud 29	0,08	0,00
Mtud 30	0,57	0,03
ETR B	0,08	0,00
MIRU 23	0,17	0,00
MIRU 24	0,00	0,00
MIRU 26	0,61	0,59
MIRU 27	0,01	0,03
Mtud 34	0,30	0,06
MIRU 31	0,69	0,34
Mtud 39	0,30	0,00
QUB 26	0,78	0,53
QUB-4156c	0,38	0,00
MIRU39	0,51	0,11

Как было уже описано в разделе 4.1, семейство Beijing, представленное наибольшим количеством штаммов – 43,0 % (162/377), включало 149 изолятов с известными MIT (MIRU international types), и 13 изолятов, неидентифицированных по SITVIT базе данных, но имеющих делеции в RD105/207, соответствующие представителям генотипа Beijing. Далее следуя алгоритму, предложенному M. Merker et al. (2015) были выявлены субтипы Beijing: CC1 – 81; CC2/W148 – 40; CC3-14; CC4-8; CC5 – 1; CC6 – 3 неклассифицированных (Beijing-CC orphan) – 23 штамма. Наиболее часто встречающимися MIRU-VNTR профилями среди штаммов Beijing генотипа были 223325153533445644423382 (CC1) - 40 и

223325173533445644423372 (CC2/W148) -25. Причем если штаммы CC2 образовывали филогенетически компактную группу профилей, то CC1 характеризовались как кластеризуемыми паттернами, так и отличающимися в широком диапазоне генетическими данными (Приложение, Рисунок 3). Таким образом, в Саха (Якутии) среди МБТ генотипа Beijing наибольшее эпидемическое значение имеют субтипы CC1 (среднеазиатское происхождение), отличающиеся вариабельным характером профилей, и более филогенетически компактная группа штаммов CC2/W148 (российское происхождение), что является отражением глобальных потоков распространения этих пандемических субтипов.

Вторыми по распространенности были штаммы семейства S – 13,5% (51/377), составившие на филогенетическом древе отдельный кластер, содержащий 23 идентичных MIRU-VNTR профиль 233325153325141344222372 идентифицируемый по 12-ти локусам как MIT256 по SITVIT и 16876-17 по MLVA MtbC15-9. Восемь штаммов, образовавшие два кластера, отличались от вышеописанного профиля только числом повторов по гипервариабельному локусу Qub26. Еще четыре штамма, отнесенные к S генотипу и кластеризованные по двум профилям, как и остальные 16 изолятов, имели более широкие отличия от 233325153325141344222372. В двух случаях, наблюдалась микст-инфекция, связанная с одновременным присутствием S и Beijing генотипов (Приложение, Рисунок 4).

Необычно высока доля генотипа T в Саха (Якутии), который образован из 10 сгруппированных в 4 кластера профилей и 40 уникальных паттернов (13,3% - 50/377). В общей структуре доля T штаммов была значительно выше по сравнению с другими территориями исследования Северной Азии (коэффициент сопряжения для трех степеней свободы $\chi^2=25,59$; $p<0,01$). Общий MIRU-VNTR профиль 223125153324232224223352 - MIT8 по SITVIT и соответствующий по MtbC9 типу 15, встречался сразу у четырех штаммов семейства T (Приложение, Рисунок 5).

В исследуемой популяции МБТ также представлено семейство LAM (8,8% 33/377), состоящее из филогенетически подобных, имеющих только в двух случаях кластеризованные группы по два штамма (Приложение, Рисунок 6). К LAM были отнесены MIRU-VNTR профили с известными MIT - 1, 30, 35, 140, 246, 326, 365, 396

по SITVIT, и штаммы генетически близкие к вышеназванным профилям LAM. Штаммы LAM семейства имели вариации в 19 из 24 локусов, что свидетельствует о давней циркуляции МБТ этого семейства на территории Саха (Якутия).

Немалую часть, 7,0% (26/377) составили штаммы семейства Ural (Приложение, Рисунок 7). В трети случаев они имели профиль MIT171 по 12 локусам в SITVIT, причем семь из десяти изолятов были с идентичным профилем 227225113223353244423363 соответствующим по MLVA MtbC15-9 типу 163-15. Также были выявлены профили MIT 197, 381, 647, 756 и близкие к ним характеристики штаммов, не идентифицируемых SITVIT, но имеющие типичные черты для Ural по MIRU-VNTR (Огарков О.Б. и др., 2007). Кроме того, как и в группе S семейства, наблюдались три случая смешанной инфекции, два - Ural и Beijing генотипы и один - Ural и non-Beijing генотип.

Гетерогенную группу представляли отдельные минорные генотипы МБТ в Саха (Якутии). В филогенетический куст семейства Haarlem вошли 27 штаммов с тремя кластеризованными попарно профилями, идентифицируемыми как MIT 45, 781 и 1513, а также единичными изолятами с MIT 43, 120, 152, 188, 740 по SITVIT, и пять Haarlem-подобных MIRU-VNTR профилей (Приложение, Рисунок 8). Штаммы генотипов H, X и Uganda не образовали филогенетических групп.

Использование современных методов идентификации изолятов *M. tuberculosis* позволило нам получить подробную характеристику популяции возбудителя, циркулирующей на одной из мало изученных территорий России. Генотипирование по 24-м локусам MIRU-VNTR, несмотря на относительно низкий индекс Hunter-Gaston ряда локусов (MIRU2, MIRU 20, Mtud 29, ETR B, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 27, Mtud 34), дает возможность определить типичные штаммы известных генетических семейств возбудителя туберкулеза и оценить их распространенность в исследуемом регионе. В Саха (Якутии) структура популяции МБТ имеет отличный характер от других описываемых территорий Северной Азии. Основной резервуар инфекции обеспечивается разнообразными штаммами, среди которых лидирующий генотип Beijing разделяет нишу с широким вариантов штаммов генотипов S и T.

Минорные генотипы представлены как кластеризующимися вариантами (LAM, Ural, Haarlem), так и изолятами с уникальными профилями (H, X и Uganda).

4.4. Результаты эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в Бурятии и Агинском АО Забайкальского края

С целью выявления эпидемических и эндемичных генотипов МБТ, циркулирующих на территории Бурятии был проведен динамический мониторинг современной популяции возбудителя туберкулеза. В Бурятии сложились уникальные обстоятельства организации пенитенциарной системы – контингент УФСИН составляют только жители республики, что нашло отражение в особенностях формирования территориальной обособленности резервуара возбудителя ТБ. Поэтому в мониторинговые исследования включены также штаммы МБТ, полученные от больных из туберкулезных больниц УФСИН. В анализ включена выборка из 337 эпидемически не связанных штаммов МБТ, которые выделены от больных ТБ легких, находившихся на лечении в Республиканском клиническом противотуберкулезном диспансере (156 изолятов) и в учреждениях пенитенциарной системы республики Бурятия (181 изолятов) в январе 2010 – декабре 2014 гг..

Генотип Beijing, как и в Иркутской области, имели большинство штаммов в изучаемой выборке (64,1% 216/337), из которых 15 были с уникальными MIRU-VNTR профилями, не представленными в базах данных SITVIT и MIRU-VNTRplus (Приложение, Рисунок 9). Было выявлено два неклассифицированных MIRU-VNTR профиля (orphan). Штаммы без делеций в RD 105/207 были идентифицированы как LAM – 16,9% (57/337); Ural – 7,4% (25/337); T-3,9 % (13/337). В небольшом количестве выявлены генотипы других семейств: S – 1,2% (4/337); Haarlem – 1,4% (5/337), X– 0,6 % (2/337) и Uganda 0,3% (1/337) штамма. Среди образцов из пенитенциарных учреждений Бурятии преобладали штаммы от хронических больных - 68,8%, аналогичный показатель для штаммов из республиканского диспансера составил только 14%. Однако, несмотря на это, достоверных

генотипических различий в выборках не обнаружено. Общая доля наиболее распространенных субтипов Beijing – CC1 и CC2, была ниже, чем в Иркутской области и Саха (Якутии) (критерий соответствия для двух степеней свободы $\chi^2=56,10$; $p<0,01$). Эти два субтипа составили суммарно 56,0% штаммов Beijing (121/216), что не является характерным для структуры популяции МБТ, циркулирующих на территории России (Mokrousov I.V. et al., 2012; 2015). В иркутской группе генотипа Beijing общая часть CC1 и CC2 штаммов составляла 82,3%, в Саха (Якутии) – 76,1%, а в выборке из 29 изолятов из Забайкальского края - 27,8%.

Описанная структура штаммов Beijing носит отличный от других территорий вид в связи со значимым присутствием других, характерных для Бурятии вариантов возбудителя. В исследуемой выборке субтип Beijing MIT 642, обнаруженный в 15,4% (52/337), можно рассматривать как «эндемичный», т.е. имеющий эпидемическое распространение на ограниченной территории. Этот субтип встречался среди изолятов, полученных от больных с новыми случаями ТБ (3,4% - 24/186), так и у пациентов с хроническим ТБ (7,0% - 28/147). При этом частота его выявления среди больных с первичным и хроническим ТБ, значимо не отличалась ($\chi^2=0,2,35$; $p=0,125$).

Национальная принадлежность больных туберкулезом, вызванным субтипом Beijing MIT 642, не имела значения: значимые различия в частоте обнаружения в группе славян (20/159) и бурят (8/70) отсутствовали ($\chi^2= 0,001$ с поправкой Йейтса, $p>0,05$). Такое равномерное распределение штаммов субтипа Beijing MIT 642, может говорить о его давней циркуляции, что позволившей распространиться ему в обеих этногруппах. Профили Beijing MIT 642, которые присутствовали только в единичных случаях в коллекциях из других регионов России (Mokrousov I.V. et al., 2014), можно рассматривать как эндемичные для Забайкалья (Бурятия и Забайкальский край), предположительно первоначально циркулирующие только среди аутохтонной популяции, которую до освоения Сибири представляли буряты.

Наличие единого для разных этнических групп резервуара инфекции определяют и общие кластеры MIRU-VNTR-24 профилей штаммов Beijing MIT 642.

Высокий уровень кластеризации ($CR=0,73$) выявлен наряду с обнаружением двух крупных групп с идентичными профилями 224233342644425173343732 (24 штамма) и 224233342644425173343832 (13 штаммов), одинаково часто распределенными у разных этнических составляющих когорты больных ТБ из пенитенциарной системы и гражданских населения Бурятии (Таблица 4.9.).

Таблица 4.9

Распределение основных подтипов генотипа Beijing, выделенных от больных ТБ из пенитенциарной системы и гражданского населения в Бурятии (%)

Генотип/ Субтип	Пенитенциарная система			Гражданское население		
	впервые выявленные, n=59	хронические случаи, рецидивы, n=122	всего, n=181	впервые выявленные, n=127	хронические случаи, рецидивы, n=29	всего, n=156
Всего штаммов Beijing	74,2	66,5	69,1	59,8	73,2	61,8
Beijing CC1	20,1	14,2	15,9	16,3	13,4	16,0
Beijing CC2	12,8	18,1	16,7	5,4	46,8	11,0
Beijing BL7 (MIT 642)	10,8	19,7	17,0	15,2	13,2	15,0
Beijing MIT 137	7,2	0,8	2,8	3,3	0,0	2,0
Beijing MIT 571	0,0	2,7	1,5	2,2	0,0	1,9

При этом все профили по 24 MIRU-VNTR локусам были отнесены к клональному комплексу BL7 (Merker M. et al., 2015), включающему предковые формы генотипа Beijing. Отнесение штаммов Beijing MIT 642 к «старым» вариантам Beijing по профилю MIRU-VNTR, подтверждено отсутствием в их ДНК специфической делеции в RD 181, что характерно для предковых линий, распространенных в Юго-восточной Азии (Luo T. et al, 2015; Yin Q. et al, 2016). Отличительным фактом этих штаммов явилось наличие микст вариантов в одном

образце, обнаруживаемом тестами на RD 181 и наличие клона W148. В пяти случаях из коллекции 51 образца, идентифицируемого по MURU-VNTR как Beijing MIT 642, определена специфическая для B0/W148 клона инвертированная инсерция IS6110 и наличие ДНК с интактным и делетированным участками в RD 181. То есть нами были обнаружены в 9,8% случаев микст генотипы, состоящие из штаммов Beijing MIT 642 и B0/W148. В целях унификации определения в настоящей работе описываемый MIT 642 определен как субтип Beijing BL7 (MIT 642).

Дополняет разнообразие Beijing в Бурятии наличие штаммов с профилем, отвечающим по 12 локусам MIRU-VNTR MIT 137 – 5,1% (11/216), образующих две группы из идентичных профилей, отличающихся числом повторов в высоко вариабельном локусе Qub 26. Ни один из вышеуказанных штаммов не имел характерной для W148 инсерции. Обнаружены единичные, (один-пять) штаммы Beijing MIT 82, 86, 87, 97, 121,123,135, 245, 701, циркулирующие согласно базе в Юго-Восточной Азии (Сингапур, Япония, Вьетнам) (Wan K, et al, 2011), но не Северной Азии. В частотах до 5 % присутствуют субтипы Beijing MIT 83, 571, 592, которые уже обнаруживались ранее на территории России другими исследователями, а также согласно данным базы SITVIT. Для этой разнообразной группы минорных вариантов Beijing в шести случаях определена специфическая для W148 инсерция.

Штаммы LAM составляли пятую часть выборки. Они были представлены 23 паттернами (Приложение, Рисунок 10), из которых самые крупные кластеры были образованы изолятами с профилями 132244332224125153322622 и 132254332224125153322622, полученными с равной частотой от больных ТБ из пенитенциарной системы и гражданской популяции (Таблица 4.8). Общий уровень кластеризации (CR=0,59) был сравним с аналогичным показателем для Beijing (CR=0,68). Частота штаммов LAM значимо не отличалась ($\chi^2=0,279$; $p=0,59$) среди больных хроническим течением и больных с рецидивами, по сравнению с новыми случаями ТБ в общей выборке из Бурятии, и в отдельных сравниваемых группах гражданского населения ($\chi^2=0,008$; $p=0,93$) и заключенных ($\chi^2=0,713$; $p=0,40$). Также

значимо не отличалась частота генотипа LAM в целом между гражданскими больными и заключенными ($\chi^2=0,371$; $p=0,54$).

На фоне часто кластеризованных штаммов LAM и Beijing, представители семейства Ural имели невысокий уровень кластеризации (CR=0,36) (Приложение, Рисунок 11). Еще более гетерогенными были штаммы семейства T, S и X (Приложение, Рисунок 12). Таким образом, анализ распределения основных субтипов Beijing CC1, Beijing CC2 и LAM в сравниваемых когортах больных ТБ не выявил значимых различий (см. Таблица 4.9 и Таблица 4.10). Все это свидетельствует об активном распространении 4-х вышеуказанных генотипов эпидемическим путем в исследуемой популяции. Эти штаммы могут быть эпидемиологически связаны недавними заражениями из популяционного резервуара инфекции, несмотря на отсутствие выявления контактов.

Таблица 4.10

Штаммы МБТ генотипа LAM, выделенных от больных из пенитенциарной системы и гражданского населения

Характеристика штаммов/больных	Впервые выявленные больные ТБ	Больные с хроническим течением рецидивами	с и	Всего
Гражданское население				
Общее количество штаммов, абс.	127	29		156
Штаммы генотипа LAM, абс. (%)	21(16,5)	5 (17,2)		26 (16,7)
Пенитенциарная система				
Общее количество штаммов, абс.	59	122		181
Штаммы генотипа LAM, абс. (%)	7(11,9)	22 (18,0)		29 (16,0)

Анализ распределения 29 штаммов из Агинского АО свидетельствуют о близости генотипической структуры с циркулирующей популяцией МБТ в Бурятии. Это подтверждается присутствием генотипа Beijing у 62,1% (18/29) штаммов. Они были представлены только пятью штаммами кластеров CC1 и CC2. Эндемичный вариант для Бурятии Beijing BL7 (MIT 642), был выявлен у семи штаммов. Определены шесть изолятов, классифицированные как CC4, их профили присутствовали среди минорных профилей Beijing из других изучаемых территорий Северной Азии (Иркутская область, Бурятия). Среди nonBeijing наибольшее число штаммов принадлежало генотипу T (7/29), идентифицированы также по одному штамму генотипа S и LAM (Приложение, Рисунок 13). Таким образом, первичный скрининг штаммов из Агинского АО свидетельствует, что Beijing MIT 642 распространен на ограниченной территории, предположительно, в Забайкальском крае, и в частности Агинском АО. При этом отличия в частоте этого субтипа в группах славян (20/159) и бурят (8/70) на территории Бурятии и Агинского АО отсутствуют ($\chi^2 = 0,001$ с поправкой Йейтса, $p > 0,05$).

Полученные результаты еще раз свидетельствуют, что эпидемиологическая ситуация по туберкулезной инфекции на каждой исследуемой территории складывается как сумма воздействий на чувствительную человеческую популяцию эндемичных штаммов, широкое распространение которых характерно только для данной территории, и убиквитарных или пандемических штаммов МБТ, для которых свойственно глобальное распространение.

Глава 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЛУ ТУБЕРКУЛЕЗА НА ИЗУЧАЕМЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

5.1. Изучение роли различных клонов *M. tuberculosis* в распространении МЛУ туберкулеза

В общей выборке штаммов число лекарственно чувствительных составило 35,1% (452/1286), то есть треть анализируемой коллекции. Присутствие только трети лекарственно чувствительных штаммов, наиболее вероятно, связано с тем, что в исследование были включены штаммы из областных и республиканских туберкулезных больниц, обеспечивающих специализированную стационарную помощь больным, в том числе и с тяжелыми хроническими и рецидивирующими формами ТБ. Среди пациентов с хроническим течением отмечено наибольшее соотношение устойчивых/чувствительных штаммов (8,0:1) по сравнению с больными с новыми случаями ТБ (2,1:1), что представляется вполне закономерным следствием применения нескольких курсов антибиотикотерапии (Таблица 5.1). Большинство изолятов с сохраненной лекарственной чувствительностью было обнаружено от ранее нелеченных больных ТБ: в Иркутской области – 82,5% (118/136), Республике Бурятия – 82,3% (79/96), Саха (Якутия) – 94,4% (202/214). МЛУ отмечалась в среднем в 37,0% (452/1286); в Иркутской области 39,6% (237/598), Республике Бурятия – 44,0% (139/316), Саха (Якутия) – 26,6% (93/351). Монорезистентность встречалась в 7,6 % (98/1286) случаев и проявлялась чаще к стрептомицину (43/98), в равных долях к изониазиду и ПАСК (17/98), капреомицину и циклосерину (11/98), рифампицину (14/98), этамбутолу (9/98), в единичных случаях к этионамиду (6/98) и пиперазину (3/98).

Лекарственная чувствительность МБТ, выделенных от больных ТБ легких на изучаемых территориях Северной Азии (абс.)

Тип чувствительности/ Регион изучения	Чувствительные	Монорезистентные	Полирезистентные	МЛУ	ШЛУ	Всего
Иркутская область, всего	143	74	118	229	34	598
Саха (Якутия), всего	213	10	6	93	9	350
Впервые выявленные случаи	201	10	19	52	2	284
Хронические случаи	12	0	7	41	6	66
Впервые выявленные случаи	118	53	80	119	18	388
Хронические случаи	25	21	38	110	16	210
Республика Бурятия, всего	96	30	50	139	1	316
Впервые выявленные случаи	79	12	26	40	0	157
Хронические случаи	17	8	24	99	1	149
Забайкальский край, всего	4	3	3	17	0	27
Впервые выявленные случаи	3	3	2	2	0	10
Хронические случаи	1	0	1	15	0	17
Общее по регионам, всего	456	117	177	478	44	1291
Впервые выявленные случаи	401	78	127	213	20	839
Хронические случаи	55	29	70	265	23	442

Две трети (68,2% - 363/532) МЛУ МБТ были представлены изолятами генотипа Beijing без значимого приоритета среди впервые выявленных и повторных случаев лечения ТБ по данным обобщенной выборки ($\chi^2=0,001$; $P=0,982$). Штаммы Beijing CC1 были как устойчивыми, так и чувствительными: В 154 случаях из 307 изолятов Beijing CC1 клона были чувствительными, большинство (139/154) из которых обнаружены у впервые выявленных больных. В трети случаев 29,4% (106/306) обнаружение штаммов этого субтипа сопровождали МЛУ и ШЛУ. Более

неблагоприятные характеристики имели штаммы Beijing CC2: частота МЛУ и ШЛУ была 67,3% (150/223), а чувствительными оставались лишь 17,1 % (38/223) изолятов общей выборки. При этом, значимо частое преобладание МЛУ среди штаммов Beijing CC2 по сравнению с другими субтипами выявлено не на всех описываемых территориях (Таблица 5.2).

Таблица 5.2

Характеристика МЛУ/ШЛУ штаммов генотипа Beijing на изучаемых территориях

Генотип	К-во штаммов (абс.)	МЛУ/ШЛУ (%)	χ^2
Иркутская область			
Beijing CC2	141	97 (68,8)	35,45; p<0,01
Другие субтипы Beijing	296	112 (37,8)	
Бурятия			
Beijing CC2	45	23 (51,1)	0,67: p=0,41*
Другие субтипы Beijing	152	65 (42,8)	
Саха (Якутия)			
Beijing CC2	34	28 (82,4)	47,44; p<0,01
Другие субтипы Beijing	118	23 (17,8)	
Общая выборка			
Beijing CC2	220	148 (67,3)	65,73; p<0,01
Другие субтипы Beijing	566	198 (35,0)	

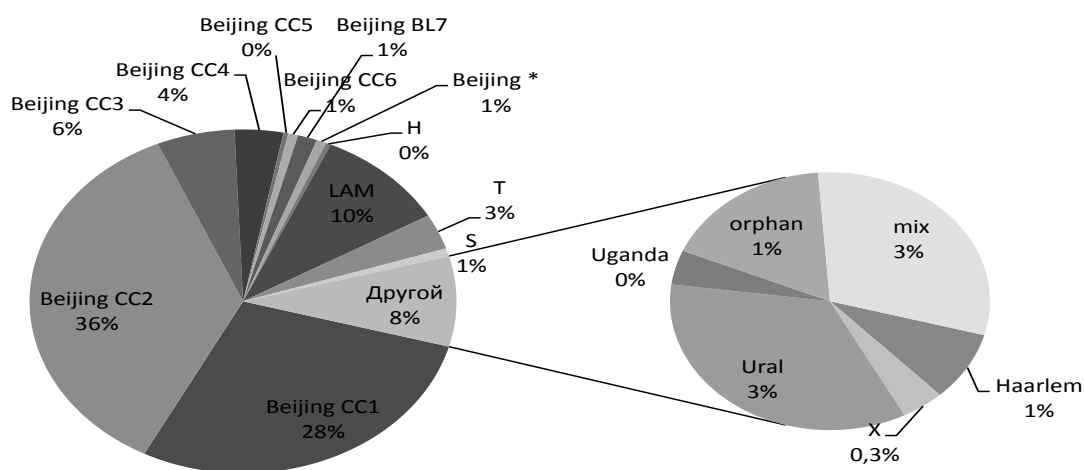
*- χ^2 с поправкой Йейтса

В Бурятии, кроме Beijing CC2 штаммов, МЛУ обеспечивают и другие субтипы Beijing. По данным общей выборки в семействах nonBeijing, представленных меньшим количеством, отмечается неравномерное распределение штаммов по антибиотикоустойчивости. Если среди изолятов трех генотипов абсолютно доминировали лекарственно-чувствительные варианты: Н - 64,7% (11/17), Т - 68,9%

(62/90), Haarlem - 81,8% (27/33), то среди представителей LAM чувствительность была только в 33,3% (47/141), а доля штаммов с МЛУ и ШЛУ достигала 44,7% (63/141).

Несмотря на близкие частоты распространения МЛУ на изучаемых территориях, генотипическая структура МБТ, ответственных за формирование лекарственной устойчивости, имеет отличительные черты в каждом регионе. Поэтому, кроме оценки обобщенной выборки, важным элементом анализа стала характеристика отдельных регионов.

Из коллекции 719 образцов МБТ **Иркутской области** профили чувствительности к противотуберкулезным препаратам получены для 598 штаммов. Их распределение по генетическим семействам и типам лекарственной устойчивости представлены в Таблице 5.3. Обращает на себя внимание, что все генотипы включали как чувствительные, так и в разной степени устойчивые штаммы. Тем не менее, МЛУ и ШЛУ в основном обеспечивали штаммы двух доминирующих субтипов Beijing (CC1 и CC2) и LAM (Рисунок 5.1).



* -штаммы Beijing, не классифицированные по клональным комплексам, согласно M. Merker (2015)

Рисунок 5.1. Генотипическая структура штаммов с МЛУ в Иркутской области

В целом, изоляты субтипа Beijing CC1 генотипа Beijing несли все проявления лекарственной устойчивости от сохраненной чувствительности до широкой лекарственной устойчивости (см. Таблица 5.3).

Таблица 5.3

Лекарственная устойчивость МБТ, выделенных от больных ТБ в Иркутской области (абс.)

Генотип	Штаммы с различным проявлением лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам					
	Чувствительные	Монорезистентность	Полирезистентность	МЛУ	ШЛУ	Всего штаммов с тестом на лекарственную устойчивость
Beijing CC1	57	32	53	62	15	219
Beijing CC2	21	7	16	86	11	141
Beijing CC3	5	1	12	16	0	34
Beijing CC4	3	3	5	10	0	21
Beijing CC5	0	1	0	1	0	2
Beijing CC6	0	0	0	2	0	2
Beijing BL7	4	0	3	4	0	11
Beijing*	2	0	1	2	0	5
H	3	0	2	1	0	6
LAM	16	7	8	22	5	58
T	10	1	5	9	0	25
S	2	0	1	1	1	5
Haarlem	0	0	1	2	0	3
X	1	4	0	1	0	6
Ural	3	3	6	7	1	20
Uganda	1	1	0	1	0	3
orphan	1	3	6	3	1	14
mix	6	2	6	7	0	21
Beijing всего	93	45	90	183	26	437
всего	136	66	125	237	34	598

*Неклассифицированные по клональным комплексам субтипы Beijing, по M. Merker (2015)

При этом показатель выявления Beijing CC1 среди больных с первичной МЛУ – 11,1% (43/388) не имел значимых отличий от аналогичного показателя у пациентов с повторными курсами лечения (хроническое течение и рецидивы) – 16,2 % 34/210 ($\chi^2=2,73$; $p=0,098$). Выявленные штаммы Beijing CC1 с наличием инсерции, специфической для клона W148, в половине случаев (7/13) были с МЛУ/ШЛУ, они имели профиль 244233352644425153353723, определялись у впервые выявленных и больных с хроническим ТБ.

Отмечен факт, что высокий уровень кластеризации профилей встречался у штаммов Beijing CC1 с разным типом лекарственной устойчивости (Таблица 5.4, Приложение, Рисунок 14). Различные варианты лекарственной чувствительности также отмечены среди изолятов Beijing CC2 и генотипа LAM. Штаммы с МЛУ среди Beijing CC2 группы имели высокий уровень кластеризации профилей MIRU-VNTR (CR=0,82): пятью кластерами представлено более 80 % штаммов. Кроме того, выявлен значимый риск возникновения МЛУ при хронизации ТБ, вызванного штаммами Beijing CC2 (31,9% - 67/210) по сравнению с уровнями первичной МЛУ (22,8% - 72/316) (ОШ=2,056; 95% ДИ 1,397-3,028). МЛУ штаммы генотипа LAM имели уровень кластеризации 0,24 и характеризовались широким разнообразием паттернов. В случае генотипа LAM уровень вторичной МЛУ (5,71 % - 12/210) не значительно превышал показатель первичной МЛУ (3,87% 15/373), что отразилось на отсутствии риска увеличения МЛУ при хронизации ТБ, вызванного генотипом LAM (ОШ=1,507; 95% ДИ 0,692-3,282).

Уровень кластеризации профилей штаммов МБТ с различным типом лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам в Иркутской области

Генотип (субтип)/ Показатель	Штаммы с различным проявлением лекарственной чувствительности в противотуберкулезным препаратам, %					
	чувствительные	монорезистентность	полирезистентность	млу	шлу	общий показатель для штаммов с тестом на лекарственную устойчивость
Уровень кластеризации профилей (CR)						
Beijing CC1	0,68	0,69	0,54	0,66	0,40	0,74
Beijing CC2	0,71	0,50	0,82	0,82	0,72	0,85
Другие CC Beijing	0,40	0,0	0,33	0,25	0,0	0,35
LAM	0,07	0,07	0,0	0,24	0,0	0,19
T	0,18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,08
Общий показатель						0,56
Количество штаммов клона W148						
Beijing CC1	0	1	5	5	2	13
Beijing CC2	20	6	17	80	11	134
Другие CC Beijing	4	2	1	9	0	16
Всего Beijing	24	9	23	94	13	163

Важно отметить, что 95% (134/141) субтипа Beijing CC2 в Иркутской области несли характерную для клона W148 инсерцию. При этом вклад клона W148 в

МЛУ/ШЛУ, вызванную штаммами CC2, составил 65,4% (91/139) (см. Таблица 5.2). То есть, по результатам анализа когорты МБТ из Иркутской области, треть случаев МЛУ/ШЛУ (91/271) обеспечено субтипом Beijing CC2, который наиболее активно (36%) участвовал в формировании пула МЛУ штаммов на изучаемой территории. В целом, среди штаммов с профилем лекарственной чувствительности субтип W148 выявлен в 27,3% (163/598), и в две трети случаев - 65,6% (104/163), он сопровождал МЛУ/ШЛУ.

Таким образом, обнаруженные высокие уровни кластеризации свидетельствуют в пользу эпидемической передачи штаммов с различным уровнем ЛУ доминирующими субтипами Beijing (CC1 и CC2). Отмечено значимое увеличение доли МЛУ среди повторных случаев лечения, наряду с высоким уровнем кластеризации у основных субтипов Beijing и особенно субтипа W148. Несмотря на это, ведущую роль в распространении МЛУ продолжает играть эффективность лечения впервые выявленных случаев ТБ. На фоне ТБ с первичной МЛУ, достигающей 5,3% для LAM, 7,2 % - для CC1, и 9,0% - для CC2 субтипов Beijing, неудачи лечения, приводящие к повторным курсам противотуберкулезной терапии, увеличивают риск развития в Иркутской области МЛУ, если они вызваны этими вариантами возбудителя МБТ.

Результаты антибиотикограммы штаммов из **Бурятии** также свидетельствуют о различиях устойчивости изолятов МБТ внутри субтипов Beijing CC1 и CC2, полученных от хронических больных и впервые выявленных случаев ТБ. В Таблице 5.5 приведено распределение лекарственной устойчивости изучаемой выборки штаммов.

Лекарственная устойчивость МБТ, выделенных от больных ТБ в Бурятии (абс.)

Генотип	Штаммы с различным проявлением лекарственной чувствительности к противотуберкулезным препаратам					
	Чувствительные	Монорезистентность	Полирезистентность	МЛУ	ШЛУ	Всего штаммов с тестом на лекарственную устойчивость
Beijing CC1	26	3	8	25	0	62
Beijing CC2	13	1	8	22	1	45
Beijing CC3	7	4	5	7	0	23
Beijing CC4	3	0	1	5	0	9
Beijing CC6	0	1	1	1	0	3
Beijing BL7	11	2	12	28	0	53
Beijing*	2	0	0	0	0	2
LAM	9	5	7	32	0	53
T	7	1	2	1	0	11
S	0	1	1	1	0	3
Haarlem	4	0	0	1	0	5
X	1	0	0	1	0	2
Ural	7	0	3	13	0	23
Uganda	1	0	1	0	0	2
orphan	1	0	0	0	0	1
H	3	0	0	3	0	6
Всего Beijing	59	12	35	87	1	194
Итого	96	20	50	139	1	306

*Неклассифицированные по клональным комплексам субтипы Beijing, по M. Merker (2015)

Значимое нарастание МЛУ среди штаммов Beijing BL7 (MIT 642) наблюдалось в группе больных с хроническим течением (15,4% - 23/149) по сравнению с первично устойчивыми изолятами (3,2% - 5/157) ($\chi^2=12,37$; $p=0,0004$). Риск формирования МЛУ в случае хронизации ТБ, вызванного Beijing BL7 (MIT 642), возрастает в более чем в пять раз (ОШ=5,549; 95% ДИ 2,051-15,017). Такая ситуация наиболее ярко проявляется при заражении современными эпидемическими штаммами Beijing CC1 и CC2, что наводит на мысль о сходстве механизмов циркуляции их и эндемичного для Бурятии Beijing MIT 642 (BL7). Обращает на себя внимание значимо более частая встречаемость МЛУ у эпидемических субтипов Beijing семейства (CC1, CC2 и BL7 (MIT 642)), по сравнению с минорными Beijing субтипами (Таблица 5.6). На фоне закономерного увеличения риска МЛУ при хронизации ТБ, выявленного как для общей совокупности штаммов, так и отдельно группы Beijing и non-Beijing (см. Таблица 5.2), иным образом проявляется генотип Ural. МЛУ штаммы этого генотипа, как и изоляты с другими проявлениями ЛУ, одинаково часто распределены у впервые выявленных больных и пациентов с повторными курсами лечения. Роль генотипа Ural в распространении МЛУ туберкулеза на территории стран бывшего СССР, остается не ясной. С одной стороны, этот генотип широко распространен в России и близлежащих странах (Mokrousov I., 2012) с другой стороны, штаммы этого генотипа маловирулентны и не вызывают смертельных исходов (Ogarkov O. et al., 2012). Можно предположить, что персистенция генотипа Ural в человеческой популяции часто протекает в виде конфекции, сопровождающейся «вытеснением» этих штаммов более вирулентными в процессе перехода туберкулеза в хроническую форму.

Таблица 5.6

МЛУ/ШЛУ штаммы МБТ различных генотипов/субтипов у больных ТБ из Бурятии

Генотип	количество млу штаммов от впервые выявленных больных, n=186	количество млу штаммов от больных хроническими формами, n=147	риск выявления млу при хронизации ТБ, ОШ	95% ДИ
Beijing CC1	7	18	2,58	1,40-8,16
Beijing CC2	6	17	2,83	1,45-9,40
Beijing CC3	5	2	0,40	0,09-2,53
Beijing CC4	2	3	1,50	0,31-11,23
Beijing BL7	5	23	4,60	2,39-17,43
LAM	10	22	2,20	1,34-6,50
Ural	5	8	1,60	0,64-6,23
Всего Beijing	23	66	2,87	3,16-9,35
Всего nonBeijing	17	32	1,88	1,40-4,99
Итого	40	97	5,46	3,33-8,93

В Иркутской выборке было описано два случая, а в Саха (Якутии) – один случай микст форм, то есть обнаружение двух генотипических вариантов МБТ, вызванной генотипом Ural и Beijing. Выявление в выборке штаммов из Бурятии показало наличие сочетания двух субтипов Beijing и Beijing/LAM (по три случая соответственно), и ни одного с генотипом Ural. В половине случаев микст включал сочетание с субтипом W148. Эти шесть случаев микст инфекции были выявлены от больных разнообразных анализируемых групп (новых случаев ТБ, хронических больных, из системы УФСИН и гражданского населения). В целом, частота обнаружения микст генотипов в выборке из Бурятии не превышала уровней других регионов - 1,78% (6/337) (Hanekom M. et al, 2013).

Из 377 штаммов МБТ из Саха (Якутии) для 351 изолята получена информация о лекарственной устойчивости. Распределение лекарственной устойчивости среди штаммов генотипа Beijing выявило значимое преобладание множественной и широкой лекарственной устойчивости у штаммов группы Beijing CC2 и в Саха (Якутии) (Таблица 5.7). Из 34 штаммов этого субтипа только четыре были чувствительны ко всем препаратам, 28 - МЛУ, остальные были полирезистентны.

Таблица 5.7

Характеристика МЛУ/ШЛУ штаммов генотипа Beijing в Саха (Якутии)

Генотип	К-во штаммов (абс.)	МЛУ/ШЛУ (%)	χ^2^*
Beijing CC2	34	28 (82,4)	48,7; p<0,001
Beijing CC1, CC3, CC4, orphan	128	23 (18,0)	

*- χ^2 с поправкой Йейтса

Таким образом, широкая распространенность двух основных субтипов Beijing в Саха (Якутии), несмотря на различия в лекарственной устойчивости, подтверждает их высокую трансмиссивность. Обнаруженное явление служит еще одним доказательством отсутствия прямой связи повышенной трансмиссивности MDR штаммов по сравнению с лекарственно-чувствительными (Borrell S et al., 2009). Это явление называют «ценой адаптации» (Borrell S, Gagneux S., 2004), которая варьирует в зависимости от мутаций к конкретным антибиотикам и от генетического фона популяции хозяина, который может модулировать приспособляемость возбудителя (Cohen T, et al., 2004).

В настоящем исследовании по результатам MIRU-VNTR типирования в Саха (Якутии) был обнаружен филогенетический куст семейства S с высокой частотой кластеризации (0,61), при отсутствии эпидемиологической связи между случаями заболевания, имевший наибольшую частоту МЛУ/ШЛУ - 79,6% (39/49) (Рисунок 5.2). Штаммы семейства S с МЛУ (35 случаев) и ШЛУ (4 случая) были выделены как от впервые выявленных больных (24/39), так и в случаях с рецидивами (2/3) и

хроническим течением ТБ (16/19). Наблюдалось значимое преобладание распространения МЛУ/ШЛУ у S-штаммов среди изолятов non-Beijing генотипов этой территории (Таблица 5.8). Роль изолятов семейства S в распространении МЛУ весьма необычна как для Северной Азии, так и для России, а также и в глобальном масштабе.

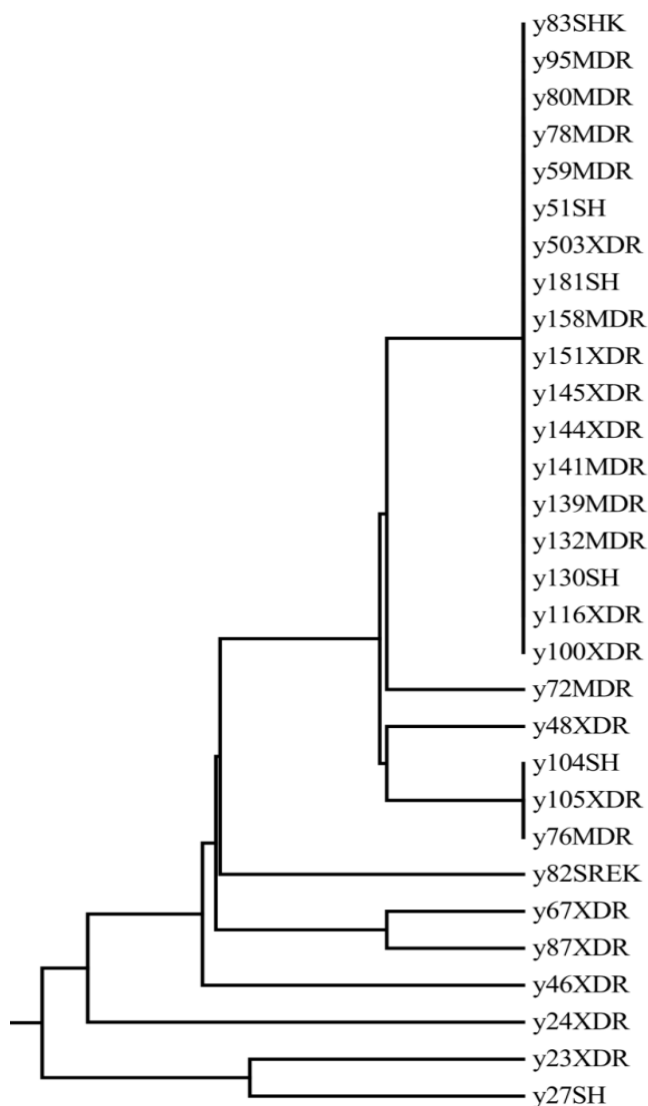


Рисунок 5.2. Развернутая ветвь штаммов генотипа S, циркулирующих на территории Саха (Якутии). Буквенные обозначения соответствуют MDR – множественная лекарственная устойчивость, XDR – широкая лекарственная устойчивость, R – устойчивость к рифампицину S – устойчивость к стрептомицину, H – устойчивость к изониазиду, K – устойчивость к канамицину

Распределение МЛУ/ШЛУ у штаммов генотипа S, среди nonBeijing у больных ТБ из Саха (Якутия)

Генотип	Количество штаммов (абс.)	МЛУ/ШЛУ (%)	χ^2^*
S	31	24(77,4)	59,8; p<0,001
Ural	18	0(0)	
Другие nonBeijing	85	8(9,4)	

* Штаммы семейства S по отношению к остальным nonBeijing семействам, χ^2 с коррекцией по Йетсу

5.2 Выборочные исследования мутаций, ассоциированных с резистентностью к противотуберкулезным препаратам

Молекулярно-генетическое определение мутаций, связанных с развитием устойчивости МБТ противотуберкулезным препаратам первого и второго ряда, были проведены в группе 49 штаммов из Иркутской области и Саха (Якутии). Выявленные мутации и их частоты представлены в Таблице 5.9. В ДНК изолятов МБТ из Иркутской области и Саха (Якутии) были обнаружены точечные мутации RRDR-региона *proB*-гена у 59,2% (29/49) изолятов с наиболее частой мутацией в кодоне 531 (Ser531Leu) – (42,9%; 21/49) случаев, сочетающейся с мутациями в одном из других кодонов у четырех штаммов: 456 (Val456Gly), 480 (Thr480Ile), 481 (Thr481Ala). Единичные штаммы были с мутациями в кодонах 511 (Leu511Pro), 513 (Gln513Lys), 516 (His516Tyr) и 533 (Leu533Pro), часто ассоциированные с лекарственно-чувствительными профилями. Доминирование устойчивости высокого уровня к рифампицину за счет мутации в кодоне 531, наблюдавшееся в исследуемой выборке (46,9% - 23/49), не в полной мере подтверждается данными фенотипической резистентности (32,7% - 16/49). То есть только в 16 из 23 случаев (69,6%) наблюдалось совпадение наличия замены в 531 кодоне *proB*-гена и

фенотипической устойчивости к рифампицину. Хотя эти различия не носили статистически значимого характера ($\chi^2=1,53$; $p=0,21$), выявленные расхождения свидетельствуют о том, что, хотя в большинстве случаев мутации 531 (Ser531Leu), присутствующие в гене *rpoB*, коррелируют с резистентностью к рифампицину (Campbell E.A. et al., 2001), следует принимать во внимание наличие других мутаций этого гена, в том числе вне RRDR, где мутация в кодоне 176 приводит к резистентности высокого уровня (Somoskovi A et al., 2001). В дополнение к мутациям в RRDR гена *rpoB*, трансмембранный эффлюкс насос может отвечать за 5% клинических рифампицин-резистентных штаммов МБТ без мутации в RRDR (Louw G.E. et al., 2001).

Таблица 5.9

Частота мутаций, обнаруженных в клинических штаммах *Mycobacterium tuberculosis*

Антибиотик	Выявленные в генах мутации	% мутаций среди фенотипически устойчивых штаммов	% мутаций в исследуемой выборке
Рифампицин	RRDR-регион <i>rpoB</i> -гена (Ser531Leu; Ser531Leu /Val456Gly; Ser531Leu/Thr480Ile; Ser531Leu/Thr481Ala; Leu511Pro; Gln513Lys; His516Tyr; Leu533Pro)	69,6 (16/23)	59,2 (29/49)
Изониазид	<i>katG</i> -ген(Ser315Thr Trp321Cys; Thr322Ala)	90,9 (30/33)	80,9 (34/42)
Этионамид	промотор-регион <i>inhA</i> (Т(-8)А;G(-13)Т;С(-15)Т)	50,0 (2/4)	15,4 (4/26)
Изониазид	Промотор-регион <i>inhA</i> (Т(-8)А;G(-13)Т;С(-15)Т)	15,3 (5/33)	11,9 (5/42)

Продолжение Таблицы 5.9

Антибиотик	Выявленные в генах мутации	% мутаций среди фенотипически устойчивых штаммов	% мутаций в исследуемой выборке
Этамбутол	<i>embB</i> -ген (Met306Val; Gly406Ala; Asp354Ala)	53,9 (7/13)	38,5 (15/39)
Аминогликозиды (амикацин, канамицин, ванкомицин)	<i>rrs</i> ген (A1401G; C1443G)	5,9 (1/17)	15,0 (6/40)
Аминогликозиды (канамицин)	Промотор-регион <i>eis</i> (G(-10)A; C(-12)T; C(-14)G; C(-15)G)	23,5 (4/17)	21,4 (9/42)

Устойчивость к изониазиду определялась заменами в кодоне Ser315 *katG*-гена, а также позициями -8, -13 и -15 региона *inhA*. Мутации в кодоне Ser315, формирующие устойчивость высокого уровня, выявлены в 80,9% (34/42) случаях. Замены в позициях -15 и -8 промоторного региона *inhA*, сопровождающие умеренно устойчивые штаммы, найдены в 6,3%. Полученные данные совпадали с результатами фенотипического теста на антибиотикорезистентность к изониазиду. Изменения в промоторном регионе *inhA* (C(-15)T и T(-8)A), которые могут придавать резистентность к этионамиду, совпадали с фенотипической устойчивостью в 22 случаях (84,6 %). Интактный *inhA* регион был выявлен у 15,4 % (4/26) у этионамид-чувствительных штаммов с мутациями Ser315 *katG*-гена.

Наиболее частая комбинация мутаций (*rpoB* 531-TTG и *katG* 315-ACC) была наиболее распространенной среди изолятов (22/49). Считают, что такое сочетание мутаций в *rpoB* и *katG* с низкой стоимостью приспособляемости МБТ (low-fitness-cost), по-видимому, облегчает повышенную способность передачи штаммов современных МЛУ вариантов возбудителя туберкулеза (Li QJ et al., 2017).

У 38,5% (15/39) изолятов были выявлены замены в трех наиболее часто обнаруживаемых локусах – Met306, Asp354 и Gly406 – *embB*-гена, что несколько ниже описываемого в других выборках российских и зарубежных штаммов (Mokrousov I., et al., 2002; Isola D., et al., 2005; Afanas'ev M.V., et al. 2007; Plinke C. et al., 2010). Вышеуказанные мутации обнаружены не только у фенотипически устойчивых к этамбутолу штаммов (53,9% -7/13), но и у чувствительных штаммов (34,6%- 9/26), что согласуется с результатами других работ (Isola D. et al., 2005; Plinke C. et al., 2010). При этом мутации в *embB*-гене у этамбутол-чувствительных штаммов (17,1%) встречались в комбинации с заменами в *katG*- гене и фенотипической устойчивостью к изониазиду, что может свидетельствовать о вероятности устойчивости и к этамбутолу у этой группы штаммов (Ahmad S. et al., 2010).

Резистентность к фторхинолонам у МБТ (49 изолятов) была обнаружена по наличию мутаций в *gyrA* гене в виде замены Ala90Val и Asp94Gly в двух случаях у впервые выявленных больных ТБ, и одной замены Asp94Ala у одного больного с рецидивом ТБ. В остальных случаях, как среди фенотипически устойчивых, так и среди чувствительных изолятов, определялась замена Ser95Thr в 95 кодоне *gyrA* гена, которая не связывается с формированием резистентности к фторхинолонам (Johnson R., et al., 2006). Привлекает к себе внимание наличие только трех вариантов мутаций в 90 и 94 кодонах, учитывая, что в *gyrA* гене, наблюдается широкий набор замен (Gly88Cys, Asp94Gly, Asp94His, Asp94Tyr и две двойные мутации Asp94Gly и Asp94Asn, Asp94Gly и Ala90Val). Это может быть объяснено более низким уровнем разнообразия замен в случае впервые выявленного ТБ, составляющего большую часть анализируемой группы, по сравнению с хроническим течением заболевания (Носова Е.Ю. и др., 2011).

Мутации *rrs* гена в исследуемых штаммах обнаружены у 29,4 % (5/17) канамицин-чувствительных изолятах и одного канамицин-устойчивого штамма в виде замен A1401G и C1443G. Присутствие описанных мутаций ни в одном случае не совпадали с наличием замен в *eis* гене. На этом фоне мутации в *eis* гене в виде G(-10)A, C(-12)T, C(-14)G, C(-15)G выявлены у 23,5% (4/17) устойчивых и у 18,5 %

(5/27) чувствительных штаммов к канамицину. Отсутствие перекрестных мутаций в *rrs* и *eis* генах позволило разграничить штаммы, устойчивые к канамицину и те, что устойчивы к канамицину и амикацину.

Обнаруженная средняя частота мутаций генов *katG*, *embB*, *rrs*, и промотор регионов *inhA* и *eis* генов среди фенотипически устойчивых штаммов отражает современную картину формирования лекарственно-устойчивых штаммов в России (Casali N. et al., 2014). Тем не менее, были выявлены отличия от данных других исследователей по частотам замен в *rpoB* и *gyrA* генах. В нашей выборке наличие доминирующих мутаций в популяции МБТ с МЛУ было на более низком уровне, чем характерное для других территорий с высоким распространением лекарственной устойчивости (Mokrousov I., et al., 2002; Isola D., et al., 2005; Afanas'ev M.V. et al. 2007; Sheng J. et al., 2008; Plinke C. et al., 2010). Не было выявлено статистически значимой связи присутствия мутаций в *embB*-гене с резистентным фенотипом ($\chi^2 = 0,33$, $p = 0,56$), редкими были мутации в *gyrA* гене. В последующих исследованиях нами была выявлено присутствие в образцах ДНК гетерорезистентных вариантов проанализированных штаммов. Данные, полученные на основе применения TaqMan карт с использованием параллельного высоко разрешающего мелтинг анализа сиквенс-специфическими зондами (TAC-NRM), свидетельствуют об обнаружении как ДНК с мутациями, ответственными за развитие устойчивости к определенному антибиотику, так и диких вариантов, сохраняющих чувствительность. Такие результаты были получены на основе использования анализа 40 мутаций, в генах/регионах *InhA*, *katG* (изониазид), *rpoB* (рифампицин), *embB* (этамбутол), *rpsL* (стрептомицин), *rrs* (стрептомицин, амикацин, канамицин, капреомицину), *eis* (канамицину), *gyrA*, *gyrB* (офлоксацин, моксифлоксацин) и *prnA* (пиразинамид) в одной реакции при использовании микрофлюидных технологий.

Таким образом, на территории Северной Азии наблюдается генотипическое разнообразие эпидемически значимых клонов семейства Beijing, отличающихся высокой частотой встречаемости МЛУ. Популяции возбудителя также

демонстрируют динамическую изменчивость микобактерий, связанную с географическими особенностями распространения субтипов МБТ. Так, субтип S MIT 256 обеспечивает МЛЮ на таком же высоком уровне, как Beijing CC2, в Саха (Якутии) и Beijing BL7 (MIT 642) - в Бурятии. На фоне широкого разнообразия MIRU-VNTR профилей лекарственно устойчивых изолятов доминирующего генотипа Beijing дополнительный вклад эндемичных вариантов возбудителя является отражением региональных характеристик популяций МБТ на изучаемых территориях и показателем напряженности эпидемиологической ситуации туберкулеза.

5.3 Апробация ПЦР-РВ экспресс метода выявления субтипа CC2/ W148 генотипа Beijing

Для облегчения выявления штаммов эпидемического субтипа W148 генотипа Beijing, проведена разработка экспресс метода в формате ПЦР-РВ. В основу разработки положена мутация, описанная M. Merker et al (2015), в виде динуклеотидной делеции в гене *kdpD*, обнаруженной только среди представителей субтипа Beijing CC2, в связи с чем предложено обозначение для этого субтипа как CC2/W148. После проведения развернутого биоинформационного поиска, направленного на подтверждение присутствия этой делеции в российских штаммах по БД GMTV был осуществлен дизайн нескольких вариантов праймеров и зондов для индикации вышеуказанной мутации. Дизайн метода не приводится в связи с подачей патентной заявки в Евразийское патентное общество.

Апробацию метода по обнаружению штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к W148 клону комплекса CC2 генотипа Beijing, первоначально провели на коллекции из 650 образцов геномной ДНК МБТ, извлеченной из исследуемой выборки (1658 штаммов) Северной Азии. Все образцы были подвергнуты ранее генотипированию по 24-локусам MIRU-VNTR и делеционному анализу по RD 105/207. Профили генотипа Beijing были определены на принадлежность к клональным комплексам CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, BL7 (Merker et al., 2015). Паттерны штаммов,

принадлежащих другим семействам, идентифицированы по открытым базам данным SITVIT и MIRUVNTRplus. Среди тестируемых штаммов были: 485 образца генотипа Beijing, из которых 235 образцов принадлежали клональному комплексу CC1, 161 – CC2, 39- CC3, 20- CC4, 2 –CC5, 4- CC6 и 24 – BL7. В группу тестируемых штаммов были также включены: 51 образец генотипа LAM, 45 образцов генотипа Ural, 69 образцов с уникальными профилями (Orphan), не принадлежащими ни к одному из известных генотипов, согласно данным SITVIT и MIRUVNTRplus, и не имеющих специфических для генотипа Beijing делеций (Рисунок 5.3).

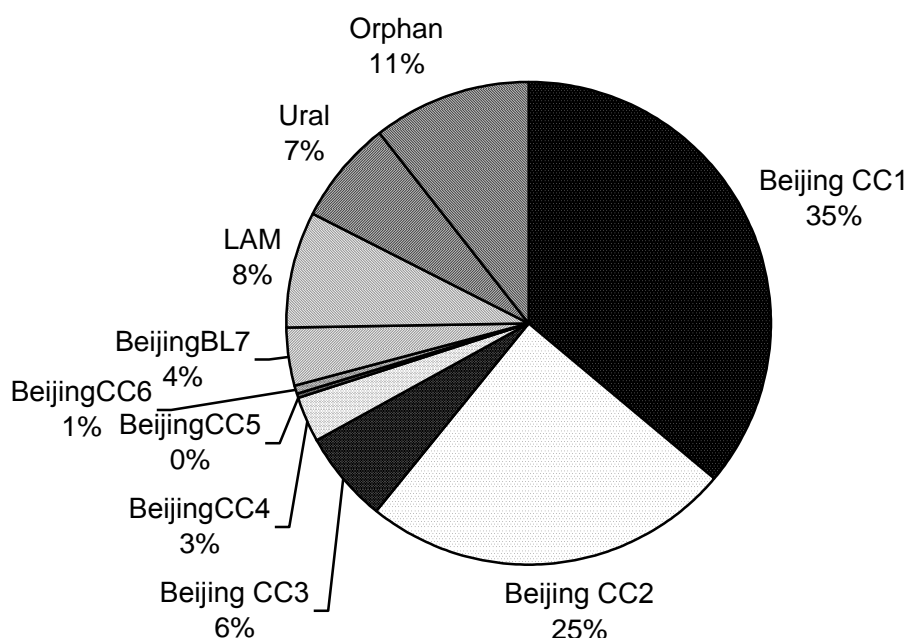


Рисунок 5.3 Распределение по генотипам/ субтипам используемых для апробации метода выявления CC2/W148 штаммов *M. tuberculosis*

Для определения специфичности предлагаемого метода обнаружения CC2/W148 субтипа генотипа Beijing по наличию делеции в гене *kdpD* было проведено сравнение полученных нами испытаний с результатами запатентованного аналога, использованного нами при субтипировании штаммов в разделе эпидемиологического мониторинга (глава 4). При этом результаты идентификации

двумя методами (определение динуклеотидной делеции в гене *kdpD* и выявление специфической для W148 клона инсерции инвертированной IS6110, расположенной в межгенной области Rv2664 и Rv2665 генов) полностью совпали. Таким образом, предлагаемый способ показал 100% специфичность определения W148 штаммов микобактерий туберкулеза генотипа Beijing. Результаты выявления CC2/W148 субтипа генотипа Beijing по наличию делеции в гене *kdpD* в выборке штаммов с известными генотипическими характеристиками представлены в Таблице 5.10.

Таблица 5.10

Частота выявления CC2/W148 штаммов генотипа Beijing *M. tuberculosis* среди изолятов различных генотипов/субтипов по наличию делеции в гене *kdpD*

Генотип, субтип	W148,%	nonW,%	Mix, %*	Всего штаммов, абс
Beijing, всего:	39,8	58,6	1,6	485
Beijing CC1	6,8	92,3	0,9	235
Beijing CC2	96,3	1,9	1,9	161
Beijing CC3	30,8	66,7	2,6	39
BeijingCC4	30,0	70,0	0,0	20
BeijingCC5	50,0	50,0	0,0	2
BeijingCC6	25,0	75,0	0,0	4
BeijingBL7	8,3	83,3	8,3	24
LAM	0,0	100,0	0,0	51
Ural	0,0	0,0	0,0	45
Orphan	0,0	0,0	0,0	69
Всего	29,7	69,1	1,2	650

Примечание: Mix- обнаружение в присутствии W148 еще одного генотипа/субтипа штаммов *M. tuberculosis*

Нами было обнаружено, что штаммы из североазиатской части России, относящиеся по 24 MIRU-VNTR локусным профилям Beijing CC2, в 95,7 % (155/162) имели специфическую делецию гене *kdpD* и инсерцию инвертированной

IS6110, указывающие на принадлежность к W148. Вместе с тем, среди штаммов других клональных комплексов (CC1, 3-6 и BL7) также были выявлены варианты W148 как апробируемым способом, так и уже ранее запатентованным, при полном совпадении результатов. Таким образом, метод выявления W148 изолятов генотипа Beijing по наличию динуклеотидной делеции в гене *kdpD*, в сопоставлении с результатами MIRU-VNTR-24 генотипирования и классификации по клональным комплексам, позволил выявить, что описываемые штаммы являются близкими, но не генетически идентичными вариантами *M. tuberculosis*, наиболее уместно объединяемые в клоновую группу W148.

Следует отметить, что количество микст генотипов, выявленных двумя методами (определение динуклеотидной делеции в гене *kdpD* и выявление специфической для W148 субтипа инсерции инвертированной IS6110) также совпадало в 100 %. Это свидетельствует о более высокой точности ПЦР-РВ теста на присутствие более, чем одного генотипа/субтипа штаммов, полученных из одного клинического образца больного туберкулеза, по сравнению с 24 MIRU-VNTR локусным генотипированием.

Отсутствие неспецифической реакции разработанного теста определяли с использованием 10 образцов ДНК, выделенных из клинических штаммов и относящихся к видам нетуберкулезным микобактериям. Разработанный нами тест дал во всех случаях отрицательный результат, подтверждающий полную видовую специфичность апробируемого метода. Таким образом, количество ложноположительных результатов равно нулю.

В целом, специфичность апробируемого метода, характеризуемая отсутствием ложноположительных результатов, и чувствительность, определяемая отсутствием ложноотрицательных случаев, составила 100%. Точность, определяемая соотношением истинно положительных + истинно отрицательных к сумме тестируемых двумя методами штаммов, также равна 100%.

Второй этап апробации проведен на 78 клинических образцах, включавших 69 образцов мокроты, 6 образцов ликвора, 3 биопсийных образца, полученных в ОГБУЗ Иркутской областной клинической туберкулезной больнице. Для апробации

метода клинические образцы были исследованы на наличие ДНК *M. tuberculosis* на генетическом анализаторе GeneXpert (США). При исследовании на анализаторе GeneXpert из 69 образцов мокроты 27 были положительны на ДНК *M. tuberculosis*, а 42 - отрицательны. Все образцы ликвора были отрицательны, среди 3-х биопсийных образцов один был положительным при исследовании на анализаторе GeneXpert. Исследование, проведенное апробируемым методом, выявило 28 положительных результатов на наличие ДНК *M. tuberculosis*, из которых 14 образцов содержали ДНК W148 субтипа генотипа Beijing и 14 образцов, содержащих ДНК других генотипов или субтипов. Все отрицательные образцы при исследовании на генетическом анализаторе GeneXpert были также отрицательны при исследовании предлагаемым способом (Таблица 5.11). Таким образом, чувствительность и специфичность и точность предлагаемого метода относительно референсного исследования на генетическом анализаторе GeneXpert составили 100%.

Таблица 5.11

Частота выявления ДНК *M. tuberculosis* из клинических образцов апробируемым и референс (на анализаторе GeneXpert) методами, абс

Образец/ результат тестов	Апробируемый тест			Генетический анализатор GeneXpert		Всего образцов
	CC2/ W148	nonW	«-»	«+»	«-»	
Мокрота	14	13	42	27	42	69
Ликвор	0	0	6	0	6	6
Биопсийный образец	0	1	2	1	2	3
Всего	14	14	50	28	50	78

Примечание: «-» - отрицательные результаты теста; «+» - положительные результаты теста

Параллельно сравнению апробируемого метода с референс тестом на GeneXpert из тех же клинических образцов были проведены посевы на среду Левенштейна-Йенсена. Культуры были получены в 21 случае, что составило 75 % от

положительных результатов ПЦР тестов (21/28). Из полученных культур была выделена ДНК, генотипирована по 24 локусам MIRU-VNTR, идентифицирована по базе данных MIRUVNTRplus и для штаммов генотипа Beijing классифицирована по клональным комплексам по Merker et al. (2015).

Результаты апробируемого теста и генотипирования ДНК выросших из клинических образцов культур показали полное соответствие. Во всех случаях (12 парных образцов ДНК), когда обнаружена в клинических образцах ДНК субтипа W148 генотипа Beijing, по ДНК из выросших культур идентифицированы штаммы субтипа CC2/W148 генотипа Beijing. В остальных положительных пробах клинических образцов, в которых была обнаружена ДНК *M. tuberculosis*, не относящаяся к субтипу W148 генотипа Beijing, выделенные штаммы, были также подвергнуты процедуре MIRU-VNTR генотипирования по 24 локусам (9 штаммов). Все эти образцы культур были отнесены к другим генотипам и субтипам, отличным от CC2/W148. В частности, 4 штамма принадлежали генотипу Beijing клонального комплекса CC1, три штамма относились к генотипу LAM, один - к генотипу Ural, и один штамм имел уникальный, не классифицируемый MIRU-VNTR профиль.

Сравнительные результаты экспресс теста клинических образцов и 24 локусного типирования полученных в дальнейшем культур *M. tuberculosis* обеспечили возможность расчета прогностической ценности апробируемого метода. Учитывая, что прогностическая ценность - это характеристика, которая зависит не только от чувствительности и специфичности, но и от распространенности эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing *M. tuberculosis* в исследуемой популяции, рассчитанная прогностичность положительного результата составляет 100%. То есть при положительных результатах апробируемого теста по клиническому образцу (обнаружение CC2/W148) обеспечивается 100% вероятность выявления из культуры ДНК того же субтипа генотипа Beijing.

Заключая выше изложенное, апробируемый метод выявления эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing *M. tuberculosis*, имеет высокие специфичность, чувствительность и точность (100%), обеспечиваемые выявлением уникальной

динуклеотидной делеции в гене *kdpD*. Эти показатели в дополнении с быстротой получения результатов (этап выделения ДНК и одна ПЦР РВ) делают пригодным тест для применения в практике эпидемиологического надзора туберкулеза, в частности, обеспечения мониторинга эпидемически значимых вариантов возбудителя туберкулеза.

ГЛАВА 6. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗЕРВУАРА ИНФЕКЦИИ ТУБЕРКУЛЕЗА, СОЧЕТАННОГО С ВИЧ ИНФЕКЦИЕЙ

6.1. Проявления эпидемического процесса ВИЧ-ассоциированного туберкулеза на изучаемых территориях Северной Азии

Сибирский и Уральский федеральные округа - крупные регионы Северной Азии характеризуются максимальными уровнями пораженности населения ВИЧ-инфекцией. По данным на 31.12.2016 года в Российской Федерации пятерку лидеров по числу зарегистрированных людей, живущих с ВИЧ инфекцией, возглавляет Свердловская (1647, 9 на 100 тысяч населения) и Иркутская (1636,0 на 100 тысяч населения) области. Показатель заболеваемости ВИЧ-инфекцией Иркутской области в 2016 году (163,6 на 100 тысяч населения) свидетельствует о сохранении лидирующих позиций также по уровням выявления новых случаев заболевания среди российских регионов (Справка, ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2016г). В Иркутской области порог 1% пораженности ВИЧ преодолен в 2008 году, а в 2016 году более 1,6 % населения живут с ВИЧ. Эта неблагоприятная ситуация по ВИЧ-инфекции, наряду с напряженной эпидемиологической обстановкой по туберкулезу, привели к развитию ко-эпидемии ВИЧ и ТБ в Сибири (Кощев М.Е. и др., 2011; Фролова О.П. и др., 2013; Розенберг В.Я. и др., 2014). В других регионах, изучаемых в настоящем исследовании, эпидемиологическая обстановка по ВИЧ-инфекции носит более благоприятный характер, в целом не превышая среднероссийских уровней заболеваемости и пораженности населения (Справка, ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2016г).

С целью эпидемиологической оценки величины резервуара сочетанной инфекции туберкулеза и ВИЧ-инфекции в изучаемом регионе проведен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости и пораженности ВИЧ-инфекцией и ВИЧ-ассоциированным туберкулезом. В Иркутской области рост

региональных показателей заболеваемости ВИЧ-инфекцией имел более интенсивные проявления с 1999 года, сохранившиеся по настоящее время. Первый эпидемический подъем заболеваемости в 1999-2001 годах, произошедший в Иркутской области был интенсивнее ($Me=130,7 \text{ ‰}$), чем в Бурятии ($Me=60,2 \text{ ‰}$), в Забайкальском крае ($Me=9,4 \text{ ‰}$) и Саха (Якутия) ($Me=7,5 \text{ ‰}$), что стало отражением быстрого формирования крупного очага инфекции в Сибири и расширения его в последующие годы (таблица 6.1).

Таблица 6.1

Многолетняя динамика заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и отдельных регионах СФО и ДФО в 1995–2016 гг.

Период, гг.	Показатель, ‰ (Me [ДИ 0,95])	Уравнение регрессии/R2	Средний темп прироста, %
Российская Федерация			
1995–1998	0,7[0,5–0,9]	$0,11x+0,4 / 0,97$	19,0
1999-2001	38,4[10,4-55,3]	$22,5x-10,2 / 0,98$	130,6
2002–2004	24,9[23,3-34,3]	$-5,5x+38,5 / 0,85$	-17,6
2005–2016	45,6 [21,7–69,4]	$3,2x+25,1 / 0,88$	9,0
Иркутская область			
1995–1998	0,2 [0,04–0,9]	$0,2x-0,4 / 0,75$	182,0
1999-2001	130,7 [124,7-172,5]	$3,0x+136,6 / 0,91$	2,4
2002–2004	73,2 [62,3–93,7]	$-10,3x+96,9 / 0,71$	-11,6
2005–2016	118,4 [73,1-163,6]	$6,2x+78,8 / 0,95$	5,0
Республика Бурятия			
1995–1998	0,1 [0,0–0,5]	$0,1x-0,2 / 0,58$	71,0
1999-2001	60,2[1,5–64,4]	$29,4x-16,7 / 0,69$	533,5
2002–2004	22,0 [19,6–32,2]	$-5,1x+34,8 / 0,58$	-17,3
2005–2016	47,0 [19,7-74,2]	$3,8x+21,0 / 0,97$	7,0
Республика Саха (Якутия)			
1995–1998	0,2[0,0–0,5]	$0,5x-0,7 / 0,76$	67,0
1999-2001	7,5 [4,5–16,2]	$1,5x+6,4 / 0,62$	29,4
2002–2004	4,4 [4,0–4,5]	$-0,1x+4,4 / 0,35$	-1,16
2005–2016	9,0 [3,1-14,8]	$0,8x+4,2 / 0,90$	8,0
Забайкальский край			
1995–1998	0,2 [0,0–0,4]	$0,1x-0,1 / 0,98$	59,0
1999-2001	9,4 [0,8–53,7]	$26,5x-31,7 / 0,87$	745,6
2002–2004	26,9 [22,2–30,4]	$-4,1x+34,8 / 0,99$	-14,7
2005–2016	33,8 [20,4–47,2]	$1,6x+21,7 / 0,71$	4,0

Примечание: Полужирный шрифт – статистическая значимость различий показателей РФ с аналогичными показателями анализируемых регионов

На протяжении всего анализируемого периода (1995-2016 гг.) динамика заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Иркутской области имела более интенсивный восходящий тренд (средний темп прироста 41,4 %) по сравнению с общероссийскими уровнями (средний $T_{пр} = 25,9\%$). В Бурятии и Забайкальском крае среднееголетние темпы прироста незначительно превышали общие по России показатели и составляли соответственно 35,8 и 33,1% в год, что в целом отразилось на синхронности с общероссийским трендом нарастания числа новых случаев ВИЧ-инфекции в этих двух регионах. На этом фоне Саха (Якутия) отличается более низким среднееголетним темпом прироста заболеваемости - 19,6 % в сравнении с другими территориями исследования (Рисунок 6.1).

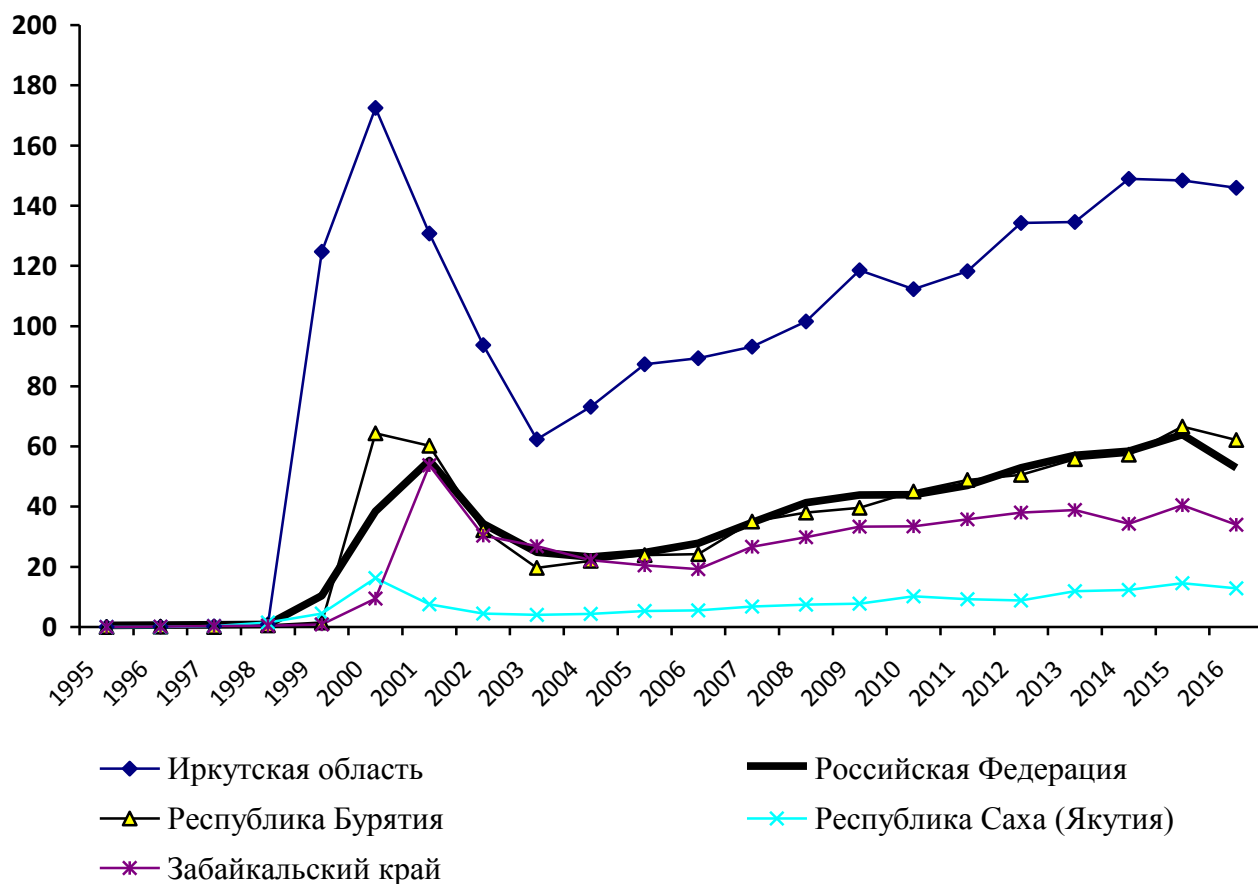


Рисунок. 6.1. Многолетняя динамика заболеваемости ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и отдельных регионах Северной Азии

Формирование крупного очага ВИЧ-инфекции в Сибири подтверждается также значимым превышением уровней пораженности населения Иркутской области по

сравнению с РФ и другими анализируемыми территориями. В Бурятии и Забайкальском крае уровень показателей сопоставим с данными по РФ, а в Саха (Якутии) – значительно ниже как по средней величине, так и по темпам прироста. По всем анализируемым территориям выявлено совпадение направлений движения показателей пораженности: число людей, живущих с ВИЧ неуклонно нарастает (Таблица 6.2).

Таблица 6.2

Многолетняя динамика пораженности ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и отдельных регионах СФО и ДФО в 1998–2016 гг.

Территория	Показатель, ‰ (Me [ДИ _{0,95}])	Уравнение регрессии/R ²	Средний темп прироста, %
Российская Федерация	273,0 [152,7–385,6]	30,2x–20,3 / 0,99	26,3
Иркутская область	837,3 [525,5–1132,4]	80,8x+39,6 / 0,99	16,0
Республика Бурятия	256,9 [157,2–363,6]	28,2x–11,67 / 0,97	22,1
Забайкальский край	236,1 [107,1–316,6]	21,7x–10,1 / 0,89	18,4
Республика Саха (Якутия)	52,3 [37,8–74,3]	13,8x–11,5 / 0,91	16,5

Примечание: Полужирный шрифт – статистическая значимость различий показателей РФ с аналогичными показателями анализируемых регионов

Эпидемиологический анализ многолетней динамики показателей ВИЧ-ассоциированного туберкулеза на территориях изучения проведен с разных стартовых точек в связи с отличиями в начале регистрации сочетанной патологии. Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом у ВИЧ-инфицированных

больных представлена на рисунке 6.2. В Иркутской области до 1999 года регистрировались единичные случаи туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией, в последующие годы число пациентов с ВИЧ-ТБ выросло и всего по данным на 31.12.2016 г. кумулятивно зарегистрировано 4101 случай активного туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией. Заболеваемость в Иркутской области 4-кратно превышает данные по России, в 2015 г. достигнув максимальной отметки $38,9^{0}/_{0000}$. В Бурятии, как и в Иркутской области, отмечено превышение федерального уровня числа новых случаев ВИЧ-ТБ уже с первых лет их учета. В Забайкальском крае, несмотря на смещение регистрации заболеваемости коморбидными инфекциями на более поздний период, ее показатели удерживаются на среднем уровне по России. И только в Саха (Якутии), где эпидемиологическая ситуация по туберкулезу имеет интенсивность проявления, подобно Иркутской области, заболеваемость сочетанными инфекциями характеризуется спорадическими случаями.

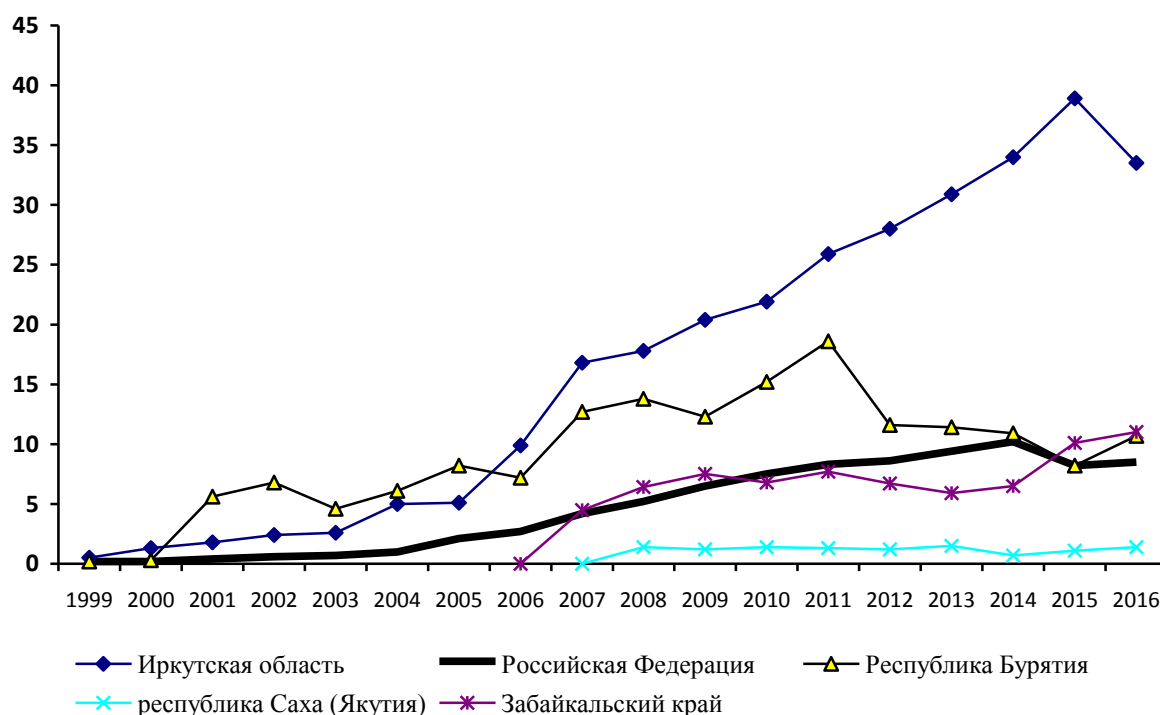


Рисунок 6.2 Многолетняя динамика заболеваемости туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и отдельных регионах СФО и ДФО в 1999–2016 гг

Тенденции роста заболеваемости коинфекциями в целом по РФ (средний $T_{пр} = 30,9\%$) и Иркутской области однонаправлены, но имеют разную интенсивность,

которая значимо выше в Сибирском регионе – средний темп прироста 36,4 % (Таблица 6.3) на фоне среднемноголетнего показателя 16,8⁰/₀₀₀₀. В Бурятии наблюдается снижение инцидентности коинфекции с 2011 г., но показатели этого года в Бурятии и РФ совпадают – 8,2⁰/₀₀₀₀. Динамические колебания заболеваемости ВИЧ ассоциированного туберкулеза в Забайкальском крае незначительно отличаются от федеральных уровней, а в Саха (Якутии) изменения годовых показателей находятся на стабильно низком уровне (1,3⁰/₀₀₀₀).

Таблица 6.3

Заболеваемость туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и отдельных регионах СФО и ДФО в 1999–2016 гг

Период, гг.	Показатель, ⁰ / ₀₀₀₀ (Me , [ДИ _{0,95}])	Уравнение регрессии / R ²	Среднегодовой темп прироста, %
Российская Федерация			
1999–2016	4,2 [0,7–8,2]	0,7x-1,6 / 0,92	30,9
Иркутская область			
1999–2016	16,8 [2,6–25,9]	2,4x-6,5 / 0,95	36,4
Республика Бурятия			
2001–2011	8,2 [6,8–15,2]	1,3x+2,4 / 0,86	19,4
2011–2016	11,4 [8,2–18,6]	-1,4x+16,9 / 0,78	-11,7
Республика Саха (Якутия)			
2008-2014	1,3 [0,8–1,8]	-0,02x+1,4 / 0,08	0,0
Забайкальский край			
2007-2011	6,8[4,3–9,3]	0,7x+4,5 / 0,71	14,4
2012-2016	7,2[3,1–11,3]	1,3x+4,2 / 0,75	7,4

Примечание: Полужирный шрифт – статистическая значимость различий показателей анализируемых регионов с аналогичными показателями РФ

Таким образом, выявлен крайне высокий рост интенсивности проявления эпидемического процесса сочетанной патологии на территории Иркутской области, где ВИЧ-инфекция характеризуется стадией концентрированной эпидемии.

Прогрессирование числа новых случаев ВИЧ ассоциированного туберкулеза в этом регионе привело к повышению удельного веса больных с ВИЧ-ТБ в структуре впервые выявленного туберкулеза, тенденция которого имеет усиливающийся характер ($y=2,5152x+1,127$; $R^2=0,91$) с ежегодным темпом прироста в 24,2%, приведшая в 2016 году к регистрации коинфекции ВИЧ у 30,2% больных с впервые установленным диагнозом туберкулеза (Рисунок 6.3). В Бурятии аналогичный показатель колебался лишь 6,9% в 2009 до 12,4 в 2016 году (Me= 10,3 95% ДИ [6.4-14.2]).

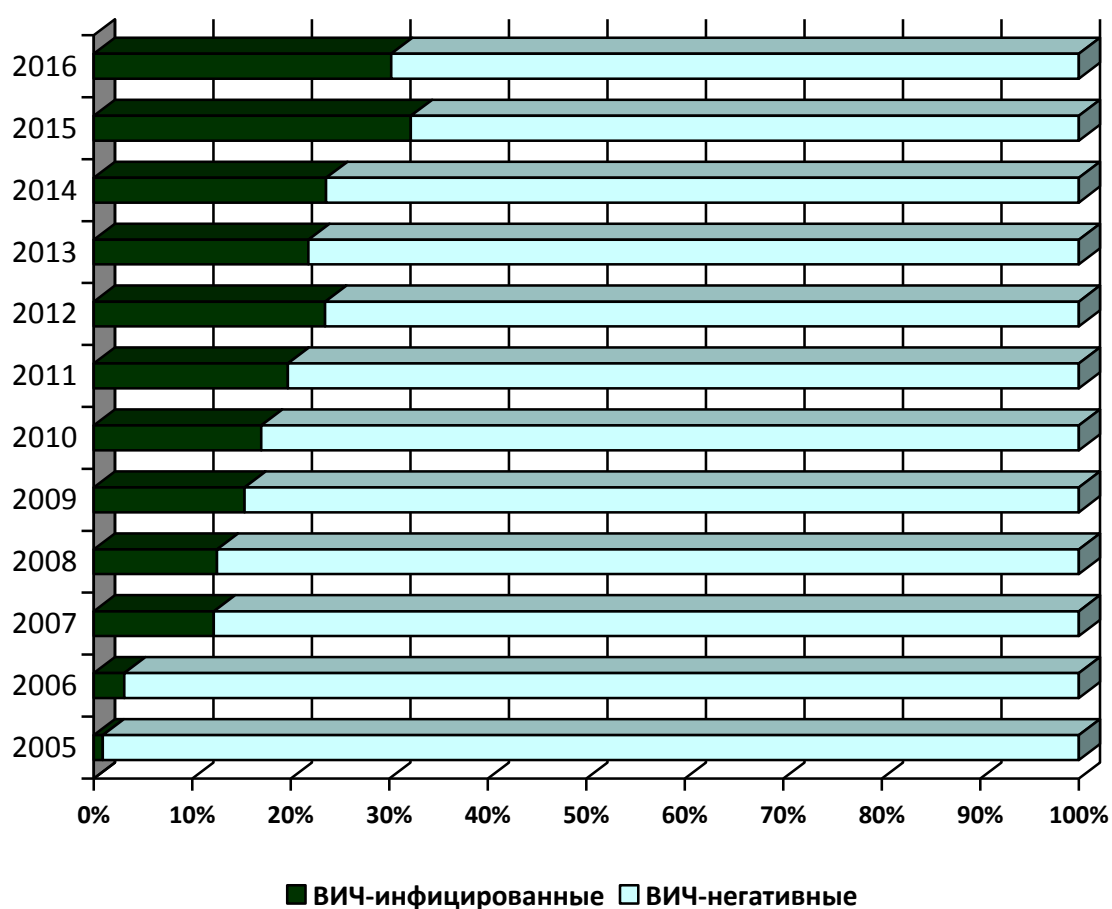


Рисунок 6.3 Удельный вес ВИЧ-ТБ инфекции среди впервые выявленных больных туберкулезом в Иркутской области за 2005-2016 гг (%)

Динамика распространенности ВИЧ-ассоциированного туберкулеза во всех регионах имеет восходящий тренд на разных уровнях ее значений. В Иркутской области наблюдается увеличение числа больных ВИЧ-ТБ, состоящих на

диспансерном учете, на протяжении всех анализируемых лет (рисунок 6.4).

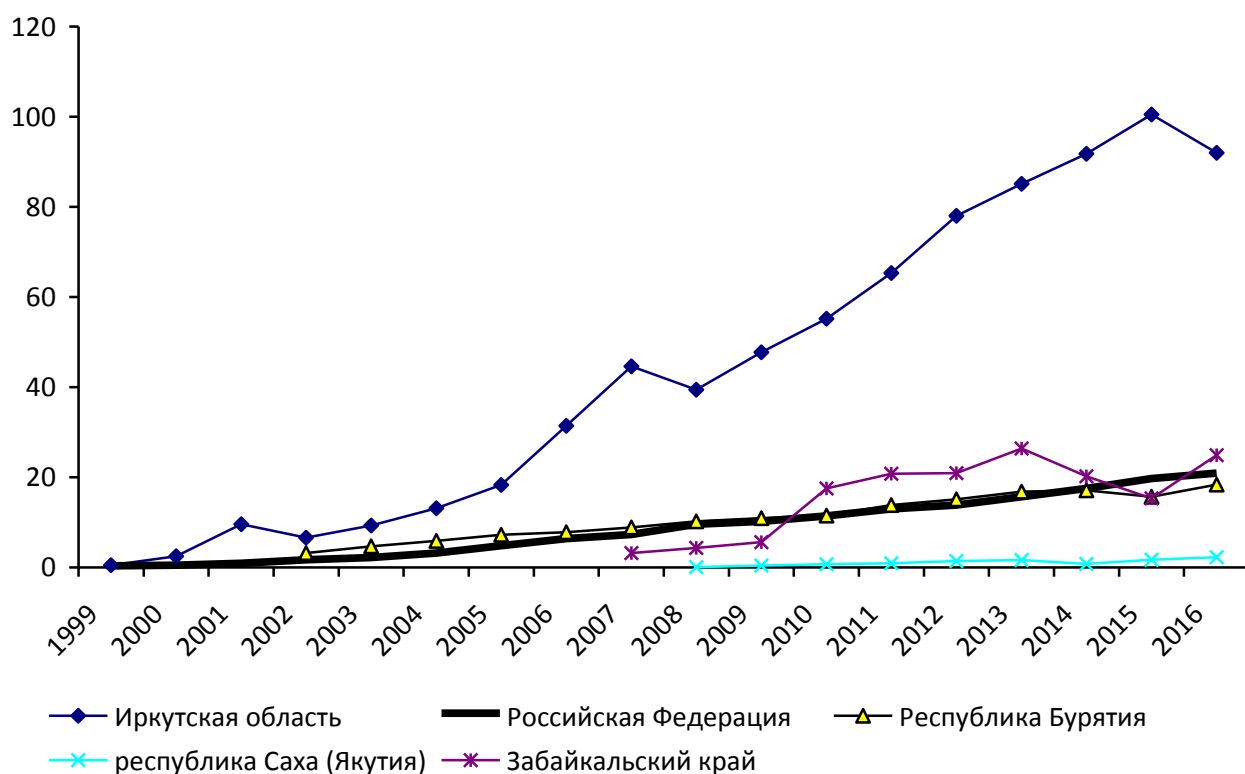


Рисунок 6.3 Многолетняя динамика распространенности туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и отдельных регионах СФО и ДФО в 1999–2016 гг

Анализ показателей смертности при сочетанной патологии проведен по суммарным данным без выделения нозологии, послужившей основной причиной смерти больных туберкулезом с ВИЧ-инфекцией за 2005-2016 гг. С учетом ограничения стартовых точек учета регистрации смертности динамика показателя при коинфекции ВИЧ-ТБ показана на рисунке 6.5. Региональные кривые смертности имеют разнонаправленный характер с общероссийским показателем, отрицательный темп прироста которого соответствует общему тренду смертности больных туберкулезом в этот период. Наиболее выраженное увеличение показателя выявлено в Иркутской области, которое имеет противоположную тенденцию по отношению к общему показателю смертности от туберкулеза в регионе. Таким образом, рост смертности у больных туберкулезом, коинфицированных ВИЧ на территории концентрированной эпидемии (Иркутской области) указывает на явное влияние

распространения ВИЧ-инфекции на течение связанного с ней эпидемического процесса туберкулеза.

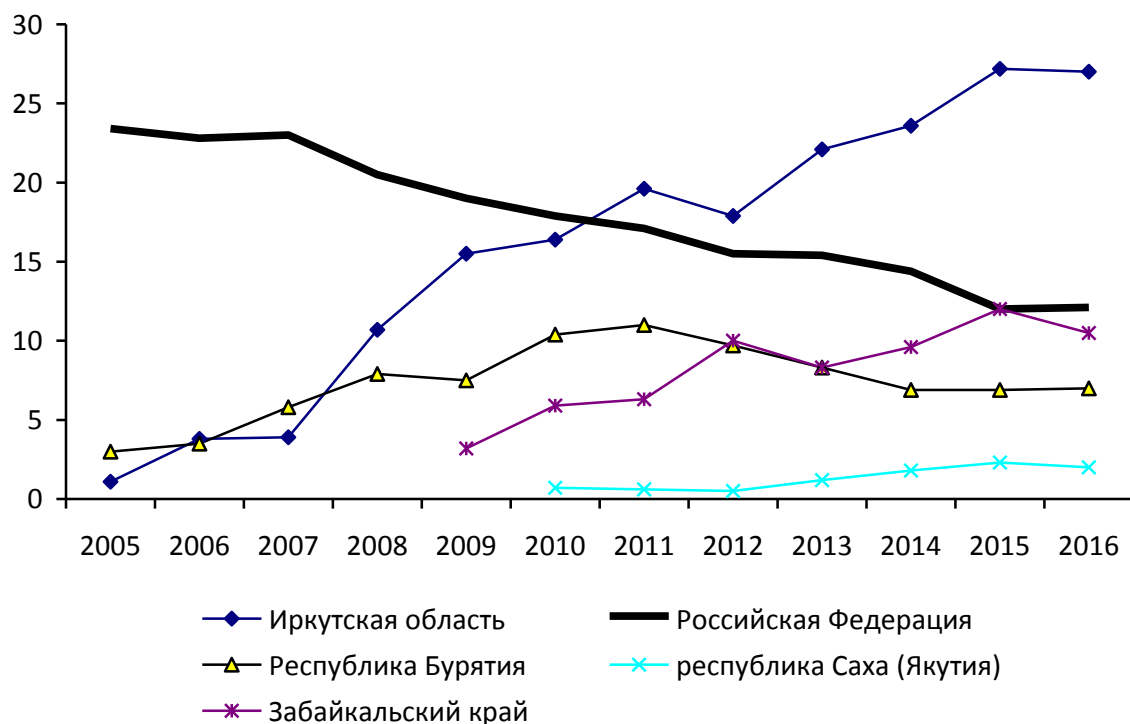


Рисунок 6.4 Многолетняя динамика смертности от туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией в Российской Федерации и отдельных регионах СФО и ДФО в 2005–2016 гг

В Иркутской области выявлена неуклонная прогрессия смертности ($R^2=0,95$) при коинфекции с крайне высоким средним темпом прироста (34,2%) на фоне противоположной тенденции в РФ. Разрыв значений показателей ежегодно увеличивается (в 2015 г. – в Иркутской области смертность $27,2^{0}/_{0000}$, в РФ – $12,0^{0}/_{0000}$, а в Бурятии – $6,9^{0}/_{0000}$, Забайкальском крае – $12,0^{0}/_{0000}$. В Бурятии наблюдается смена тренда после 2011 года, а в Забайкалье – его стабилизация. В Саха (Якутии) уровни смертности от туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией удерживаются на уровнях $1,2 [0,6-3,0]^{0}/_{0000}$ (Таблица 6.4).

Смертность при коинфекции ВИЧ и туберкулез в Российской Федерации и отдельных регионах СФО и ДФО

Период, гг.	Смертность, ‰ (Me, [ДИ _{0,95}])	Уравнение регрессии / R ²	Среднегодовой темп прироста, %
Российская Федерация			
2005– 2016	18,6 [15,4–23,6]	-1,2x+25,3 / 0,97	-5,8
Иркутская область			
2005– 2016	15,7 [3,8–22,1]	2,6-0,8 / 0,94	34,2
Республика Бурятия			
2005– 2011	7,5 [3,0–11,0]	1,4x+1,4 / 0,96	26,2
2011– 2016	8,2 [6,9–11,5]	-1,1x+11,9 / 0,94	-14,0
Республика Саха (Якутия)			
2010- 2016	1,2 [0,6-3,0]	0,3x-0,1 / 0,81	19,1
Забайкальский край			
2009- 2016	8,9 [3,3-14,6]	1,1+3,4 / 0,81	18,5

Примечание: Полужирный шрифт – статистическая значимость различий показателей анализируемых регионов с аналогичными показателями РФ

Таким образом, на основе результатов ретроспективного эпидемиологического исследования было выявлено, что в анализируемом регионе Северной Азии существует крупный резервуар сочетанной инфекции туберкулеза и ВИЧ, образованный преимущественно за счет двух территорий – Иркутской области и Бурятии. Переход эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в стадию концентрированной эпидемии в 2011 году на фоне интенсивного характера

динамики показателей туберкулеза в Иркутской области в этот же период создал критические условия накопления и распространения коинфекции среди населения, в 2015 году достигнув показателя 100,5 на 100 тысяч населения. К 2016 году в Иркутской области среди впервые выявленных случаев ТБ почти каждый третий пациент был с ВИЧ-инфекцией (30,2%). В Бурятии распространение сочетанной патологии происходило более медленными темпами и достигло менее интенсивных уровней к 2016 году – 18,4 на 100 тысяч населения. В Забайкальском крае проявляются близкие к среднероссийским тенденции роста заболеваемости и распространенности сочетанной инфекции, а в Саха (Якутии) сохраняются низкие уровни показателей ВИЧ-ТБ, что свидетельствует о сохранении изолированности двух эпидемических процессов.

6.2 Изучение роли различных генотипов *M. tuberculosis* в распространении сочетанной патологии ВИЧ-ТБ на изучаемых территориях

В настоящем разделе работы проведены когортные исследования генетической гетерогенности возбудителя в группах больных туберкулезом с наличием ВИЧ-инфекции (190 больных) и без нее (164 пациента). Половозрастная структура групп после стратификации по возрасту представлена в главе 2, Таблица 2.2. Впервые выявленный ТБ составлял две трети случаев (66,1% - 234/354) без значимого отличия в сравниваемых группах (Таблица 6.5). Частота хронических и рецидивирующих форм туберкулеза также не имела значимых различий ($\chi^2=1,82$ $P=0,403$).

Таблица 6.5

Распределение когортных групп исследования по типу выявления туберкулеза, абс (%)

Когорты исследования	ВИЧ-ассоциированный ТБ	ТБ без ВИЧ-инфекции	Общее
Впервые выявленные	124 (65,3)	110(67,1)	234 (66,1)
Хронические	62 (32,6)	47 (28,7)	109 (30,8)
Рецидив	4 (2,1)	7 (4,3)	11 (3,1)
Всего	190	164	354

Чаще всего развитие клинически активных форм туберкулеза происходило на фоне уже зарегистрированной ВИЧ-инфекции (125/190), чем при одновременном диагностировании заболеваний - 34,2 % (65/190) проанализированных нами случаев, что отражает общую динамику развития сочетанной патологии в изучаемом регионе, но не России в целом (Рахманова А. и др., 2012; Шальмин А. и др., 2014) (Таблица 6.6)

Таблица 6.6

Распределение больных ВИЧ-ассоциированным ТБ по времени установления диагнозов ВИЧ-инфекции и туберкулеза, абс

Группы пациентов	Диагноз ВИЧ-инфекции до развития ТБ	ВИЧ-инфекция при установлении диагноза ТБ	Общее
Впервые выявленные	86	38	124
Хронические	35	27	62
Рецидив	4	0	4
Всего	125	65	190

МЛУ/ШЛУ-ТБ был выявлен у 46,9% (89/190) больных сочетанной инфекцией, треть из которых были пациенты с первым эпизодом лечения ТБ – 37,1% (33/89). Аналогичные показатели в группе больных туберкулезом с отрицательным ВИЧ-статусом имели некоторые отличия. В частности, доля МЛУ/ШЛУ была значительно ниже – 30,4% (50/164) в контрольной группе ($\chi^2=9,20$ $P=0,0012$) (Таблица 6.7). Рассчитанный относительный риск ($RR= 1,53$) указывает на то, что частота МЛУ ТБ в основной группе больше, чем в контрольной, т.е. риск заболеть ТБ с МЛУ у ВИЧ-инфицированных больше, чем при ее отсутствии. Данные результаты дают основания считать ВИЧ-инфекцию фактором риска развития МЛУ-ТБ.

Таблица 6.7

Лекарственная устойчивость МБТ, выделенных от больных туберкулезом, сочетанным и без ВИЧ-инфекции

Группы пациентов/ Лекарственная устойчивость МБТ	ТБ без ВИЧ		ВИЧ ассоциированный ТБ		Общая выборка	
	абс	%	абс	%	абс	%
чувствительные	32	19,5	29	15,3	61	17,2
монорезистентные	25	15,2	17	8,9	42	11,9
полirezистентные	25	15,2	32	16,8	57	16,1
МЛУ	46	28,0	78	41,1	124	35,0
ШЛУ	4	2,4	11	5,8	15	4,2
без теста на ЛЧ	32	19,5	23	12,1	55	15,5
всего	164	100	190	100	354	100

На других территориях РФ в подобного рода исследованиях частота первичной МЛУ у пациентов с сочетанной патологией в последние годы достигла еще больших показателей, значимо превышая уровни МЛУ-ТБ у больных моноинфекцией туберкулеза (Пьянзова Т. и др., 2014; Маркелов Ю. и др., 2016; Корецкая Н. и др., 2014). В исследуемых нами когортах значимых различий частоты первичной МЛУ не было обнаружено ($\chi^2=0,093$ $P=0,0761$).

Проблема низкой приверженности к лечению и ТБ и ВИЧ-инфекции у больных на стадии прогрессирования заболеваний, требующей длительного постоянного приема препаратов, является краеугольным камнем на пути достижения эффективного результата терапии (Зими́на В. и др., 2010; Эйсмонт Н. и др., 2013; Мордык А. и др., 2015; 2016). В исследуемой нами группе пациентов с ВИЧ-ТБ, находившихся на стационарном этапе лечения, был установлен чрезвычайно низкий уровень приверженности в ВААРТ - только 21,1% (40/190) получали терапию, несмотря на наличие показаний у большинства больных. Уровень CD4 лимфоцитов был менее 200 клеток/мл у 71,1% (135/190). Причем, не было выявлено значимых различий по уровням CD4 у пациентов, получающих ВААРТ, и больных ВИЧ-ассоциированным ТБ без ВААРТ (критерий Манна Уитни, $P=0,561$). Это может быть связано с недавним стартом терапии, так как показатели вирусной нагрузки у пациентов, принимающих препараты ВААРТ на фоне низких показателей CD4 были значительно ниже, чем у пациентов ВИЧ-ТБ без ВААРТ (критерий Манна Уитни, $P=0,014$). В целом средняя вирусная нагрузка (Me) 395433 с интерквартильным размахом (22000-650000) геном-эквивалентов/мл свидетельствует о повышенном риске неблагоприятного исхода лечения туберкулеза у таких больных (Мордык А. и др., 2015) (Таблица 6.8).

Показатели прогрессирования ВИЧ-инфекции в больных с сочетанной патологией

Группы	Пациенты на ВААРТ, n=40		Пациенты без ВААРТ, n=150	
	Me	интерквартильный размах (25-75%)	Me	интерквартильный размах (25-75%)
СД4, клеток/мл	99	23-367	88	28-341
Вирусная нагрузка, геном- эквивалентов/мл	382701	75000-930000	6510	20-813000

Основными причинами, препятствующими своевременному началу ВААРТ в период нахождения в туберкулезной больнице, были: отказ больного от лечения ВИЧ-инфекции (65/150) прерывание стационарного противотуберкулезного лечения пациентом (24/150), и наступление летального исхода до старта ВААРТ (22/150). В результате перечисленных причин только 23,3 % (35/150) включенных в анализ ВИЧ-ТБ больных, ранее не лечившихся, начали ВААРТ во время госпитализации по поводу ТБ.

Создавшаяся ситуация привела к тому, что из 190 обследованных пациентов, 22,1% (42/190) умерли, 15,3% (29/190) прервали лечение, и 11,1% (21/190) не показали микробиологического или рентгенографического улучшения к окончанию интенсивной фазы лечения. К тому же, пациенты с тяжелыми и распространенными формами туберкулеза - фиброзно-кавернозным ТБ и ТБ центральной нервной системы (ЦНС) значительно чаще имели неблагоприятные исходы (ОШ 7,4 [2,3-23,7] $p = 0,001$) и (ОШ 6,5 [1,2-36,1] $p = 0,03$), соответственно.

Полученные нами в настоящем исследовании результаты соответствуют общим тенденциям результативности лечения туберкулеза больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции (Гавриленко В. и др., 2011; Зимина В. и др., 2014; Беляков Н. и др., 2016; Нечаев В. и др., 2016; Синицын М. и др., 2016; Новицкая О. и др., 2016).

Недостаточная эффективность лечения больных сочетанной патологией ВИЧ-инфекции с туберкулезом, сопровождающаяся не только высокой летальностью, особенно при присоединении МЛУ, но и сохранением бактериовыделения более чем у половины пациентов, покинувших специализированный стационар, создает дополнительный резервуар инфекции.

Другой оценкой опасности больных ВИЧ-ассоциированным ТБ, как источника инфекции, является разнообразие генотипов МБТ, которые, вызывая клинически выраженные формы ТБ у иммунокомпromетированных, могут расширять свои биологические ниши. Генетический спектр МБТ, выявляемый у ВИЧ-инфицированных лиц, ранее считающийся более широким (Gagneux, S. et al., 2006), может быть сравним с выявляемым среди ВИЧ-отрицательных лиц. В ряде последних исследований описано, что генетическое разнообразие МБТ у ВИЧ-ТБ больных было близким общей региональной популяции возбудителя (Adams L. et al., 2012; Cohen T. et al., 2012, Mustafa S. et al., 2016). Выше описанные данные согласуются с материалами, полученными нами в диссертационной работе.

В исследуемых группах пациентов были получены ДНК изолятов МБТ и проведена оценка генетической гетерогенности. Данные этого раздела исследования (Таблица 6.9) свидетельствуют о высокой доле генотипа Beijing (59,0%) и МЛУ/ШЛУ в выборке штаммов, полученных от ВИЧ-инфицированных бактериовыделителей МБТ, не имеющей значимых различий от группы больных с монотуберкулезом. Спектр полученных генотипов значимо не отличается от полученных по изучаемому региону данных. При этом доля субтипа Beijing СС2 составила 23,1%, что может свидетельствовать о распространении его как среди ВИЧ-инфицированных, так и в общей популяции, и об общих тенденциях активной трансмиссии эпидемически активного варианта возбудителя.

Распределение изолятов МБТ по основным генотипам и МЛУ у ВИЧ-позитивных и негативных больных ТБ (абс; %)

Характеристика изолятов	ВИЧ-позитивные (n=190)	ВИЧ-негативные (n=164)	χ^2 ; p
МЛУ/ШЛУ	89 (46,8%)	50 (30,2%)	10,913; p=0,0002
Генотип Beijing	127(65,8%)	113 (68,9%)	0,090; p=0,764
Субтип CC2 генотипа Beijing	28 (22,0%)	27 (16,5%)	0,090 p=0,764
Генотип LAM	31 (16,1%)	18(11,0%)	1,684; p=0,195
Генотип Ural	5 (2,3%)	8(4,5%)	0,664; p=0,415
Общее количество микст-генотипов	15 (7,8%)	1 (0,6%)	9,203; p=0,002
Количество микст-генотипов с W148	8 (4,1%)	0 (0%)	5,287; p=0,021

У больных ВИЧ инфекцией, сочетанной с ТБ, в изучаемом регионе был выявлен более высокий уровень распространённости микст-генотипов (15/193 - 7,8%), чем в среди ВИЧ-негативных пациентов с ТБ. Особенно это проявилось при сравнении данных по микст генотипам у ВИЧ-инфицированных с результатами общей выборки по региону исследования (Таблица 6.10). Дополнительное сравнение было проведено в связи с спорадическими случаями выявления микст генотипов у больных монотуберкулезом. Среди 1269 штаммов, полученных от больных ТБ с отсутствием ВИЧ, было выявлено 18 микст -генотипов, что составило только 1,4%. Вместе с тем, выявленная нами частота обнаружения микст генотипов у ВИЧ-ТБ больных не превышает уровней, полученных в других популяциях (Dickman K. et al., 2010; Behr M. et al., 2014; Shin S. et al., 2014).

Таблица 6.10

Распределение исследуемых изолятов МБТ в регионе Северной Евразии среди ВИЧ-положительных и отрицательных больных ТБ по основным генотипам и лекарственной устойчивости (абс; %)

Характеристика изолятов	Региональные результаты		χ^2 ; p
	ВИЧ-положительные (n=190)	ВИЧ-отрицательные (n=1269)	
МЛУ/ШЛУ	89 (46,1%)	432 (34,0%)	10,1; p<0,01
Генотип Beijing	127(65,8%)	780 (61,5%)	1,4; p=0,24
Субтип CC2 генотипа Beijing	28 (22,0%)	210 (16,5%)	2,5 p=0,11
Генотип LAM	31 (16,1%)	142(11,2%)	3,4; p=0,07
Генотип Ural	5 (2,3%)	72 (5,7%)	2,1; p=0,14
Общее количество микст-генотипов	15 (7,8%)	18 (1,4%)	30,7; p<0,01
Количество микст-генотипов с W148	8 (4,1%)	6 (0,47%)	20,1; p<0,01

В условиях широкого распространения успешного варианта генотипа Beijing генотипическая структура микст случаев может являться косвенным свидетельством повторного заражения больных ВИЧ-ТБ новым, и, вероятно, более вирулентным штаммом. В исследуемых регионах большая часть смешанных генотипов несла лекарственно-устойчивый субтип W148 (8/193 - 4,1%), что может означать эпидемическое распространение этих штаммов в группе больных ВИЧ-ТБ. Число смешанных генотипов значительно превышает число микст-культур, выявленных от ВИЧ-отрицательных больных ТБ (18/1269 - 1,4%). Обнаружение микст-генотипов в образцах, согласно ряду исследований, ассоциировано диссеминацией ТБ и развитием МЛУ на протяжении одного или нескольких эпизодов лечения (Adams L.V., et al., 2012; Click E.S., et al., 2012; Zetola N.M., et al., 2014).

В изучаемом регионе выявлено, что микст-изоляты у больных ВИЧ-ассоциированным туберкулезом значимо чаще сопровождали генерализованные случаи, по сравнению с легочными формами инфекции ($\chi^2=5,4$; $p=0,03$). При этом ВИЧ-ТБ больные, пораженные микст-генотипами, имели крайне низкий уровень CD4 клеток (менее 100), что ассоциировалось с тяжелым течением ТБ и смертельным исходом ($\chi^2=7,2$; $p<0,01$), по сравнению с больными, пораженными моно-генотипом ТБ.

Таким образом, каждый четырнадцатый случай заболевания туберкулезом, требующий стационарного лечения, у ВИЧ-инфицированных на изучаемой нами территории сопровождался выявлением микст-генотипа, в большинстве случаев фенотипически проявляющийся как МЛУ или ШЛУ-ТБ. Следует отметить, что большинство выявленных микст-генотипов у ВИЧ-инфицированных представляло собой смесь субтипа Beijing CC2 и генотипа LAM или субтипа Beijing CC2 и иного субтипа, относящегося также к генотипу Beijing. Наиболее логичным объяснением этого явления (значимо большее количество микст-генотипов у ВИЧ-ТБ больных) является предположение о возможном распространении явления нозокомиального суперинфицирования ВИЧ-ТБ больных, поступивших на лечение в противотуберкулезные учреждения, наиболее трансмиссивным вариантом возбудителя ТБ (W148 клонального комплекса CC2 генотипа Beijing). Другими словами, несмотря на то, что в рамках проведенного исследования не выявлено значимых различий в спектрах генотипов у ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных больных ТБ, имеющиеся факты распространенности микст-генотипов с CC2/W148 могут свидетельствовать о возможности нозокомиального распространения этого субтипа среди ВИЧ-ТБ инфицированных. Полученные данные согласуются с описанной вспышкой нозокомиального МЛУ туберкулеза, вызванной штаммами этого субтипа в С-Петербурге (Narvskaya O. et al., 2002).

Мы оценили связь МЛУ среди больных ВИЧ-ТБ с эффективностью интенсивной фазы лечения по данным нашего когортного исследования. На момент выписки из стационара прекращение бактериовыделения было отмечено только у 65,2 % ВИЧ-негативных больных ТБ и 57,4 % пациентов с ВИЧ-ассоциированным

ТБ. Основной причиной вынужденной выписки в случаях сохранения бактериовыделения были несанкционированный уход из стационара и нарушение режима лечебного учреждения вследствие употребления психоактивных веществ - 24,4 % (40/164) в группе больных ТБ и 18,4% (35/190) - среди пациентов с ВИЧ-ассоциированным ТБ (Таблица 6.11).

Таблица 6.11

Клинико-эпидемиологические данные исходов стационарной фазы лечения у больных ТБ и пациентов с различным ВИЧ-статусом, абс. (%)

Характеристика изолятов	ВИЧ-позитивные (n=190)	ВИЧ-негативные (n=164)	χ^2 ; p
Общая характеристика			
Прекращение бактериовыделения	109 (57,4)	107(65,2)	1,976 P=0,169
Сохранение бактериовыделения	46 (24,2)	47 (28,7)	0,684 P=0,408
Смерть	35 (18,4)	10 (6,1)	10,962 P=0,0005
МЛУ ТБ			
Прекращение бактериовыделения	49 (55,1)	26 (52,0)	0,029 P=0,863
Сохранение бактериовыделения	18 (20,2)	18(36,0)	3,370 P=0,066
Смерть	22 (24,7)	6 (12,0)	2,477 P=0,116

Оценка исходов пациентов с МЛУ ТБ свидетельствует, что половина пациентов в изучаемой когорте имели эффективный результат и прекратили бактериовыделение к концу стационарной фазы лечения (см. Таблица 6.11). Вследствие нарушения режима или несанкционированного ухода каждый четвертый

- пятый больной с МЛУ-ТБ в наблюдаемых когортах, сохраняя бактериовыделение, покидали стационар, создавая условия распространения возбудителя ТБ.

Таким образом, нами выявлено преобладание штаммов генотипа Beijing среди больных ВИЧ-ТБ коинфекцией, распределение по субтипам которых близко общей структуре популяции МБТ в изучаемом регионе. Успешность распространения эпидемических вариантов генотипа Beijing на фоне высоких показателей первичной и вторичной антибиотикорезистентности возбудителя и увеличения группы ВИЧ-инфицированных в регионе создали благоприятные условия для расширения и сохранения устойчивого резервуара МБТ.

ГЛАВА 7. МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ КЛОНОВ *M. TUBERCULOSIS* НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРНОЙ АЗИИ

7.1 Моделирование распространения эпидемически значимых клонов *M. tuberculosis* в Северной Азии по молекулярно-генетическим данным

Обнаруженная нами частота встречаемости генотипа Beijing (43,0 %) в Саха (Якутии) является наименьшей среди других регионов Северной Азии и России в целом (Огарков О.Б. и др., 2007; Kovalev S.Y., et al., 2005; Afanas'ev M.V., et al., 2007; Dymova M.A., et al., 2011; Mokrousov I, et al., 2012; Mokrousov I., 2013). К тому же индекс генетического разнообразия по всем исследованным локусам субтипов Beijing в этом регионе был значительно ниже по сравнению с общей выборкой. По всей видимости основной причиной этого феномена является «эффект основателя», связанный с исторически недавним заносом МБТ генотипа Beijing на территорию Саха (Якутия). При этом доминирующая распространенность двух эпидемических субтипов Beijing в Саха (Якутии) – СС1 и СС2 подтверждает их высокую трансмиссивность. Следует также отметить значимые различия в распространенности МЛУ среди этих субтипов ($\chi^2=8,665$; $p<0,01$). Интересно, что как в большинстве исследуемых нами регионов, так и на европейских и западносибирских территориях страны наблюдается сходная картина. Субтип СС2 генотипа Beijing значимо чаще несет МЛУ чем субтип СС1, или как минимум имеется соответствующий тренд (в зависимости от масштабности исследования). Тем не менее, углубленный анализ исходов туберкулеза более 2500 случаев, вызванных различными генотипами в Самаре свидетельствует, что помимо наличия МЛУ/ШЛУ, одним из важнейших факторов развития неблагоприятных исхода

туберкулеза у ВИЧ-негативных больных была принадлежность штаммов к субтипам CC1 и CC2 (Balabanova Y. et al., 2015).

Филогенетический анализ профилей CC1 в сопоставлении с данными глобальной базы Beijing M. Merker et al (2015) позволил установить, что подобные выявленным нами профили циркулируют в Центральной Азии и Европе, где описана МЛУ эпидемия ТБ, вызванного Beijing CC1 штаммами (Mokrousov I, et al., 2012; Mokrousov I., 2015). Наиболее крупный кластер из 230 изолятов с идентичным профилем, полученных на изучаемых территориях, имел полное сходство с Центрально-Азиатским штаммом CC1-96 по M. Merker et al. (2015). Штаммы этого кластера присутствовали в Иркутской области (142/719), Бурятии (47/337) и Саха (Якутии) (41/378), представляя собой самую крупную группу. Вместе с тем, присутствующие в глобальной базе Beijing профили Beijing CC1, изолированные только в Европейской части России, в большинстве случаев отличаются от полученных нами уникальных профилей (Приложение Рисунок 14). Сопоставляя вышеуказанные характеристики в структуре доминирующего субтипа Beijing, несущего в себе основной пул штаммов, классифицированных как 94-32 и 99-32 (по MLVA Mtb C15-9), nonB0/nonW148, Beijing CC1, и объединяющего разные близкие варианты, можно свидетельствовать о существовании устойчивого резервуара инфекции со следами возможного заноса с других территорий и проявлениями разнообразия вследствие недавней эволюции.

Штаммы Beijing CC2, выявленные в Иркутской области (162/719), Бурятии (46/378), Саха (Якутии) (46/337) и Агинском АО (2/29), которые характеризовались значимым преобладанием МЛУ и ШЛУ по сравнению с другими генотипами ($\chi^2=3,182$ $p=0,003$), имели некоторые генетические особенности. Штаммы генотипа Beijing с профилями клонального комплекса CC2, но не имеющие делеции в *kdpD* гене и инвертированной инсерции IS6110 в межгенной области *Rv2664* и *2665* генов (non-B0/W148) в трети случаев имели также МЛУ и ШЛУ (2/6).

Beijing CC2 в анализируемой популяции обладал низким уровнем разнообразия профилей на фоне более высокой кластеризации по сравнению с Beijing CC1. При этом самый большой кластер с идентичными характеристиками MIRU-VNTR 24

имел полное сходство с Европейским CC2 (244233352644425173353723) – 194/249, имеющим по стандартной номенклатуре MLVA MtbC 15-9 положение 100-32 (Рисунок 7.1).

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

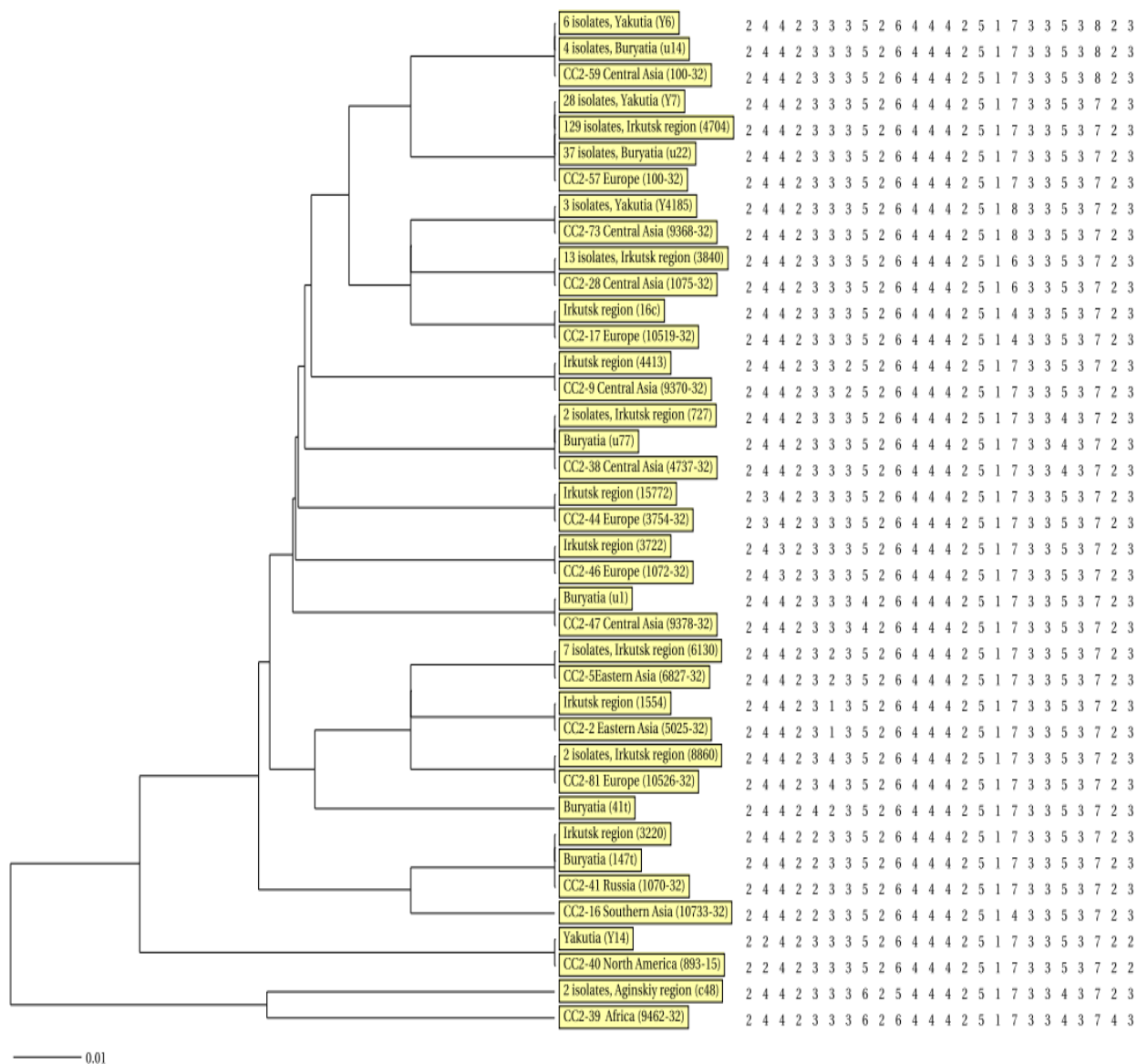


Рисунок 7.1 UPGMA древо профилей субтипа CC2 генотипа Beijing *M. tuberculosis* от больных туберкулезом в изучаемых регионах Северной Азии и референс-профилей базы данных M. Merker et al. (2015)

Значительно меньшие по величине два кластера Beijing CC2 (10/249 и 13/249 изолятов) отвечали профилям CC2 из Центральной Азии (см. Рисунок 7.1). Отсутствие полностью совпадающих с минорными вариантами российских Beijing

СС2, представленных в базе K. Merker et al. (2015) на фоне высокой кластеризации большинства штаммов, принадлежащих эпидемическому клону B0/W148, дают представление о самостоятельном очаге инфекции и недавней истории его развития на изучаемой территории.

Таким образом, несмотря на значимые различия в общей частоте выявления штаммов Beijing генотипа на изучаемых территориях Северной Азии, обнаруживаемых в Саха (Якутии), и выраженной генетической вариабельности субтипов в Бурятии и Агинском АО по сравнению с Иркутской областью, выявляется общий пул доминантных штаммов Beijing СС1 и СС2, объединенных общей циркуляцией. Широкое распространение штаммов с идентичными профилями, соответствующими по классификации MLVA MtbC 15-9 94-32, 99-32 и 100-32, на всех анализируемых территориях, как и России в целом, свидетельствует об общих закономерностях экспансии этих вариантов возбудителя туберкулеза. Вместе с тем, широкая вариация профилей Beijing СС1 позволяет предполагать, что эта группа составлена из источников различного происхождения, имеющего разную давность заноса на исследуемые территории. В пользу этого предположения говорит и описанное в главе 4 присутствие штаммов с широким спектром лекарственной устойчивости как среди впервые выявленных, так и больных с повторными курсами лечения во всех регионах изучения. Филогенетические построения позволили выявить, что минорные варианты СС1 объединяют не все территории (см. Приложение, Рисунок 14), что также свидетельствует о вероятности различного происхождения этих случаев туберкулеза.

Соответствие большинства профилей Beijing СС1 штаммам Центрально-азиатского происхождения и их выраженная вариабельность согласуется с выдвинутыми гипотезами о вероятности заноса этих штаммов в течение широкого исторического периода. Предположительное время первичной экспансии связывают с временами походов Чингисхана в 14 веке (Mokrousov I. et al., 2008); с интервалом в 190-398 лет на основе данных коалесцентного анализа (Merker M. et al., 2015), активными миграциями в середине 20 века (Синьков и др., 2011).

Напротив, штаммы Beijing CC2 комплекса имели в популяции МБТ Северной Азии незначительную степень вариабельности профилей, и были сконцентрированы в двух основных кластерах, отвечающих по MLVA Mob 15-9 профилям 100-32. На этом фоне значимым фактором была частота обнаружения штаммов этого комплекса. Оценка регионального распределения штаммов B0/W148, проведенная И. Мокроусовым на территории Евразии в 2013 году (Mokrousov I., 2013), свидетельствует о своеобразном градиенте с максимумом выявления в Западной Сибири: Новосибирской области (19,4%) и Тыве (21,9%). Однако лидирующей территорией по уровню выявления CC2 штаммов оказалась Иркутская область (23,6%), где также, обнаружилась наибольшая вариабельность представителей этого комплекса (см. Рисунок 7.1). При этом было выявлено, что в небольшой выборке из Агинского АО отсутствовали типичные представители CC2, распространенные на других территориях, но обнаружены редкие профили, несущие мутацию в *kdpD* гене и инвертированную инсерцию IS6110 в межгенной области *Rv2664* и *2665* генов, соответствующие B0/W148 клону генотипа Beijing.

Нами проведен также сравнительный молекулярно-эпидемиологический анализ структуры популяции возбудителя туберкулеза в Монголии и граничащих с ней регионах России с целью определения взаимного влияния на развитие эпидемического процесса инфекции в изучаемых странах и выявления вероятности возникновения штаммов CC2/W148 за пределами России. Выборочные оценки монгольской (309 штаммов) и российской (933 штамм из исследуемой коллекции) когорт микобактерий туберкулеза (МБТ) осуществлены по результатам генотипирования методами делеционного анализа по RD 105/207, MIRU-VNTR 24 и субтипирования клоновой группы CC2/W148 по наличию специфической делеции в *kdpD* гене. Результаты проведенного исследования свидетельствуют об обособленности действующих резервуаров инфекции ТБ, несмотря на активность исторически сформировавшегося миграционного потока между Монголией и Россией: на изучаемых территориях генотипический спектр МБТ качественно отличается. Анализ генетических профилей показал, что в Монголии преобладает

пандемический генотип Beijing (228/309 – 73,8 %). Остальные штаммы МБТ принадлежали к генетическим семействам: LAM – 33 (10,7 %), T – 30 (9,7 %), H – 9 (2,9 %) изолятов. Микст генотипы встречались в 5,8% случаев (18/309). Не удалось классифицировать используемыми методами (orphan) 2,9 % - (9/309) штаммов (Рисунок 7.2). Обнаруженное распределение доминирующих и минорных генотипов МБТ согласуется с недавно опубликованными данными о генотипической структуре популяции МБТ в Монголии (Gurjav U. et al., 2016).

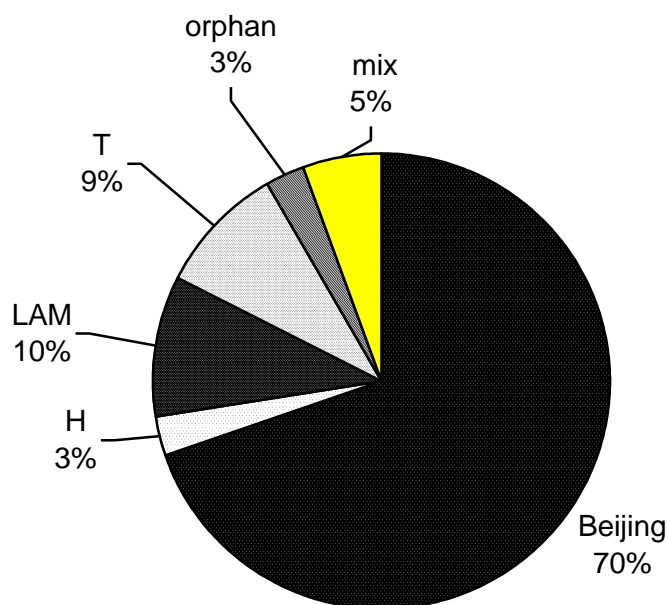


Рисунок 7.2 Генотипы МБТ, выделенных от больных туберкулезом на территории Монголии

На основе данных UPGMA-древа профилей монгольских штаммов, были выявлены 122 (39,5 %) уникальных паттернов и 21 кластер, объединяющий 187 штаммов (Таблица 7.1). Обнаруженная высокая частота кластеризации (53,7 %) штаммов МБТ в Монголии была обусловлена преимущественно вариантами генотипа Beijing (частота кластеризации - 58,0%). Значительное количество генетических клонов (82/187 – 43,9 %) обнаружены от больных ТБ, проживающих в

г. Улан-Батор, что свидетельствует о наличии крупного резервуара инфекции и условий для его стабильного существования. Эти данные согласуются с результатами исследований, представляющих доказательства активной передачи МЛУ вариантов возбудителя ТБ в крупных населенных пунктах Монголии, и прежде всего в Улан-Баторе, где проживает 45 % от населения (Gurjav U. et al., 2015).

Таблица 7.1

Генетические кластеры *M. tuberculosis*, циркулирующие в Монголии

Генотип	24-MIRU-VNTR профиль	Количество изолятов в кластере
Beijing	244233352544425173353823	58
	244233352534425173353823	33
	244233362544425173353823	32
	244233352544425173353923	6
	244233352534425173353923	6
	244233362544425173353923	4
	244233342644425173353823	4
	244233352644425173343823	3
	244233342544425173353823	3
	244233352634425153353823	3
	244233352534425153353823	3
	244233352644425173363723	2
	244233352544425183353823	2
	244233342644425153353833	2
	244233351534425173353823	2
244233352544425173353323	2	
LAM	132244332224125153322622	9
	142244332224125153322622	6
	142244332224125153322522	3
T	224243222334225153333622	2
	224243122334225153333522	2

Дальнейшее исследование монгольских профилей генотипа Beijing в соответствии с классификацией по M. Merker (2015) показало, что подавляющее большинство (64,5% - 147/228) из них вошло в субтип Beijing CC4. Доминирующее количество российских штаммов генотипа Beijing входило в субтипы CC1 (49,7%) и Beijing CC2 (27,6%) (таблица 7.2).

Таблица 7.2

Субтипы генотипа Beijing *M. tuberculosis*, выделенные от больных ТБ на территории Монголии и граничащих с ней регионов России (%)

Генотип/ Регион изучения	Монголия	Республика Бурятия	Забайкальский край	Иркутская область	Всего *
СС1	2,2	33,3	11,1	49,7	43,4
СС2	0,0	21,0	11,1	31,6	27,6
СС3	2,6	10,5	0,0	8,1	8,7
СС4	64,5	6,4	38,9	5,0	6,3
СС5	0,0	0,5	0,0	0,5	0,4
СС6	3,5	1,4	0,0	0,7	0,9
СС orphan	27,2	2,3	0,0	2,0	2,1
BL7	0,0	24,7	38,9	2,5	10,6
Всего, штаммов	228	216	18	423	657

* по приграничным с Монголией районам России

Сравнение с референсными профилями из базы данных Merker et al. (2015), обнаружило полную идентичность 24-MIRU-VNTR профилей 147 монгольских штаммов субтипа Beijing СС4, объединенных в самые крупные генетические кластеры, (58, 33 и 32 – см. субтипы № 1, 2, 3 в таблице 7.1). Эти профили совпадают с данными изолятов МБТ, обнаруженных в Европе, Африке и Восточной Азии соответственно (Merker et al., 2015). Штаммы субтипа СС4 по полногеномным данным могут быть дифференцированы Asian Africa 1 и Asian Africa 2, то есть быть общими для азиатских и африканских регионов. Учитывая исторически сложившиеся отношения Монголии со странами Восточной Азии, можно предположить, что на территорию Монголии эти штаммы могли быть занесены из

восточноазиатских стран, возможно, из Китая или ближайших стран Юго-Восточной Азии, но не России.

Кроме того, 24-MIRU-VNTR профили российских изолятов МБТ, вошедших в СС4 (6,3% - 41/657), имели отличия от монгольских представителей этого клонального комплекса. Оценка распространения делеции в *kdpD* гене свидетельствует об отсутствии клоновой группы СС2/W148 среди монгольских штаммов генотипа Beijing.

Таким образом, внутригенотипическая вариация доминирующего генотипа возбудителя на территории Монголии и России имеет различия, свидетельствующие о значительной изолированности циркулирующих в изучаемых странах популяций МБТ. Субтипы Beijing СС1 и Beijing СС2 широко распространены в Иркутской области и Бурятии и являются основными возбудителями лекарственно-устойчивых форм туберкулёза в этих регионах, однако в Монголии Beijing СС1 кластер представлен единичными случаями, а Beijing СС2 вообще не обнаружен. Кроме того, не был выявлен ни один изолят клоновой группы W148, несущий наибольший потенциал МЛУ ТБ в России. Это позволяет предположить, что между монгольской и юго-восточной российской популяциями возбудителя практически отсутствует трансмиссия, несмотря на тесную связь популяций хозяина.

Представленные в настоящей работе результаты соответствуют ранее описанным М. Merker et al. (2015) данным о превалировании штаммов Beijing СС4, 24-MIRU-VNTR профили которых отличаются от российских. Поэтому несостоятельной оказывается гипотеза о трансграничном распространении МЛУ-ТБ вдоль Транссибирской магистрали с последующей диссеминацией по территории Монголии (Gurjav U. et al., 2016). Проведенный нами анализ 24-MIRU-VNTR профилей из «горячих» точек МЛУ-ТБ монгольских аймаков, представляющих собой важные остановки в пути на железной дороге, связывающей Монголию, Россию и Китай, не выявил значимых отличий от генетических характеристик других провинций. Доминирование субтипа Beijing СС4, высокая частота его кластеризации и равномерное распределение на территории центральной и

пограничной Монголии свидетельствуют об устойчивом резервуаре инфекции, сконцентрированном в Улан-Баторе и, наиболее вероятно, распространяющемся на другие провинции Монголии. В качестве источника распространения штаммов субтипа Beijing CC4 на территорию Монголии может выступать Восточная Азия, в частности Китай или другие ближайшие страны Юго-Восточной Азии. В России активность эпидемического процесса туберкулеза, как уже описано выше, определяется отличными от монгольских вариантов возбудителя - преимущественно штаммами субтипов Beijing CC1 и CC2, распространение которых ограничено государственными границами.

Несколько более сложной является задача объяснить происхождение субтипа Beijing MIT 642, относящегося по 24 MIRU-VNTR локусному профилю к клональному комплексу BL7, включающему древние варианты генотипа Beijing и имеющего наибольшее представительство в Восточной Азии и Северной Америке (Merker M. et al., 2015). Наиболее вероятно, что распространение субтипа Beijing BL7 (MIT 642) на территории Бурятии в известной мере носит неслучайный характер, поскольку в европейской части России и на территории соседней Монголии доминирования этого генотипа не наблюдается, но он выявляется в Забайкальском крае и Приморье (Дымова М. и др., 2011). Таким образом, по всей видимости, распространение субтипа Beijing MIT 642 на территории Бурятии не несет отражения глобальных процессов, затрагивающих пограничные с этим регионом страны, в том числе и Монголию. Напротив, в мировом масштабе прослеживается историческое прошлое для штаммов генотипа S на территории современной Якутии.

В профилях генотипа S, относящихся к MIT 256, был выявлен также только единичные колебания в одном-двух вариационных локусах, характерных для этого субтипа. Выявленный факт наличия редких мутационных событий у вышеописанных штаммов может характеризовать их как эпидемические варианты МБТ, активно распространяющиеся в человеческой популяции. Эти штаммы могут быть эпидемиологически связаны недавними заражениями из популяционного

резервуара инфекции, несмотря на отсутствие установленных контактов. Вместе с тем, результаты антибиотикограммы свидетельствуют о различиях устойчивости изолятов МБТ внутри кластеров, принадлежащих изучаемым эпидемическим субтипам больных с новыми и повторными случаями лечения ТБ.

Филогенетическое моделирование, проведенное для штаммов S по глобальным данным, свидетельствует о продолжительном эволюционном периоде, прошедшем с момента заноса предковых форм этого генотипа на территорию Якутии. Это в конечном итоге предполагает исторически давний срок, прошедший с начала формирования резервуара инфекции туберкулеза, вызванного штаммами этого генотипа. Учитывая, что ранее S изоляты обнаруживались в России лишь в единичных случаях (Kovalev S. et al., 2005; Dymova M. et al., 2011), их изолированная распространенность может быть связана с давней циркуляцией в удаленных и малонаселенных регионах на Северо-востоке Азии. Частота выявления изолятов S семейства в глобальном масштабе носит мозаичный характер с более частым обнаружением в Италии, Болгарии (Sola C. et al., 2001; Valcheva V. et al., 2008; Demay C. et al., 2012; Bonura C. et al., 2014), Канаде (Cheng S. et al., 2000; Pepperell C. et al., 2011) и ЮАР (Mlambo C. et al., 2008). Его зарождение относят к Сицилии, которое рассматривают в качестве возможного первоисточника распространения штаммов этого семейства на другие территории, где укоренение привело к возникновению генотипических вариаций (Bonura C. et al., 2014). Находки штаммов S в Канаде связывают с распространением МБТ среди аборигенов Канады, начавшимся во времена торговли мехом с европейцами в 18-м веке (Pepperell C. et al., 2011). Профили MIRU-VNTR по 24-м локусам болгарских и канадских штаммов имели отличия от полученных нами данных в одно-два мутационных события в локусах (Mtub 04, Mtub 34, ETR A, Qub 11b и Qub26).

Накопленный объем данных по 24-м локусам MIRU-VNTR позволил сделать филогенетическую оценку времени циркуляции основных эпидемических генотипов (субтипа CC2/W148 генотипа Beijing и генотипа S), ответственных за распространение МЛУ на исследуемой территории. На Рисунке 7.3 приведена временная шкала и временное древо (timetree). За основную шкалу было взято время

происхождения группы CC2/W148 генотипа Beijing в 1797 лет (Merker M. et al., 2015) представлено на древе 83 уникальными профилями. Над корневыми узлами куста генотипа S в верхней части рисунка приведены оценки в годах расхождения основных филогенетических линий исследуемого семейства. После OTU (operational taxonomic unit) объединенных ветвей в виде треугольников приведены оценки в годах, соответствующие времени происхождения объединенной ветви. Как видно на Рисунке 7.3. время заноса генотипа S на территорию Якутии близко к 600 годам, что сравнимо со временем генетической дивергенции близкородственных генотипов, циркулирующих на территории Болгарии (459 лет) и Канады (684 года).

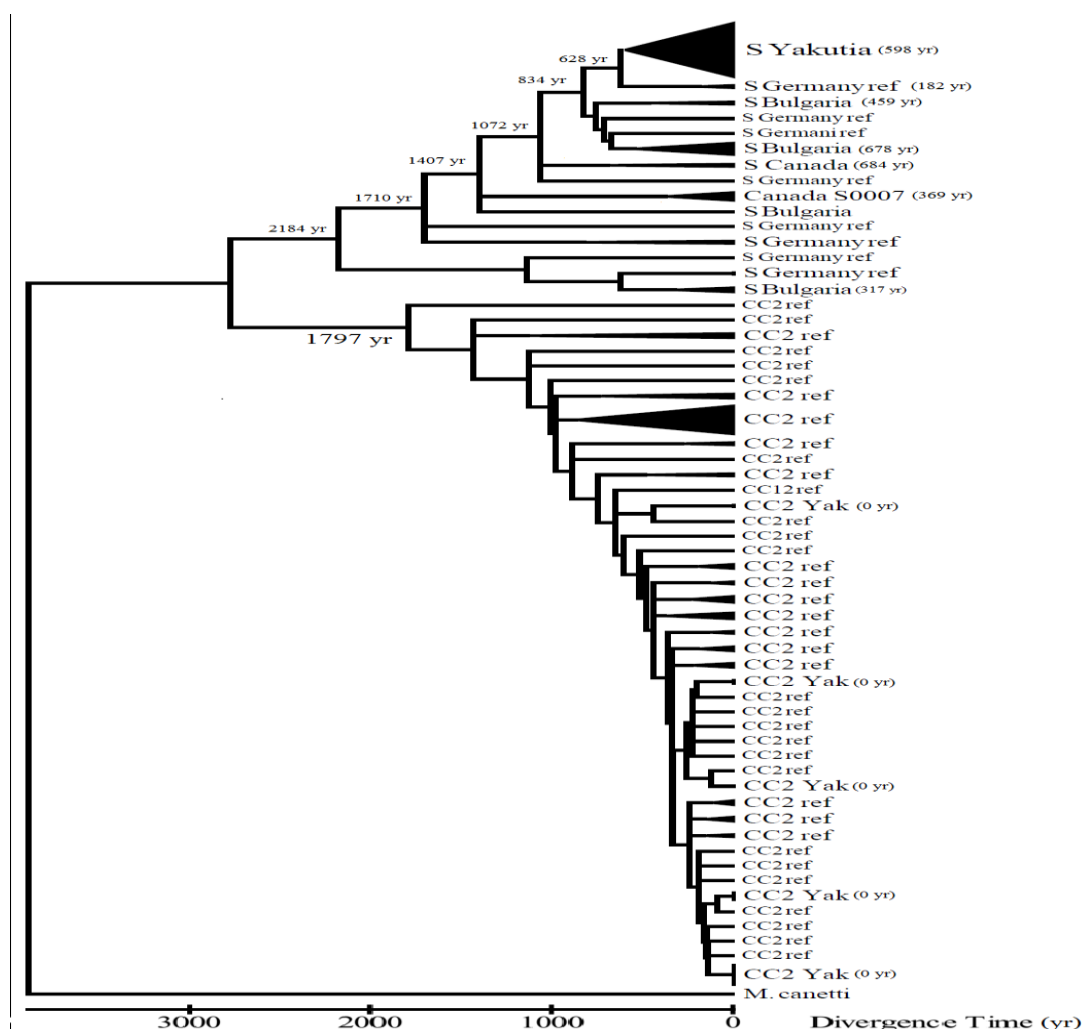


Рисунок 7.3. Временное древо (timetree) – Над корневыми узлами куста генотипа S в верхней части рис 1а. приведены оценки в годах расхождения основных филогенетических линий исследуемого семейства. Объединенные ветви представлены в виде треугольников, в скобках приведены оценки в годах соответствующие времени происхождения объединенной ветви.

Особый интерес для нас представляли уникальные профили штаммов S семейства из Канады (Christianson S., et al., 2010; Gardy J.L., et al., 2011), в том числе профили широко распространенного генотипа S 0007 (Christianson S., et al., 2010). Первоначальной гипотезой, потребовавшей проведения оценки времени дивергенции исследуемых генотипов, было предположение о возможном родстве штаммов семейства S из Якутии и Канады. Однако проведенная реконструкция эволюционных событий не подтверждает эту гипотезу. В рамках полученной модели можно постулировать, что занос предкового штамма генотипа S на территорию Якутии произошел в сроки, сравнимые с распространением этого генотипа в Европе и Северной Америке, т.е. в раннюю пост-колумбовую эпоху вместе с другими генотипами Европейско-Американской линии (Galagan J., 2014). Полученные оценки приблизительно в два раза превышают предполагаемое время первых контактов аборигенов Канады с европейцами (начало 18-го века) и распространение европейских МБТ среди этой популяции (Pepperell C. et al., 2011). Аналогичным образом, временная оценка распространения генотипа S в Якутии (600 лет) вдвое превышает предполагаемое время (17-18 век) начала распространения европейских штаммов среди коренного населения Якутии (Dabernat H., et al., 2014). Наиболее реалистичной выглядит временная модель, с использованием в качестве шкалы минимального времени происхождения субтипа CC2/W148 в 958 лет (Merker M., et al., 2015) В этом случае время распространения предковых форм генотипа S на территории Канады и Якутии приближается к 300 годам и соответствует известным историческим событиям первых контактов аборигенов с европейцами (Pepperell C. et al., 2011; Dabernat H., et al., 2014). Можно с большой долей уверенности утверждать, что распространение МБТ генотипа S на территории Якутии и Канады произошло независимо друг от друга с волнами миграций европеоидов.

В нашем случае эпидемическую модель возникновения “реликтового” генотипа S можно сформулировать следующим образом. В период первых контактов славянского населения с аборигенами Якутии (17-18 век) произошло

распространение генотипов туберкулеза, которые были наиболее хорошо представлены на европейской части Российской империи. С этой точки зрения, “реликтовый” генотип S, относящийся к евро-американской линии, является отражением спектра “европейских” генотипов (евро-американская линия), бывших по всей вероятности общими для всей Европы, включая европейскую часть России (Kinander W. et al., 2009; Groenheit R. et al., 2012). С другой стороны, среди описанных в Северной Европе “довоенных генотипов” евро-американской линии преобладают генотипы LAM, T и Haarlem.

С этой точки зрения, отдельный интерес представляет тропность генотипа S к монголоидным популяциям, проживающим в экстремальных климатических условиях Якутии и Канады. Нельзя исключать, что феномен высокой трансмиссивности отдельных субтипов генотипа S, выявленных на территории Якутии (см. Рисунок 7.3, кластер из 18-ти идентичных профилей) и Канады, кластер – 0007 (Christianson S., et al., 2010), имеет общую биологическую природу и связан с коадаптацией части популяции возбудителя к популяции хозяина.

7.2 Обоснование концепции возникновения и поддержания эпидемического резервуара инфекции «успешными» клонами *M. tuberculosis* в Северной Азии

Эпидемическое распространение успешного клона CC2/W148 пандемического генотипа Beijing *Mycobacterium tuberculosis* на территории России делает необходимым поиск сценариев его возникновения и распространения в связи с рядом таких его негативных проявлений, как повышенная трансмиссивность и способность активно формировать МЛУ. Несмотря на общепринятое представление о повсеместном распространении этого варианта возбудителя ТБ на всем постсоветском пространстве, в его географическом распределении обнаруживается своеобразный градиент. Пики частот этого распределения приходятся на Сибирский регион России и, в меньшей степени, на европейскую часть бывшего Советского Союза.

Оценка глобального распространения штаммов генотипа Beijing на территории Евразии позволила сформулировать ряд концепций о вероятной истории его экспансии на территорию России и стран, входивших в СССР. Ранее представленная гипотеза на основе модели взрывообразного распространения штаммов этого генотипа в XX веке, связанного с их заносом с территории Китая (Синьков В.В. и др., 2011), согласуется с данными по одному из основных кластеров генотипа Beijing – CC1, но не субтипа CC2/W148. Его отсутствие в Китае предполагает другой сценарий появления его в России. В качестве возможного источника данного варианта возбудителя ТБ рассматривается территория Западной Сибири, откуда с волнами послевоенной миграции он мог распространиться по территории СССР, а в постсоветское время - в другие регионы мира (Mokrousov I, 2013). В качестве одного из доказательств предполагаемой истории экспансии субтипа B0/W148 генотипа Beijing из Сибири был осуществлен сравнительный анализ профилей штаммов МБТ, циркулирующих на территории двух контрастных по миграционной истории и современной ее активности в регионах Северной Азии (Иркутской области и Саха (Якутии)).

В целом, молекулярно-эпидемиологический мониторинг возбудителя ТБ в Восточносибирском и Северо-Восточном регионах России, относящихся к Северной Азии, позволил выявить широкий спектр профилей MIRU-VNTR, среди которых доминировали изоляты генотипа Beijing- 69%, представляющего гетерогенную группу со значимыми различиями в частоте выделения в изучаемых регионах. Одним из решающих факторов выбора сравниваемых территорий оказалось значимое различие частоты обнаружения как основных субтипов генотипа Beijing, так и клона CC2/W148, в Саха (Якутии) по сравнению с Иркутской областью и соседствующей с ней Бурятией. Распространение штаммов генотипа Beijing в Саха (Якутии) (43,0%) было значимо меньшим, чем в остальных анализируемых регионах, особенно по сравнению с Иркутской областью (71%). Частота выявления клона CC2/W148 в Иркутской области в два раза превышала показатель Саха (Якутии) (12,1%) и составляла 23,6%, то есть почти четверть полученной коллекции штаммов.

В основу настоящего раздела исследования положена гипотеза о том, что датировать время эпидемического распространения основных субтипов генотипа Beijing на территории России можно путем сравнения популяционной структуры штаммов микобактерий туберкулеза в контрастных по возрасту группах больных туберкулезом (например, до 25-ти лет и после 60-ти лет). Спектр генотипов у «пожилых» людей, в целом, будет отражать генетическое разнообразие возбудителя туберкулеза, сформировавшегося на изучаемой территории полвека назад. В то время как штаммы, выделенные от «молодых» пациентов, будут соответствовать текущей эпидемической ситуации. Таким образом, целью представленной главы явилось изучение изменений в структуре популяции МБТ, циркулировавших на территории Якутии и Иркутской области в предыдущие десятилетия, и прогноз дальнейших тенденций в этом регионе Северной Азии.

Анализ профилей по 24-м MIRU-VNTR локусам этой специальной когорты изолятов из коллекции Республики Саха (Якутия) позволил выявить 110 уникальных паттернов, 99 из которых соответствовали единичным штаммам, остальные сформировали 11 кластеров, содержащих от 2-х до 16-ти идентичных профилей (Рисунок 7.4). Средняя частота кластеризации (CR) составила 0,28. Среди «молодых» пациентов частота кластеризации (CR=0,34) была выше ($\chi^2=8,3$, $p<0,01$), чем среди пожилых больных ТБ (CR=0,11) (Таблица 7.1). У пациентов с ТБ, вызванным кластеризующимися МБТ, значительно чаще обнаруживались штаммы, принадлежащие субтипам генотипа Beijing ($\chi^2=30,1$; $p<0,01$). Средняя частота кластеризации штаммов этого генотипа составила 0,53, а штаммов non-Beijing – 0,09. Внутри выборки штаммов генотипа Beijing среди «молодых» пациентов CR была выше (0,54), чем среди «пожилых» (0,28) ($\chi^2=3,1$; $p<0,05$). Эти данные свидетельствуют о более «эффективной» передаче МБТ, принадлежащих генотипу Beijing, среди молодого населения САХА (ЯКУТИЯ). Это в свою очередь указывает на то, что в последние десятилетия широкое распространение эпидемических штаммов генотипа Beijing могло привести к случаям суперинфекции у «пожилых» пациентов, у которых также были выявлены редкие случаи кластеризации профилей этого генотипа, а в одном случае – микст инфекции ТБ.

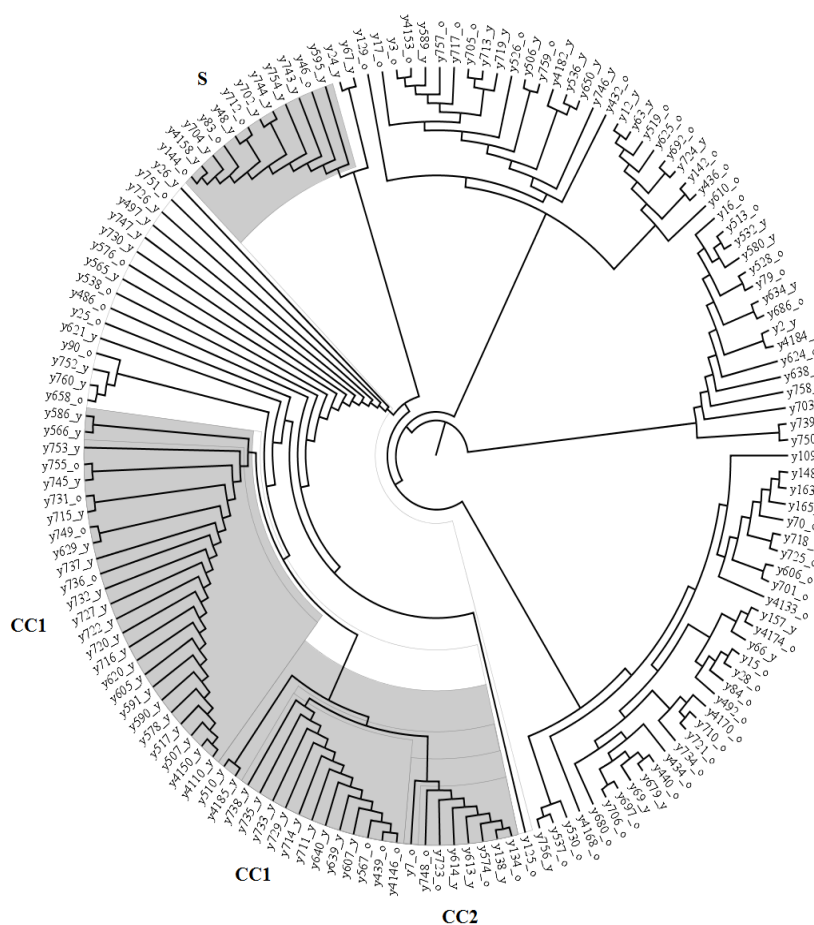


Рисунок 7.4. Филогенетическое NJ-дерево штаммов из Саха (Якутии), по данным MIRU-VNTR по 24 локусам. Серым отмечены высокоэпидемические группы CC1 и CC2 по M. Merker et al., 2015 и семейство S. Штаммы, выделенные от «молодых» пациентов отмечены у (young), от «пожилых» - о (old).

В целом штаммы генотипа Beijing присутствовали только в 42,5% (65/153) случаев, что качественно отличает популяцию МБТ Саха (Якутия) от других регионов России, где вышеуказанная генетическая линия занимает более выраженные доминирующие позиции (Mokrousov I., 2015). Две трети выборки популяции МБТ представлены non-Beijing штаммами, собранными в пять крупных групп. Подробная информация о генетических данных всех штаммов приведена в Таблице 7.1.

Таблица 7.1

Генотипы МБТ, выделенных от больных ТБ легких в Саха (Якутия) (%)

Генотип (субтип)	Доля изолятов в общей выборке	Пациенты, родившиеся до 1959 года, «Пожилые»					Пациенты, родившиеся с 1990 года, «Молодые»				
		мужчины	женщины	число кластеров	число изолятов в кластере	число штаммов с MLV	мужчины	женщины	число кластеров	число изолятов в кластере	число штаммов с MLV
Beijing	42,5	32,6	23,3	2	3-5	8	58,4	50,1	3	3-15	6
(Beijing CC1)	23,5	11,9	6,5	2	2-3	0	43,8	25,0	2	9-15	0
(Beijing CC2/W148)	7,9	7,4	9,7	1	5	3	4,2	9,4	1	3	3
Другие субтипы Beijing	12,4	14,0	10,0	0	0	3	6,3	21,9	0	0	3
T	19,0	27,9	36,7	1	2	2	8,3	3,1	0	0	0
Ural	6,5	9,3	10,0	0	0	0	6,3	0,0	1	2	0
LAM	7,8	4,7	13,3	0	0	0	8,3	6,3	0	0	0
S	9,8	11,6	0,0	1	2	3	6,3	21,9	2	2-4	8
Haarlem	6,5	7,0	6,7	0	0	0	4,2	9,4	0	0	0
Uganda	3,9	4,7	6,7	0	0	1	2,1	3,1	0	0	1
H	3,3	2,2	0,0	0	0	0	6,3	3,1	0	0	0
H37Rv	0,7	0,0	3,3	0	0	0	0,0	0,0	0	0	0
Общее количество	153	43	30	4	2-5	14	48	32	6	2-15	15

При анализе полученного распределения генотипов был выявлен факт преобладания среди «пожилых» пациентов штаммов возбудителя генотипа T, который присутствовал в трети анализируемых случаев ТБ (31,5% - 23/73), что было значительно выше, чем среди «молодых» пациентов ($\chi^2=12,807$; $p<0,01$). Если генотипическая структура МБТ «молодых» больных была наиболее близка картине, описываемой на других территориях России (доминирование генотипа Beijing достигает 55,0 % случаев), то ситуация с пожилыми пациентами сходна с описываемым ретроспективно спектром в Северной Европе (Groenheit R. et al., 2012; Smit P. et al., 2012). Наличие кластеризующихся штаммов семейства T у «пожилых» пациентов с ТБ может быть частично объяснено хорошо сохранившейся структурой штаммов якутской популяции. Эти результаты также означают, что передача МБТ различных сублиний может быть дифференцирована по времени заражения, что в свою очередь предполагает, что структура популяции возбудителя ТБ, которая циркулирует сейчас в Якутии, более динамична, чем ранее. Отсутствие эпидемии ВИЧ-инфекции и волнообразные, но ограниченные миграционные потоки в течение пятидесяти лет позволили сохранить во многом следы прежних экспансий возбудителя туберкулеза в Якутии.

Доля туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью штаммов, в общей выборке составившая 19,0 % (29/153), существенно не отличалась между штаммами Beijing и non-Beijing в целом ($\chi^2=0,491$; $P=0,483$) (см. Таблица 7.1). Тем не менее, среди доминирующих субтипов штаммы Beijing CC2 преобладали по уровню МЛУ над Beijing CC1 ($\chi^2=19,1$; $p<0,01$), не отличаясь у «молодых» и «пожилых» больных ТБ ($\chi^2=0,947$; $P=0,330$). При этом превалирующий субтип Beijing CC1 не был связан с первичной МЛУ ни в одном наблюдаемом нами случае в РЕСПУБЛИКА Саха (Якутия) из контрастных по возрасту групп больных, что качественно отличает их от структуры МБТ других регионов РФ.

Со штаммами Beijing CC2/W148, наиболее часто связывают активную трансмиссию МБТ, в том числе - с первичной МЛУ, а также формирование резистентности в процессе лечения (Mokrousov I., 2013). Эти факты были

обнаружены и в настоящем исследовании. Все случаи МЛУ ТБ, вызванные штаммами Beijing CC2/W148, у «молодых» и «пожилых» пациентов были зарегистрированы у впервые выявленных больных ТБ (Таблица 7.2). При этом частота встречаемости Beijing CC2/W148 не имела отличий среди «пожилых» и «молодых» пациентов ($\chi^2=3,2$; $p<0,01$), в том числе и при сравнении места их жительства. На этом фоне чувствительный к противотуберкулезным препаратам субтип Beijing CC1 более часто встречался среди «молодых» больных ТБ, достигая значимого превышения среди жителей Якутска. Иная ситуация была при МЛУ ТБ, вызванном штаммами S и T семейства. Наблюдалось отсутствие различий частоты первичной и вторичной резистентности к противотуберкулезным препаратам первого ряда как для S штаммов ($\chi^2=0,331$; $P=0,564$), так и для T штаммов ($\chi^2=0,105$; $P=0,746$).

Таблица 7.2

Генотипы штаммов МБТ, выделенных от больных ТБ из контрастных по возрасту групп, по месту жительства в Саха(Якутия) (%)

Группы/ Генотип	Пациенты, родившиеся до 1959 года, «Пожилые»			Пациенты, родившиеся с 1990 года, «Молодые»			Общая выборка		
	Якутск	Улусы	Всего	Якутск	Улусы	Всего	Якутск	Улусы	Всего
Beijing:	32,6	22,2	28,8	60,7	41,7	55,0	48,0	31,4	42,5
(Beijing CC1	6,5*	7,4	6,8	37,5*	33,3	36,3	23,5	19,6	22,2
(Beijing CC2)	13,0	3,7	9,6	5,4	8,3	6,3	8,8	5,9	7,8
Другие субтипы Beijing	13,0	11,1	12,3	17,9	0,0	12,5	15,7	5,9	12,4

Продолжение Таблицы 7.2

Группы/ Генотип	Пациенты, родившиеся до 1959 года, «Пожилые»			Пациенты, родившиеся с 1990 года, «Молодые»			Общая выборка		
	Якутск	Улусы	Всего		Якутск	Улусы	Всего		Якутск
T	37,0	22,2	31,5	3,6	16,7	7,5	18,6	19,6	19,0
Ural	4,3	18,5	9,6	5,4	0,0	3,8	4,9	9,8	6,5
LAM	6,5	11,1	8,2	5,4	12,5	7,5	5,9	11,8	7,8
S	6,5	7,4	6,8	10,7	16,7	12,5	8,8	11,8	9,8
Haarlem	8,7	3,7	6,8	8,9	0,0	6,3	8,8	2,0	6,5
Uganda	4,3	7,4	5,5	1,8	4,2	2,5	2,9	5,9	3,9
H	0,0	3,7	1,4	3,6	8,3	5,0	2,0	5,9	3,3
H37Rv	0,0	3,7	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,7
Всего	46	27	73	56	24	80	102	51	153
Количество штаммов с МЛУ, абс	8	5	13	11	5	16	19	10	29

*У «молодых» больных ТБ из группы пациентов Якутска более часто, чем у «пожилых» обнаруживали штаммы Beijing MIT 16 ($\chi^2=5,7$, $p<0,05$).

Штаммы Beijing субтипа CC2/W148 среди «пожилых» пациентов с ТБ были обнаружены в девяти случаях только среди пришлого населения (славяне, татары), родившихся за пределами изучаемой территории (Таблица 7.3). Этот факт, наряду с группировкой пяти штаммов клона CC2/W148 у «молодых» больных среди коренной популяции (якуты) мог бы свидетельствовать о привнесении эпидемического штамма в республику с миграцией 40-80х годов 20 века.

Распределение W 148 у больных с разными течением ТБ и типами лекарственной устойчивости в Саха (Якутии)

Группы больных/ характеристика штаммов W148	Пациенты, родившиеся в 1926-1959 гг., «Пожилые» n=73	Пациенты, родившиеся в 1960-1989 гг. n=224	Пациенты, родившиеся в 1990-1996 гг., «Молодые» n=80	Общий показатель, n=377
Общее количество штаммов, абс. (%)				
Общая выборка	8/73(11,0)	29/224 (12,9)	8/80(10,0)	45/377 (11,9)
Впервые выявленные больные	7/64 (10,9)	12/169 (7,1)	7/77(9,1)	26/310 (8,4)
Хронические больные	1/9 (11,1)	14/42 (33,3)	1/3 (33,3)	16/54 (26,6)
Рецидивы	0/1	3/6(50,0)	0	3/7()
Штаммы с МЛУ/ШЛУ, абс. (%)				
Общая выборка	7/13 (53,8)	23/64 (35,9)	5/16(31,3)	35/93(37,6)
Впервые выявленные больные	5/7 (71,4)	7/31(22,6)	5/14(35,7)	17/51(33,3)
Хронические больные	2/5(40,0)	13/29(44,8)	0/2	15/36 (41,7)
Рецидивы	0	3/4 (75,0)	0	3/5 (60,0)
Штаммы с сохраненной чувствительностью, абс. (%)				
Общая выборка: n=377	2/50 (4,0)	1/106 (0,9)	1/57 (1,8)	4/213 (1,9)
Впервые выявленные больные: n=310	2/46 (4,3)	1/99 (1,0)	1/56(1,8)	4/201 (2,0)
Хронические больные: n=57	0/3	0/5	0/1	0/9
Рецидивы: n=10	0/1	0/2	0	0/3

Вместе с тем, нами обнаружена первичная МЛУ в пяти из семи случаев у «пожилых» пациентов, что некоторым образом противоречит возможности заражения этих пациентов в возрасте 2- 10 лет вариантом возбудителя с уже сформированной лекарственной устойчивостью к рифампицину и изониазиду

(Marais B. et al., 2008). Даты рождения этих больных приходятся на 1935-1952 гг., но в течение последующего за их рождением десятилетия в Саха (Якутии) не были доступны препараты первой линии противотуберкулезной терапии. Лечение сопутствующей патологии обнаруженной группы пациентов (хронический гастрит, сахарный диабет, отморожения, болезни органов дыхания) не были сопряжены с возможностью приема изониазида и рифампицина до установления диагноза первичного туберкулеза. Тем не менее, доступные данные выявления генетических мутаций, ассоциированных с формированием лекарственной устойчивости для одного из изолятов, вошедшего в группу выявленных CC2/W148 из группы "пожилых" больных, совпадают с профилем фенотипической лекарственной устойчивости (наличие мутаций в *rpoB* Ser531Leu; *katG* Ser315Thr; *emb B* Gly406Cys; *gyrA* Ser95Thr; отсутствие мутаций в *rrs* и *eis* генах).

Вместе с тем, данные литературы по изучению эволюции лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* китайских штаммов Beijing показывают, что резистентность к рифампицину и пиперазину, а также рифампицину, изониазиду и пиперазину были ассоциированы с древней группой Beijing. И в первую очередь, это проявилось с рифампицином. Отдельно для изониазида связь статистически не подтверждена. На этом фоне устойчивость к исторически недавно введенным в противотуберкулезную практику препаратам (рифампицину и пиперазину) была ассоциирована с древними штаммами, особенно в случае пиперазина. Но для более «старых» препаратов – изониазида и стрептомицина, это различие между древними и современными штаммами менее явно или носит обратный характер (Li et al., 2017). Таким образом, при допущении первичной МЛУ штаммов CC2/W148, существовавшей до периода широкого применения ПТП первого ряда, заражение МБТ этого субтипа у «пожилых» больных ТБ в могло происходить на отдаленных от Саха (Якутии) территориях СССР. И, учитывая предположительное время первичного распространения CC2/W148 в 1944-1973 гг. (Shitikov E et al, 2017), занос штаммов эпидемически успешного клона мог быть осуществлен уже с пришлым населением в период активного освоения Якутии во второй половине 20 века.

В Иркутской области, в целом, не были обнаружены какие-либо кластеры, состоящие исключительно из штаммов, принадлежащих «пожилым» больным ТБ. К тому же, в рассматриваемой популяции МБТ среди «молодых» пациентов не было ожидаемого увеличения частоты субтипа Beijing CC2/W148. Уровень его встречаемости не имел значимых различий в когорте «молодых» (11/59) и «пожилых» (24/101) пациентов ($\chi^2=0,311$, $P=0,288$). Частота кластеризации штаммов (CR) среди «пожилых» оказывается достаточно высокой (CR=0,39), не имеющей значимых отличий от показателя «молодых» пациентов (CR=0,36), ($\chi^2=0,949$, $P=0,165$). В сравниваемых возрастных группах, как и в общей выборке, кластеризующиеся штаммы значительно чаще обнаруживались среди субтипов генотипа Beijing ($\chi^2=39,6$, $p<0,01$), их CR была наивысшей в общей структуре МБТ – 0,70, на этом фоне CR штаммов non-Beijing была равна 0,10. Внутри выборки штаммов генотипа Beijing среди «молодых» пациентов CR была незначительно ниже (0,48), чем среди «пожилых» (0,55).

Штаммы субтипа Beijing CC1 имели все проявления лекарственной устойчивости от сохраненной чувствительности до широкой лекарственной устойчивости (ШЛУ) без значимых отличий от других представителей Beijing и non-Beijing. Наряду с высоким разнообразием профилей MIRU-VNTR 24 штаммов субтипа Beijing CC1 свидетельствует о накоплении большого резервуара инфекции в течение определенного времени его существования и, вероятно, активной роли миграционной трансмиссии инфекта из других территорий. Эту гипотезу подтверждает обнаружение идентичного профиля Beijing CC1 (244233352644425153353823) у 70,6% (122/172) штаммов этого варианта, что может быть связано с активностью очага инфекции в регионе. В группе Beijing CC1 были обнаружены специфические для W148 инсерции инвертированной IS6110, в большинстве случаев несшие МЛУ или ШЛУ.

Такая ситуация может свидетельствовать об устойчивом резервуаре инфекции за счет уже сформировавшейся популяции МБТ, отличающейся разнообразием циркулирующих вариантов в основном за счет субтипов Beijing, среди которых ведущую роль в активной передаче и распространении МЛУ играет один из

субтипов - Beijing CC1. Филогенетический анализ профилей Beijing CC1 из Иркутской области в сопоставлении с данными глобальной базы Beijing M. Merker et al. (2015) позволил установить, что подобные иркутским профили циркулируют в Центральной Азии и Европе, где описана МЛУ эпидемия ТБ, вызванного CC1 штаммами.

Субтип Beijing CC2 (113/134) в популяции МБТ Иркутской области представлял в основном варианты, отвечающие классификации W148. Среди доминирующих вариантов генотипа Beijing было выявлено значимое преобладание МЛУ и ШЛУ только у штаммов Beijing CC2 по сравнению с другими генотипами ($\chi^2=3,182$ $p=0,03$). При этом Beijing CC2 nonB0/ nonW148 имели также МЛУ\ШЛУ.

Однако, клоновый кластер CC2/W148 у больных ТБ в Иркутской области включал также чувствительные к ПТП, как и в Саха (Якутии). Отличительной особенностью этих 24 случаев ТБ с сохраненной чувствительностью было их обнаружение в сельских районах Иркутской области (Усть-Ордынского автономного округа). Вместе с тем доступные для анализа результаты фенотипического теста на лекарственную устойчивость были противоречивыми, только в трех случаях они имели подтверждение генетическими тестом на GeneXpert (Таблица 7.4). Штаммы Beijing CC2/W148, одинаково часто встречающиеся у больных ТБ разных поколений, характеризовались низким уровнем разнообразия профилей на фоне более высокой кластеризации по сравнению с Beijing CC1. При этом самый большой кластер с идентичными характеристиками MIRU-VNTR 24 имел полное сходство с Beijing CC2 из других регионов России (244233352644425173353723). В совокупности полученные данные согласуются с гипотезой массовой трансмиссии CC2/W148 по всей территории бывшего СССР. Отсутствие полностью совпадающих с российскими Beijing CC2 представителями в базе M. Merker et al (2015) может свидетельствовать, как и в случае Beijing CC1, о возникшей вариации, носящей незначительный характер и вместе с тем, давшей самостоятельный очаг инфекции на изучаемой территории.

Распределение W 148 у больных с разными течением ТБ и типами лекарственной устойчивости в Иркутской области

Группы больных/ характеристика штаммов W148	Пациенты, родившиеся в 1926-1959 гг., «Пожилые»	Пациенты, родившиеся в 1960-1989 гг.	Пациенты, родившиеся в 1990-1996 гг., «Молодые»	Общий показатель,
Общее количество штаммов, абс. (%)				
Общая выборка	39 (27,9)	143 (29,9)	17 (28,8)	199 (29,2)
Впервые выявленные больные	24 (25,3)	76 (24,8)	15 (27,3)	115 (25,2)
Хронические больные	14 (35,9)	65 (39,4)	2 (50,0)	81 (38,9)
Рецидивы	1 (10,0)	2 (25,0)	0	3 (16,7)
Штаммы с МЛУ/ШЛУ, абс. (%)				
Общая выборка	14 (40,0)	92 (45,3)	6 (46,2)	112 (44,6)
Впервые выявленные больные	5 (26,3)	42 (41,6)	5 (38,5)	52 (39,1)
Хронические больные	8 (57,1)	48 (49,5)	1 (50,0)	57 (50,4)
Рецидивы	1	2	0	3
Штаммы с сохраненной чувствительностью, абс. (%)				
Общая выборка:	6 (16,2)	18 (19,1)	0	24 (16,8)
Впервые выявленные больные	5 (16,7)	16 (20,0)	0	21 (17,8)
Хронические больные	1 (16,7)	2 (14,3)	0	3 (12,5)
Рецидивы	0	0	0	0

Проведенное нами молекулярно-эпидемиологическое изучение МБТ, полученных от больных ТБ в Иркутской области, позволило установить основные генотипические характеристики и условия стабилизации структуры популяции возбудителя в предыдущие пять десятилетий за счет формирования резервуара инфекции двух доминирующих в России субтипов генотипа Beijing. В настоящем исследовании получены новые данные, дополняющие гипотезу о недавнем времени распространения на территории бывшего СССР наиболее вирулентного субтипа CC2/W148 генотипа Beijing. Это проявилось в низком уровне разнообразия профилей этого клона в регионе с активными миграционными процессами на протяжении всего периода существования СССР и последующего периода развития Российской Федерации. При этом самый большой кластер штаммов был идентичен по характеристикам MIRU-VNTR 24 Европейскому Beijing CC2, что подтверждает его активное распространение в Северной Азии, где Иркутская область занимает срединное положение. Фоном успешного распространения штаммов клона CC2/W148 в условиях развития эпидемии МЛУ туберкулеза в изучаемом регионе стало активное проявление других представителей генотипа Beijing, несущих потенциал антибиотикорезистентности. Вариация профилей Beijing CC1, имеющих наибольшее сходство с изолятами Beijing CC1 из Центральной Азии и Европы, но не их российскими вариантами, свидетельствует о вероятности сценария их заноса из иных, чем субтипа CC2/W148 генотипа Beijing, территорий и более долгую историю, проявившуюся в увеличении разнообразия и близкой по значениям частоты выявления у пациентов ТБ из контрастных возрастных групп.

Анализ полученных нами данных и разных гипотез распространения генотипа Beijing в современной России и Сибири, дает возможность предположить недавний (около пятидесяти лет назад) занос МБТ эпидемических субтипов генотипа Beijing на территорию Якутии по сравнению с другими регионами России – в период активного освоения территории Крайнего Севера в 60-80 годы XX века. На основании полученных данных можно прогнозировать эпидемическую экспансию B0/W148 субтипа генотипа Beijing который в процессе взросления популяции «молодых может теснить как уже имеющиеся эпидемические клоны (генотип S,

субтип Beijing CC1), так и штаммы МБТ не имеющие клонального распространения. Модель распространения эпидемических штаммов МБТ в Саха (Якутия) по всей видимости будет во многом повторять эпидемические события уже произошедшие в большинстве регионов России, и как это уже проявилось в Иркутской области.

Проведенное исследование расширило сформулированную ранее концепцию «недавнего увеличения резервуара туберкулезной инфекции на территории России и стран постсоветского пространства за счет эпидемических штаммов генотипа Beijing», представленную О.Б. Огарковым (Огарков О., 2014). Оценена структура популяции возбудителя туберкулеза на территории Северной Азии (Иркутская область, Республики Бурятия, Саха (Якутия), Забайкальский край) и Монголии, а также выявлены основные генотипы и их субтипы, ответственные за эпидемическое распространение инфекции и формирование множественной лекарственной устойчивости. Обнаружены два «реликтовых» генотипа, отражающих спектр эпидемических штаммов МБТ в прошлом на исследуемой территории. Филогенетическая реконструкция эволюционных событий, связанных с распространением генотипов МБТ в изучаемых регионах, позволила уточнить время последнего заноса эпидемических генотипов на исследуемую территорию.

На основании полученных данных предложена эпидемиологическая модель распространения генотипов возбудителя туберкулеза на исследуемых территориях и всей территории России в период освоения Сибири (начиная с XVII в.), определено время последней эпидемической экспансии субтипа CC2/W148 генотипа Beijing на территории России. Получены доказательства активного вытеснения субтипом CC2/W148 генотипа Beijing других эпидемических вариантов возбудителя туберкулеза на изучаемых территориях. Сформулирован прогноз дальнейшего нарастания доли субтипа CC2/W148 генотипа Beijing в эпидемии МЛУ в России.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Контроль резервуара инфекции при туберкулезе в условиях напряженной эпидемической ситуации, особенно в азиатской части России, требует многостороннего изучения этой проблемы. Совершенствование эпидемиологического надзора туберкулеза невозможно без информационной базы о каждой из составляющих эпидемического процесса инфекции. Поэтому для комплексной оценки результатов мониторинга популяции возбудителя - диагностического раздела эпидемиологического надзора - нами было проведено исследование, включающее общую оценку напряженности ситуации по туберкулезу и изучение гетерогенности МБТ. В совокупности полученные результаты позволили нам не только обеспечить информационный блок эпидемиологического надзора о пространственной распространенности современных вариантов *M. tuberculosis* на ранее малоизученной территории азиатской части России, но и проверить ряд гипотез о возникновении и экспансии эпидемически значимых генотипов и субтипов МБТ.

Изучаемые регионы азиатской части России относятся к эпидемиологически неблагополучным территориям по туберкулезу: Среднегодовалая заболеваемость ($119,6^{0}/_{0000}$ [96,2-128,0]) и распространенность ($277,5/_{0000}$ [194,7-369,5]) значимо ($p < 0,01$) превышают уровни европейской части. Несмотря на значимые тенденции снижения всех показателей, темпы убыли заболеваемости, распространенности и смертности в азиатской части России более медленные по сравнению с территориями, расположенными в европейской части РФ. Все это свидетельствует о наличии стойкого резервуара инфекции, обеспечиваемого значительным количеством больных туберкулезом.

Ретроспективный эпидемиологический анализ проявлений заболеваемости населения туберкулезом позволил охарактеризовать территории, на которых

проводился мониторинг гетерогенности популяции возбудителя. Исследование охватывает весь диапазон колебаний эпидемического процесса ТБ в азиатской части России – от относительно благополучных территорий (Забайкальский край), регионов типичной эпидемиологической ситуации (республики Саха (Якутия) до крайне неблагополучных (Иркутская область и республика Бурятия).

Сравнительный анализ статистических данных, характеризующих динамику эпидемического процесса туберкулёза, свидетельствуют о значительном резервуаре инфекции в Иркутской области, проявляющемся в сохранении уровней заболеваемости ($132,2 \text{ ‰} [103,2-161,0]$) и распространенности ($375,1 \text{ ‰} [296,1-407,1]$), несмотря на устойчивую тенденцию снижения показателей. Бурятия характеризуется также высокой активностью эпидемического процесса ТБ (заболеваемость ($136,9 \text{ ‰} [105,6-170,2]$; распространенность - $285,9 \text{ ‰} [259,9-396,5]$) с выраженными тенденциями к спаду. В Забайкальском крае эпидемиологическая ситуация определяется как благополучная по отношению к другим регионам СФО (заболеваемость ($98,6 \text{ ‰} [76,1-143,4]$), распространенность ($218,8 \text{ ‰} [196,4-301,2]$). Саха (Якутия) помимо невысоких уровней интенсивности эпидемического процесса ТБ (заболеваемость $78,6 \text{ ‰} [63,4-106,7]$ и распространенность $202,5 \text{ ‰} [163,7-251,2]$), отличается среди других территорий ДФО значимым снижением заболеваемости (средний темп прироста $= -2,2 \%$ в год) и наиболее благоприятными тенденциями сокращения резервуара инфекции.

Проведенный в течение пятилетнего периода эпидемиологический мониторинг штаммов МБТ на отдельных территориях Северной Азии позволил собрать коллекцию около 1500 образцов и охарактеризовать спектр циркулирующей популяции возбудителя ТБ на одной из мало изученных территорий России. Анализ генотипического разнообразия проведен на основе комплексного исследования данных 24 локусного MIRU-VNTR типирования, идентификации отдельных клонов генотипа Beijing и использования ряда классификаций с целью определения «эпидемических» вариантов возбудителя на изучаемых территориях.

Генотипирование по 24-м локусам MIRU-VNTR, несмотря на относительно низкий уровень аллельного разнообразия ряда локусов (MIRU2, MIRU 20, Mtud 29, ETR B, MIRU 23, MIRU 24, MIRU 27, Mtud 34), обеспечил возможность точного определения штаммов известных генетических семейств возбудителя туберкулеза и оценки их вариабельности в исследуемом регионе. Основной резервуар инфекции обеспечивается разнообразными штаммами, среди которых лидирующий генотип Beijing (907/1463 – 62,0%) разделяет нишу с широким набором вариантов штаммов генотипов LAM(172/1463 – 11,8%) и T(104/1463-7,1%). Минорные генотипы представлены как кластеризующимися вариантами (S (61/1463 – 4,2%), Ural (77/1463 – 5,3%), Haarlem(36/1463- 2,5%)), так и изолятами с уникальными профилями (H (21/1463 – 1,4%), X(16/1463 – 1,1%) и Uganda (13/1463 – 0,9%)).

В Саха (Якутии) структура популяции МБТ имеет отличный характер от других описываемых территорий Северной Азии. Распространение штаммов генотипа Beijing в Саха (Якутии) (162/377 – 43,0%) носило менее выраженный характер, чем в остальных анализируемых регионах, и особенно по сравнению с Иркутской областью (509/719 – 70,8%) ($\chi^2=79,47$ $p<0,01$).

Доминирующий субтип генотипа Beijing, объединяющий идентичные по 12 локусам штаммы, классифицируемые по SITVIT как MIT16, в действительности является разнородной по набору из 24 MIRU-VNTR локусов группой, он представлен штаммами с уникальными профилями и шестью кластерами, среди которых превалирует один, включающий 65,4% (225/344). Штаммы с этим профилем - 244233352644425153353823 образовали самый крупный кластер, который в соответствии со стандартной номенклатурой MLVA MtbC 15-9 принадлежит известному профилю 99-32, циркулирующему в Евразии.

Классификация профилей генотипа Beijing по 24 MIRU-VNTR локусным профилям также показала неполное соответствие распределения штаммов с разными MIT по выделяемым клональным комплексам. Отнесенными по M. Merker et al (2015) к группе CC1 были преимущественно изоляты с MIT16, но также в этот клональный комплекс вошли штаммы с другими MIT. Вследствие того, что

наиболее точная характеристика изолятов описываемого клонального комплекса Beijing получена на основе 24 MIRU-VNTR локусного типирования, то более корректно идентифицировать их как CC1. Частота распространения CC1 составила в среднем по региону исследования 28,7% (422/1468). Дополнительное субтипирование этих штаммов обнаружило присутствие в CC1 когорте образцов со специфическим для B0/W148 генетическим маркером в 13 случаях (3,1%), что необходимо учитывать при оценке результатов эпидемиологического мониторинга.

Выделяя аналогичным образом другую распространенную в популяции МБТ группу штаммов, объединенную по 12 MIRU-VNTR локусам, субтип Beijing MIT 17, было определено, что он является в основном вариантами CC2 (209/364), также отвечающими классификации B0/W148 по наличию специфической инвертированной инсерции IS 6110, за исключением только двух случаев несовпадения систематизации B0/W148 и CC2 (2/209). Согласно Merker M. (2015), в CC2 (в общей сложности 249 штаммов из коллекции) включены и другие минорные варианты Beijing (23 штамма), также имеющие специфическую инвертированную инсерцию IS 6110.

Учитывая несоответствие разных классификаций в отношении штаммов, среди которых наиболее часто выявлены образцы с маркером B0/W148, более корректной является систематизация по клональным комплексам с дополнительной идентификацией W148 клоновой группы. Для этого был разработан и апробирован экспресс метод по обнаружению штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к W148 клону комплекса CC2 генотипа Beijing. Оценка пригодности метода, проведенная на коллекции из 650 образцов геномной ДНК МБТ и 78 клинических образцах показала высокие специфичность, чувствительность и точность (100%), обеспечиваемые выявлением уникальной динуклеотидной делеции в гене *kdpD*. Эти показатели в дополнении с быстротой получения результатов (этап выделения ДНК и одна ПЦР РВ) делают пригодным тест для применения в практике эпидемиологического надзора туберкулеза, в частности, обеспечения мониторинга эпидемически значимых вариантов возбудителя туберкулеза.

Отличительной чертой Саха (Якутии), кроме низкого уровня распространения генотипа Beijing, было значительное превышение частоты выявления в структуре популяции МБТ штаммов семейства S – 13,5% (51/377). Этот уникальный по величине и разнообразию кластер был выявлен у якутов, эвенков, эвенов и жителей славянской этнической группы без значимых различий по этническому признаку ($\chi^2=0,309$; $p>0,05$). Он содержал в большинстве случаев (74,5% - 38/51) идентичный MIRU-VNTR профиль - 233325153325141344222372 идентифицируемый по 12-ти локусам как MIT256. Подавляющее большинство штаммов семейства S были МЛУ (60,7% - 37/51), пять штаммов имели ШЛУ. Локальная распространенность S штаммов может быть связана с длительной циркуляцией в удаленных и малонаселенных регионах на Северо-востоке России. Частоты обнаружения штаммов этого генотипа в Иркутской области, Бурятии и Забайкальском крае находятся в пределах спорадических случаев выявления генотипа S, подобно другим регионам России. Вместе с тем, появление штаммов генотипа S только среди славянской этнической группы Бурятии и Иркутской области дает возможность предполагать наличие более частых и продолжительных контактов с жителями Саха (Якутии), чем среди бурят. В Саха (Якутии) группа штаммов S обнаруживали более часто среди пациентов хроническими формами туберкулеза - 29,8% (17/57), чем среди впервые выявленных больных ТБ - 10,9% (32/310) и случаев рецидива - 20,0% (2/10) ($\chi^2=15,83$; $p<0,01$).

Бурятию и Забайкальский край (Агинский АО) отличает от Иркутской области присутствие в доминирующих количествах субтипов Beijing не только CC1 и CC2, но и «эндемичного», т.е. имеющего эпидемическое распространение на ограниченной территории, субтипа Beijing BL7 (MIT 642). Этот субтип обнаружен в 15,4% (52/337), встречался среди изолятов, полученных как от впервые выявленных больных ТБ (3,4% - 24/186), так и от пациентов с хроническим ТБ (7,0% - 28/147) без значимых отличий ($\chi^2=0,2,35$; $p=0,125$). Определен единый резервуар инфекции туберкулеза, вызванного субтипом Beijing BL7 (MIT 642): отсутствуют значимые

различия в частоте обнаружения в группе славян (20/159) и бурят (8/70) ($\chi^2=0,001$ с поправкой Йейтса, $p>0,05$). Наличие единого для разных этнических групп резервуара инфекции подтверждает выявление двух крупных групп с идентичными профилями 224233342644425173343732 и 224233342644425173343832, одинаково часто распределенных у разных этнических составляющих когорты больных ТБ из пенитенциарной системы и гражданских населения Бурятии. Такое равномерное распределение штаммов субтипа Beijing BL7 (MIT 642), может свидетельствовать о его давней циркуляции, позволившей распространиться ему в обеих этногруппах из первичного очага, предположительно образованного аутохтонной популяцией, которую до освоения Сибири представляли буряты.

Распределение североазиатских штаммов по типам лекарственной устойчивости носит также неоднородный характер. Несмотря на близкие частоты распространения МЛУ на изучаемых территориях, генотипическая структура МБТ, ответственных за формирование лекарственной устойчивости, имеет отличительные черты в каждом регионе. Две трети (68,2% - 363/532) МЛУ МБТ были представлены изолятами генотипа Beijing без значимого приоритета среди впервые выявленных и повторных случаев лечения ТБ по данным обобщенной выборки ($\chi^2=0,001$; $P=0,982$). Штаммы клона CC1 генотипа Beijing, несмотря на высокий уровень кластеризации профилей, включал широкое разнообразие типов лекарственной устойчивости, только треть из них (29,4% (106/306)) сопровождалась МЛУ/ШЛУ. На этом фоне штаммы CC2 имели МЛУ/ ШЛУ в 67,3% (150/223). Выявлен общий для всех изучаемых регионов значимый риск возникновения МЛУ при хронизации ТБ, вызванного штаммами Beijing CC2 (31,9% - 67/210), по сравнению с уровнями первичной МЛУ (22,8% - 72/316) (ОШ=2,056; 95% ДИ 1,397-3,028).

Подобные риски у других генотипов/ субтипов обнаружены на отдельных территориях. Значимое нарастание МЛУ среди штаммов Beijing BL7 (MIT 642) наблюдалось в группе больных с хроническим течением (15,4% - 23/149) по сравнению с первичным МЛУ-ТБ (3,2% - 5/157) ($\chi^2=12,37$; $p=0,0004$). Риск

формирования МЛУ в случае хронизации ТБ, вызванного Beijing BL7 (MIT 642), возрастает в более чем в пять раз (ОШ=5,549; 95% ДИ 2,051-15,017). Такая ситуация наиболее ярко проявляется при заражении современными эпидемическими штаммами Beijing CC1 и CC2, что наводит на мысль о сходстве механизмов циркуляции их и эндемичного для Бурятии Beijing MIT 642 (BL7).

Наблюдалось значимое преобладание распространения МЛУ/ШЛУ у S-штаммов среди изолятов non-Beijing генотипов в Саха (Якутии). Роль изолятов семейства S в распространении МЛУ весьма необычна как для Северной Азии, так и для России, а также и в глобальном масштабе.

Таким образом, на фоне широкого разнообразия MIRU-VNTR профилей лекарственно устойчивых изолятов доминирующего генотипа Beijing дополнительный вклад эндемичных вариантов возбудителя является отражением региональных характеристик популяций МБТ на изучаемых территориях и показателем напряженности эпидемиологической ситуации туберкулеза.

Оценка резервуара сочетанной инфекции ВИЧ-ТБ в изучаемом регионе по результатам ретроспективного эпидемиологического анализа (заболеваемости и пораженности ВИЧ-инфекцией и ВИЧ-ассоциированным туберкулезом) свидетельствует о том, что в анализируемом регионе Северной Азии существует крупный резервуар сочетанной инфекции туберкулеза и ВИЧ, образованный преимущественно за счет двух территорий – Иркутской области и Бурятии. Переход эпидемического процесса ВИЧ-инфекции в стадию концентрированной эпидемии в 2011 году на фоне интенсивного характера динамики показателей туберкулеза в Иркутской области в этот же период создал критические условия накопления и распространения коинфекции среди населения, в 2015 году достигнув показателя 100,5 на 100 тысяч населения. К 2016 году в Иркутской области среди впервые выявленных случаев ТБ почти каждый третий пациент был с ВИЧ-инфекцией (30,2%). В Бурятии распространение сочетанной патологии происходило более медленными темпами и достигло менее интенсивных уровней к 2016 году – 18,4 на

100 тысяч населения. В Забайкальском крае проявляются близкие к среднероссийским тенденции роста заболеваемости и распространенности сочетанной инфекции, а в Саха (Якутии) сохраняются низкие уровни показателей ВИЧ-ТБ, что свидетельствует об изолированности двух эпидемических процессов.

Кроме общей эпидемиологической оценки резервуара сочетанной ВИЧ-ТБ инфекции нами была проведена оценка спектра генотипов, циркулирующих среди больных этой эпидемиологически важно группы. Было выявлено преобладание штаммов генотипа Beijing среди больных ВИЧ-ТБ коинфекцией, распределение по субтипам которых близко общей структуре популяции МБТ в изучаемом регионе. При этом, каждый четырнадцатый случай заболевания туберкулезом, требующий стационарного лечения, у ВИЧ-инфицированных на изучаемой нами территории сопровождался выявлением микст-генотипа, в большинстве случаев фенотипически проявляющийся как МЛУ или ШЛУ-ТБ. Таким образом, успешность распространения эпидемических вариантов генотипа Beijing на фоне высоких показателей первичной и вторичной антибиотикорезистентности возбудителя и увеличения группы ВИЧ-инфицированных в регионе создали благоприятные условия для расширения и сохранения устойчивого резервуара МБТ.

Обобщая результаты эпидемиологического мониторинга, нами было проведено филогенетическое моделирование процессов распространения основных генотипов/субтипов МБТ в североазиатском регионе России.

Филогенетическое моделирование, проведенное для штаммов S по глобальным данным свидетельствует о продолжительном эволюционном периоде, прошедшем с момента заноса предковых форм этого генотипа на территорию Якутии. Это в конечном итоге предполагает исторически давний срок, прошедший с начала формирования резервуара инфекции туберкулеза, вызванного штаммами этого генотипа. Мы предполагаем, что в период первых контактов славянского населения с аборигенами Якутии (17-18 век) произошло распространение генотипов туберкулеза, которые были наиболее хорошо представлены на европейской части Российской империи. С этой точки зрения, “реликтовый” генотип S, относящийся к

евро-американской линии, является отражением спектра “европейских” генотипов (евро-американская линия), бывших по всей вероятности общими для всей Европы, включая европейскую часть России.

Несмотря на значимые различия частот генотипа Beijing на изучаемых территориях Северной Азии, выявляется общий пул доминантных штаммов Beijing CC1 и CC2, объединенных общей циркуляцией. Широкое распространение штаммов с идентичными профилями, соответствующими по классификации MLVA MtbC 15-9 94-32, 99-32 и 100-32, на всех анализируемых территориях, как и России в целом, свидетельствует об общих закономерностях экспансии этих вариантов возбудителя туберкулеза.

Вместе с тем, широкая вариация профилей Beijing CC1 позволяет предполагать, что эта группа составлена из источников различного происхождения, имеющего разную давность заноса на исследуемые территории. Соответствие большинства профилей Beijing CC1 штаммам Центрально-азиатского происхождения и их выраженная вариабельность согласуется с гипотезами заноса этих штаммов в течение широкого исторического периода, позволившего образоваться широкому вариационному ряду представителей Beijing CC1.

Напротив, штаммы Beijing CC2 комплекса, имеющие в популяции МБТ Северной Азии незначительную степень вариабельности профилей, и сконцентрированные в двух основных кластерах, самый крупный из которых отвечает по MLVA MtbC15-9 профилю 100-32, наиболее вероятно, имеют недавнюю историю. Подтверждение этой гипотезы нашло подтверждение в исследовании спектра генотипов/ субтипов, полученных от пациентов их «контрастных» возрастных групп, проживающих на территориях с различной интенсивностью миграционных потоков.

Сравнительный анализ профилей образцов ДНК МБТ из контрастных групп в Саха (Якутии), показал, что по ряду показателей выявлены значимые отличия. Последующие филогенетические построения позволили выявить, что Beijing CC2, в особенности клоновую группу W148, в основном, образуют штаммы, полученные от «пожилых» пациентов из некоренного населения (славяне) и «молодых» больных

коренной популяции (якуты). Статистически подтверждаемое выше описанное изменение ($\chi^2=4,7$; $p<0,05$), а также критически высокие уровни МЛУ среди этих штаммов, могут свидетельствовать в пользу заноса на территорию Саха (Якутия) пришлым населением эпидемически штаммов генотипа Beijing, начавших в настоящее время активную экспансию среди молодой популяции. Анализ данных Beijing CC1 - пандемического субтипа центрально-азиатского происхождения показал, что он распространен среди всех анализируемых групп. Этот факт, наряду с повышенными частотами Beijing CC1 у «пожилых» пришлых больных ТБ, по сравнению с коренными представителями нашей выборки, дает основание предполагать также экзогенную природу возникновения и укоренения штаммов на территории Саха (Якутия), однако имеющее более благоприятное развитие (отсутствие трансмиссии МЛУ вариантов МБТ).

В Иркутской области, территории сравнения, в целом, мы не обнаружили какие-либо кластеры, состоящие исключительно из штаммов, принадлежащих «пожилым» больным ТБ. К тому же, в рассматриваемой популяции МБТ среди «молодых» больных не было ожидаемого увеличения частоты субтипа Beijing CC2/W148). Уровень его встречаемости не имел значимых различий в когорте «молодых» (11/59) и «пожилых» (24/101) пациентов ($\chi^2= 0,311$, $P=0,288$). Такая ситуация может свидетельствовать об устойчивом резервуаре инфекции за счет уже сформировавшейся популяции МБТ, отличающейся разнообразием циркулирующих вариантов в основном за счет субтипов Beijing.

Таким образом, анализ полученных нами данных и разных гипотез распространения генотипа Beijing в современной России и Сибири, дает возможность предположить недавний (около пятидесяти лет назад) занос МБТ эпидемических субтипов генотипа Beijing на территорию Якутии по сравнению с другими регионами России. На основании полученных данных можно прогнозировать эпидемическую экспансию клоновой группы CC2/W148 генотипа Beijing который в процессе взросления популяции «молодых может теснить как уже имеющиеся эпидемические клоны (генотип S, субтип Beijing CC1), так и штаммы МБТ, не имеющие клонального распространения. Модель распространения

эпидемических штаммов МБТ в Саха (Якутии) по всей видимости будет во многом повторять эпидемические события уже произошедшие в большинстве регионов России, как это уже проявилось в Иркутской области.

Полученные в настоящей работе результаты молекулярно-эпидемиологической оценки популяции возбудителя позволяют скорректировать программу эпидемиологического мониторинга туберкулеза. Генотипирование микобактерий туберкулеза (дополнительно к регламентированным микробиологическим методам) с целью оценки распространенности различных генотипов и их субтипов в локальных популяциях *M. tuberculosis*, а также для выявления и отслеживания эпидемически значимых вариантов может быть осуществлено как экспресс методами, так и по развернутой схеме.

Развернутую схему, включающую 24 локусное типирование по MIRU-VNTR, делеционный анализ по RD 105/207 и спектр мутаций, ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости, следует использовать для комплексной оценки локальных популяций *M. tuberculosis* в системе эпидемиологического мониторинга для:

- получения картины территориального распределения генотипов и их субтипов, определения границ их распространения;
- оценки разнообразия циркулирующих вариантов возбудителя;
- выявления динамики изменения структуры популяции путем выборочной оценки разнообразия клинических штаммов от больных из контрастных возрастных групп;
- определения общих для разных территорий и эндемичных генотипов и субтипов;
- определения показателя их кластеризации, как индикатора активности общего резервуара инфекции и результативности программ надзора за туберкулезом;
- характеристики эпидемически значимых вариантов возбудителя с МЛУ;
- оценки взаимосвязи резервуара инфекции туберкулеза пенитенциарной системы и гражданского (постоянного) населения на отдельных территориях;

- выявления роли ВИЧ-инфицированных в поддержании или изменении резервуара инфекции;

- моделирования сценариев возникновения и распространения отдельных генотипов и субтипов возбудителя (в комплексе с полногеномными данными) с целью дальнейшего прогнозирования в системе эпидемиологического надзора за туберкулезом.

Экспресс мониторинг путем выявления эпидемически значимых субтипов возбудителя методом ПЦР-РВ наиболее целесообразно использовать как дополнительный метод для осуществления эпидемиологической диагностики в очагах (оперативный эпидемиологический анализ) в сопоставлении с эпидемиологическими данными и проведении эпидемиологического надзора в стационарах фтизиатрического профиля. Для это может быть рекомендовано включить в систему эпидемиологического надзора в областных противотуберкулезных учреждениях России мониторинг эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing в качестве маркера наиболее частого микст инфицирования больных ВИЧ-ассоциированным туберкулезом и выявления случаев нозокомиального заражения.

ВЫВОДЫ

1. В Азиатской части Российской Федерации по сравнению с ее Европейской территорией регистрируется наиболее неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу. Имеет место более высокий уровень заболеваемости ТБ на фоне низких темпов ее отрицательного прироста.
2. Максимальные показатели распространения пандемического генотипа Beijing в РФ приходятся на Северную Азию (62,0%), но носят неоднородный характер за счет исторически сформировавшейся структуры популяции *M. tuberculosis* на территориях с различной миграционной активностью. На изучаемых территориях генотип Beijing имеет близкие показатели распространения (Иркутская область – 70,8%, Бурятия – 64,5% и Агинский АО – 62,1%) и лишь на территории Республики Саха (Якутия) он встречается значительно реже (43,0%) и активная эпидемическая экспансия генотипа Beijing происходит лишь в настоящее время.
3. Эпидемические варианты генотипа Beijing имеют существенные различия на территории Северной Азии. Иркутская область характеризуется наличием стойкого очага инфекции и активной трансмиссии двух эпидемических вариантов генотипа Beijing - субтипов CC1 (30,4% - 219/719) и CC2 (19,6%-141/719). В Бурятии и Забайкальском крае, кроме указанных субтипов (CC1 (21,7% - 73/337) – и CC2 – (14,2% - 48/337), эпидемическими является штаммы Beijing BL7 (MIT 642) (15,1%-51/337). Республика Саха (Якутия) - уникальный регион Северной Азии, где выявлено наименьшее распространение штаммов CC2 (10,6% - 40/378) на фоне незначимого уменьшения CC1 (21,4% - 81/378).
4. Сформулирована концепция экспансии генотипа Beijing в России, где последним событием этого процесса было быстрое распространение субтипа CC2/W148 во второй половине XX века. В Иркутской области и республике Бурятия определена стабилизация эпидемического потенциала генотипа Beijing, в Саха (Якутия) - динамическое его увеличение.
5. В Республике Саха (Якутия) методами филогенетического моделирования выявлена значимое увеличение за последние 50 лет частоты наиболее «агрессивного» субтипа CC2/W148. Эпидемическая экспансия указанного субтипа

выражается в виде увеличения частоты его выявления у "молодого поколения" (родившихся в 1990 году и позже) больных ТБ, по сравнению с показателями коренного населения "пожилых" (родившихся в 1955 году и ранее) пациентов ($\chi^2=4,7$; $p<0,05$).

6. МЛУ штаммы МБТ в Северной Азии представляют генетически неоднородную группу, в которую преимущественно входят как эпидемические для России варианты возбудителя (СС1 и СС2 генотипа Beijing), так и эндемичные (генотип S - в Саха (Якутии), субтип Beijing MIT BL7 (MIT 642) – в Бурятии и Забайкальском крае.

7. На территории Саха (Якутии) выявлен эндемичный резервуар МЛУ-ТБ, образованный редким по величине и разнообразию кластером генотипа S (13,5%), который распространен среди всех этнических групп населения без значимых различий по этническому признаку ($\chi^2=0,309$; $p>0,05$). Он содержал в большинстве случаев (74,5% - 38/51) идентичный MIRU-VNTR профиль - 233325153325141344222372 идентифицируемый по 12-ти локусам как MIT256.

8. На основе результатов филогенетического моделирования установлено, что феномен присутствия эндемичного для Саха (Якутии) эпидемического варианта МБТ генотипа S (MIT 256) возможно является отражением спектра генотипов МБТ, характерного для России до XX века, т.е. до начала "взрывообразного" распространения эпидемических субтипов СС1 и СС2/W148 генотипа Beijing по территории СССР.

9. Частота ТБ, вызванного МБТ эпидемических вариантов генотипа Beijing, не имеет значимых отличий у больных с сочетанной патологией ВИЧ/ТБ от распределения их в общей популяции населения Восточносибирского региона. Микст-генотипы МБТ среди ВИЧ/ТБ больных встречаются значительно более часто, чем среди остальных групп больных ТБ – в 7,8% случаев.

10. Разработанный в рамках настоящей работы метод ПЦР-РВ пригоден для выявления эпидемического субтипа СС2/W148 генотипа Beijing и может быть использован в практике мониторинга популяции возбудителя ТБ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Включить в систему эпидемиологического надзора туберкулеза скрининговый мониторинг эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing, обладающего наиболее высоким потенциалом эпидемического распространения МЛУ/ШЛУ. Для проведения мониторинга эпидемического субтипа CC2/W148 генотипа Beijing достаточно выявление в ПЦР-РВ одного специфического маркера (динуклеотидной делеции в гене *kdpD*).
- Дополнить раздел эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в республике Саха (Якутия) динамическим наблюдением за штаммами субтипа CC2/W148 генотипа Beijing, активно распространяющимся в настоящее время по территории этого региона среди больных туберкулезом молодого возраста (до 25 лет).
- Расширить раздел эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза в республике Саха (Якутия) динамическим наблюдением штаммов генотипа S, как эндемичного резервуара МЛУ-ТБ. Достаточным уровнем идентификации МБТ генотипа S является MIRU-VNTR типирование по 12 локусам. Для эпидемиологического расследования цепи случаев заражения МБТ генотипа S достаточным уровнем является MIRU-VNTR типирование по 24 локусам в дополнении к данным о лекарственной устойчивости штаммов и материалам эпидемиологического анамнеза.
- Включить в эпидемиологический надзор туберкулеза в Забайкальском крае и республике Бурятия мониторинг эндемичного для этого региона субтипа Beijing MIT BL7 (MIT 642), обладающего высоким риском развития МЛУ/ШЛУ при хронизации инфекционного процесса. Достаточным уровнем идентификации МБТ субтипа Beijing MIT BL7 (MIT 642) является MIRU-VNTR типирование по 12 локусам.
- Обеспечить включение в раздел эпидемиологического мониторинга туберкулеза в приграничных с Монголией регионах России наблюдение за разнообразием субтипов генотипа Beijing для обеспечения контроля

трансграничной передачи туберкулеза. В качестве маркера рекомендуется оценка частоты выявления субтипов СС4 генотипа Beijing, характерных для Монголии, но встречающихся на уровне спорадических случаев в России. Достаточным уровнем идентификации МБТ субтипов СС4 Beijing является MIRU-VNTR типирование по 24 локусам.

- Включить в систему эпидемиологического надзора в противотуберкулезных учреждениях России мониторинг эпидемического субтипа СС2/W148 генотипа Beijing в качестве маркера наиболее частого микст инфицирования больных ВИЧ-ассоциированным туберкулезом и выявления случаев нозокомиального заражения.
- Использовать для оценки динамики изменения структуры популяции возбудителя туберкулеза в регионах России результаты выборочных скрининговых исследований штаммов МБТ от впервые выявленных больных из контрастных по возрасту групп (до 25 лет и старше 60 лет).
- Включить в методологию эпидемиологического мониторинга популяции возбудителя туберкулеза сравнительные исследования на территориях с разным уровнем внутри- и межрегиональной миграции для оценки активности распространения эпидемических вариантов МБТ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Изучение геномных последовательностей эпидемических вариантов основных генотипов МБТ в глобальных и локальных популяциях, поиск уникальных SNPs с целью использования их в качестве специфических маркеров для эпидемиологического и клинического мониторинга. Разработка и апробация ПЦР-РВ методов экспресс выявления эпидемических вариантов основных генотипов возбудителя туберкулеза из ДНК культур и клинического материала для обеспечения быстрого и эффективного эпидемиологического мониторинга и оценки динамических изменений популяции возбудителя туберкулеза.
2. Доведение экспресс-методов выявления эпидемических субтипов возбудителя туберкулеза до уровня тест-систем, используемой в системе эпидемиологического надзора туберкулеза и фтизиатрической практике.
3. Оценка спектра наиболее «опасных» генотипов и/или субтипов в локальных популяциях возбудителя туберкулеза.
4. Расширение ареала эпидемиологических мониторинговых исследований популяции возбудителя ТБ на территориях риска (в Сибирском и Дальневосточном федеральном округе) с использованием расширенной методологии (изучение структуры популяции МБТ, полученных от больных из контрастных по возрасту групп и на территориях с разным уровнем внутри- и межрегиональной миграции).
5. Проспективные клинико-эпидемиологические исследования исходов туберкулеза, вызванного разными эпидемическими генотипами/субтипами МБТ с целью прогнозирования эффективности лечения. Переход к персонализированным моделям лечения туберкулеза легких с учетом генотипической характеристики возбудителя. Профилактика нозокомиальной

передачи высоко трансмиссивных вариантов возбудителя в стационарах путем клинико-эпидемиологического мониторинга на уровне противотуберкулезного учреждения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БД – база данных

БЦЖ – бацилла Кальметта – Герена (англ. *Bacillus Calmette – Guérin*, BCG), вакцина против туберкулёза

ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДФО – Дальневосточный федеральный округ

ЛУ – лекарственная устойчивость

МБТ – микобактерия туберкулеза

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МЛУ ТБ – множественно лекарственно- устойчивый туберкулез

ПДРФ- полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПТП - противотуберкулезные препараты

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени

СФО – Сибирский федеральный округ

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

СС1 – «клональный комплекс 1» штаммов генотипа Beijing, определяемый по результатам 24 MIRU-VNTR типирования и полногеномного секвенирования (англ. clonal complex)

СС2 – «клональный комплекс 2» штаммов генотипа Beijing, определяемый по результатам 24 MIRU-VNTR типирования и полногеномного секвенирования (англ. clonal complex)

СС2/W148 – клоновая группа штаммов клонального комплекса 2 генотипа Beijing, имеющих специфическую мутацию в гене *kdpD*.

СФО – Сибирский федеральный округ

ТБ – туберкулез

LAM – Латино-Американско-Средиземноморское (англ. Latin American Mediterranean) семейство штаммов туберкулеза

MIRU – микобактериальные дисперегированные единицы переменного числа копий (англ. Mycobacterial Interspersed Repetitive Units)

MIT – международный номер MIRU-VNTR-профиля в базе данных SITVIT (англ. MIRU International Type)

MTBC - Mycobacterium tuberculosis complex

OR – отношение шансов (ОШ) (англ. Odd Ratio)

Repeat)

RR –относительный риск (анг. relative risk)

SITVIT (SpolDB4) – глобальная база данных известных генотипов микобактерий, первоначально содержала только данные сполиготипирования (SpolDB4), в настоящее время после объединения с данными о MIRU-VNTR генотипах получила название SITVIT (http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/query)

SNP – однонуклеотидный полиморфизм (англ. Single Nucleotide Polymorphism)

UPGMA – филогенетический метод на основе вычисления невзвешенного попарного арифметического среднего (англ. Unweighted Pair-Group Method Averages)

VNTR – переменное число tandemных повторов (англ. Variable Number Tandem

WGS – полногеномное секвенирование (англ. whole genome sequencing)

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Изоляты - выращенные из клинического материала на специализированных культуральных средах, идентифицированные *M. tuberculosis*.

Кластер – два и более изолята *M. tuberculosis*, имеющие идентичный профиль, полученный путем генотипирования.

Эпидемический генотип/субтип МБТ – совокупность штаммов *M. tuberculosis* одного генотипа/субтипа, имеющих минимальные генетические различия (не имеет генетических дериватов), в доминирующем количестве циркулирующих на определенной территории.

Трансмиссивный генотип/субтип – эпидемиологическая характеристика штаммов *M. tuberculosis* определенного генотипа/субтипа, широко распространенного в популяции больных ТБ, включающего как эпидемический генотип/субтип, так и возникшие как результат дивергенции его близкородственные варианты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксютин Л.П. Роль эпидемиологического метода выявления туберкулеза у детей // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – Т. 77, №1. – С. 179-182.
2. Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Женщины и ВИЧ //Материалы научно-практической конференции. [Электронный ресурс]. – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2017. – 386 с. – Режим доступа: <http://congress-ph.ru/common/htdocs/upload/fm/vich/17/tezis.pdf> (дата обращения 29.09.2017).
3. Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Буракова М.В., Васильева И.А., Черноусова Л.Н. Сравнение картриджной технологии XPERT MTB/RIF с микробиологическими методами выявления микобактерий туберкулёза и определения лекарственной чувствительности // Туберкулез и социально-значимые заболевания. –2013. – № 2. – С. 25-29.
4. Антушева Е.В., Миронюк О.М., Тарасова И.В., Елисеев П.И., Плюснина Г.П., Марьяндышев А.О. Расследование вспышки туберкулеза в медико-социальном учреждении Архангельской области с использованием молекулярно-генетических методов // Туберкулез и болезни легких . – 2014. –Т.91, № 3. – С. 36-39.
5. Батыршина Я.Р., Петренко Т.И. Факторы, ассоциированные с приобретенной устойчивостью *MycobacteriumTuberculosis* к фторхинолонам в Новосибирской области // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т.91, № 5. – С. 26-35.
6. Беляков Н.А., Рассохин В.В., Трофимова Т.Н., Степанова Е.В., Пантелеев А.М., Леонова О.Н., Бузунова С.А., Коновалова Н.В., Миличкина А.М., Тотолян А.А. Коморбидные и тяжелые формы ВИЧ-инфекции в России // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2016. – Т. 8, № 3. – С. 9-25.
7. Богородская Е.М., Данилова И. Д., Ломакина О.Б. Формирование у больных туберкулезом стимулов к выздоровлению и соблюдению режима химиотерапии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2007. – № 3. – С.46-63.
8. Богословская Е.В., Шипулин Г.А., Башкиров Л.Ю., Кравченко А.В., Покровский В.В. Определение лекарственной устойчивости ВИЧ у пациентов,

получавших противоретровирусную терапию // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2004. – №4. – С 38-40.

9. Боровиков В. П. STATISTICA – Статистический анализ и обработка данных в среде Windows / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. – М.: Информ. – изд. дом “Филинь”, 1997. – 608 с.

10. Валиев Р.Ш., Хартынова И.М., Романенко О.М. Клинико-иммунологические особенности течения туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией // Проблемы туберкулеза. – 2005. – №10. – С. 31-34.

11. Вартанян Ф.Е., Шаховский К.П. Туберкулез, ассоциированный с ВИЧ-инфекцией, в странах мира // Эпидемиология и инфекционные болезни. –2007. – №3. – С. 42-44.

12. Виноградова Т.Н., Недодаева Т.С., Рассохин В.В., Шабарова З.А. Модель оказания амбулаторной помощи ВИЧ-инфицированным пациентам: проблемы и перспективы // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2011. –Т. 3, № 1. – С. 47-51.

13. Винокурова М.К., Яковлева Л.П., Кондаков С.Н., Петухова Н.Ю. Эффективность лечения и диспансерного наблюдения впервые выявленных больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 7-2. – С. 286-290.

14. Власов, В. В. Эпидемиология: учеб. пособие для вузов / В. В. Власов. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2005. – 464 с.

15. Власова Н.А., Степаншина В.Н., Мухина Т.Н., Миронова Р.И., Марьяндышев А.О. Исследование нозокомиального инфицирования методами RFLP-IS6110 И MIRU-VNTR в отделении для больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью // Туберкулез и болезни легких. – 2014. –Т.91, № 1. – С. 43-46.

16. Вязовая А.А., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И., Нарвская О.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium Tuberculosis*, циркулирующих в Псковской области // Туберкулез и болезни легких. – 2012. –Т.89, № 6. – С. 35-39.

17. Гавриленко В.В., Кочкин А.В., Филиппова Т.П., Новицкая О.Н., Захарова В.А. Факторы, влияющие на летальность больных с ВИЧ-ассоциированным туберкулезом органов дыхания. // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – Т. 105, № 6. – С. 191-192.

18. Гельберг И.С., Вольф С.Б., Алексо Е.Н. Факторы риска развития туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2015. – №1. – С. 17-22.

19. Гельберг И.С. Вольф С.Б., Шевчук Д.В., Авласенко В.С., Алексо Е.Н., Демидик С.Н., Чалая Е.В., Коршук О.М., Сенько Ж.Л., Цветницкая А.С., Шейфер Ю.А., Гайко С.П. Клинические особенности множественно-лекарственно-устойчивого туберкулеза легких и эффективность его лечения в специализированном отделении // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – Т. 36, № 4. – С. 55-57.

20. Дымова М.А., Ляшенко А.А., Потейко П.И., Кашуба Д.А., Стадникова А.В., Крутько В.С., Филипенко М.Л. Генетическое разнообразие штаммов *Mycobacterium Tuberculosis*, циркулирующих на территории Харьковской области Украины // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2011. – Т. 26, №. 1. – С. 19-23.

21. Дымова М.А., Альховик О.И., Чередниченко А.Г., Кожамкулов У.А., Петренко Т.И., Раманкулов Е.М., Филипенко М.Л. Идентификация генотипов *Mycobacterium tuberculosis*, ассоциированных с резистентностью и чувствительностью к лекарственным препаратам. / Medline.ru. – 2012. – Т. 13, № 3. – С. 672-681.

22. Дымова М.А., Альховик О.И., Чередниченко А.Г., Храпов Е.А., Петренко Т.И., Филипенко М.Л. Генотипирование изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, характеризующихся широкой лекарственной устойчивостью / Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2013. – Т. 11, № 1. – С. 110-117.

23. Ерохин В.В., Алексеева Л.П., Мартынова М.В., Корнилова З.Х. Социально-психологическая реабилитация больных туберкулезом в сочетании с

ВИЧ-инфекцией, ранее пребывавших в местах лишения свободы // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т. 91, № 6. – С. 25-34.

24. Зими́на В.Н., Васи́льева И.А., Баты́ров Ф.А. Особенности течения и эффективность лечения больных туберкулезом на поздних стадиях ВИЧ-инфекции // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – Т. 87, № 3. – С. 23-27.

25. Зими́на В.Н., Кра́вченко А.В. Влияние этиотропной терапии на иммунный статус больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом // Терапевтический архив. – 2015. – Т. 87, № 11. – С. 37-41.

26. Зуева, Л. П. Эпидемиологическая диагностика / Л. П. Зуева, С. Р. Еремин, Б. И. Асланов – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2009. – 312 с.

27. Кавтарашвили С.М., Клевно Н.И., Мадасова В.Г., Аксёнова В.А. Очаги смерти от туберкулёза, степень их эпидемической опасности в развитии туберкулёза с лекарственной устойчивостью возбудителя у детей // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – Т. 90, № 3. – С. 38-39.

28. Кириллова Н.В., Федосова Е.А., Наранбат Н., Оюунтуяа Т., Буянхишиг Б., Энхсайхан Д., Демкин В.В., Нимадава П. Структура популяции *M. Tuberculosis* в Монголии по результатам генотипирования полиморфизмов больших последовательностей // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2011. – Т. 26, №. 4. – С. 3-7.

29. Концевая И.С., Макурина О.Н., Николаевский В.В. Распространенность полиморфизмов в генах, ассоциированных с вирулентностью, среди штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Самарской области / Вестник Самарского государственного университета. – 2014. – Т. 114, № 3. – С. 178-186.

30. Концевая И.С., Николаевский В.В., Балабанова Я.М. Молекулярная эпидемиология туберкулеза: задачи, методы, перспективы. /Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2011. – № 1. – С. 3-10.

31. Концевая И.С., Николаевский В.В., Садыхова А.В., Ковалёв А.М., Игнатьева О.А., Родионова Ю.Д., Балабанова Я.М., Макурина О.Н. Распространенность генетических групп *Mycobacterium tuberculosis* по районам

Самарской области / Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т. 16, № 1-1. – С. 317-320.

32. Концепции химиотерапии и этиологической (микробиологической и молекулярно-биологической) диагностики туберкулеза в российской федерации на современном этапе // Медицинский альянс. – 2013. – № 1. – С. 5-37.

33. Корецкая Н.М., Большакова И.А. Характеристика первичной лекарственной устойчивости и жизнеспособности микобактерий у больных туберкулезом в сочетании с ВИЧ-инфекцией //Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 2. – С. 16-20.

34. Корецкая Н.М., Шогжал И.С. Современная клинико-социальная характеристика впервые выявленного туберкулеза органов дыхания у женщин республики Тыва // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2012. – Т. 84, №1. – С. 91-95.

35. Корецкая Н.М., Шогжал И.С. Характеристика впервые выявленного туберкулеза органов дыхания у женщин Красноярского края // Здравоохранение Российской Федерации. – 2014 . – Т.58 , № 5. – С. 29-33.

36. Корж Е.В., Глушова Т.В. Влияние антиретровирусной терапии на лечение туберкулезного менингоэнцефалита у ВИЧ-инфицированных пациентов. // Проблемы здоровья и экологии. – 2014. – Т. 39, № 1. – С. 62-66.

37. Кощев М.Е., Галимов С.А., Зоркальцева Е.Ю., Астафьев В.А., Савилов Е.Д. Эпидемиология туберкулеза в Иркутской области // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2011. – № 2. – С. 138-142.

38. Краснов В.А., Ревякина О.В., Филимонов П.Н., Степанов Д.В., Мальцев А.В. Влияние отдельных демографических и географических факторов на оказание противотуберкулёзной помощи в регионах Сибири и Дальнего Востока. // Туберкулез и болезни легких. –2012. – № 8. – С.10-15.

39. Кузнецов С.И., Захарова С.М., Мелентьев А.С., Федорин И.М., Гусарова Г.И., Радди М., Балабанова Я.М., Грэм К., Елизарова Э.Д., Крюкова Э.Г., Маломанова Н.А. Анализ факторов риска возникновения лекарственной

устойчивости у больных туберкулезом гражданского и пенитенциарного секторов в самарской области России // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. - № 5. – С. 25-31.

40. Литвинов В.И. Лабораторная диагностика вызываемых микобактериями заболеваний и изучение лекарственной чувствительности их возбудителей // Туберкулез и социально-значимые заболевания. – 2013. – №1. – С. 28-36.

41. Маркелов Ю.М., Марьяндышев А.О. Роль амплификации лекарственной устойчивости в формировании приобретённой множественной лекарственной устойчивости // Туберкулез и болезни легких. – 2013. –Т.90, № 7. – С. 22-27.

42. Маркелов Ю.М., Пахомова Е.В.Эпидемиология, выявление и проблемы контроля коинфекции ВИЧ и туберкулеза в республике Карелия. // Российский медицинский журнал. – 2016. – Т. 22, № 6. – С. 305-310.

43. Маркелов Ю.М.Особенности туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью и приоритетные мероприятия по ограничению его распространения в Карелии // Вестник современной клинической медицины. –2011. – Т.4, № 3. – С. 50-56.

44. Медведева Т.В., Огарков О.Б., Некипелов О.М., Ушаков И.В., Козьякова Е.С., Скворцова Р.Г. MIRU-VNTR генотипирование штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Восточной Сибири: семейство Beijing против Kilimanjaro. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2004. – № 4. – С.33-38.

45. Миронюк О.М., Никишова Е.И., Антушева Е.В., Марьяндышев А.О. Регистрация и результаты лечения больных с рецидивами заболевания туберкулезом в Архангельской области // Туберкулез и болезни легких. – 2014. –Т.91, № 1. – С. 27-33.

46. Мокроусов И.В. Методологические подходы к генотипированию *Mycobacterium tuberculosis* для эволюционных и эпидемиологических исследований // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 3. – С. 603-614.

47. Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Старкова Д.А., Нарвская О.В. Высокора разрешающее типирование штаммов генотипа Beijing российской популяции *Mycobacterium tuberculosis* / Туберкулез и болезни легких. 2012. Т. 89. № 7. С. 46-53.

48. Мокроусов И.В., Нарвская О.В., Вязовая А.А., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И. Геноидентификация эпидемиологически и клинически значимого варианта *Mycobacterium tuberculosis* Beijing B0/W148 // Туберкулез и болезни легких. – 2012. Т. 89, № 10. – С. 33-36.

49. Мордык А.В., Ситникова С.В., Пузырева Л.В., Назарова О.И., Фурсевиц Л.Н. Оценка проявлений ВИЧ-инфекции и результатов лечения пациентов от туберкулеза в специализированном стационаре // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2015. – Т. 7, № 1. – С. 69-75.

50. Мордык А.В., Удалова Т.Ю., Ситникова С.В., Пузырева Л.В., Леденева Т.Н. Личность пациента туберкулез/ВИЧ // Дальневосточный медицинский журнал. – 2016. – № 1. – С. 50-53.

51. Мошкович Г.Ф., Минаева С.В. и соавт. Оценка эффективности различных схем ВААРТ у больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом / Материалы III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2009. – С. 77-78.

52. Мякишева Т.В., Гуденков М.А. Эпидемиологическая ситуация и динамика лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Смоленской области за 2005-2010 гг. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 1. – С. 4-9.

53. Найговзина Н.Б., Филатов В.Б., Ерохин В.В., Пунга В.В. Туберкулез в Российской Федерации // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – №3. – С. 4-9.

54. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Лялина Л.В., Шульгина М.В., Мясникова Е.Б., Журавлев В.Ю., Белиловский Е.М., Умпелева Т.В., Кравченко М.А. Молекулярно-генетические исследования возбудителя в системе эпидемиологического надзора за туберкулезом // Медицинский альянс. – 2014. – № 1. – С. 75-85.

55. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*,

выделенных на северо-западе России // Туберкулез и болезни легких. – 1999. – № 1. – С. 39.

56. Нечаев В.В., Иванов А.К., Федуняк И.П., Мусатов В.Б., Погромская М.Н., Бубочкин А.Б., Пожидаева Л.Н., Сакра А.А. Характеристика летальности как показателя социальной значимости сочетанных инфекций // Журнал инфектологии. – 2016. – Т. 8, № 1. – С. 51-56.

57. Нечаева О.Б., Одинцов В.Е. Эпидемическая ситуация по туберкулезу и ВИЧ инфекции в учреждениях уголовно-исполнительной системы России // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 3. – С. 36-41.

58. Николаева С.В. Предварительные результаты лечения больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью с 2008 по 2011 год в Республике Бурятия // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2011. – Т. 78, №2 – С. 79-84.

59. Новицкая О.Н., Артёмчик М.С., Суханова А.Р., Мусурманкулов М., Круглова С.А. Сравнительная эффективность лечения ВИЧ-инфицированных пациентов с множественной лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза // В сборнике: Актуальные вопросы ВИЧ-инфекции. Материалы Международной научно-практической конференции. – Москва, 2016. – С. 120-122.

60. Норкина О. В., Киншт В. Н., Мокроусов И. В., Курунов Ю. Н., Краснов В. А., Филипенко М. Л. Генетическое разнообразие *Mycobacterium tuberculosis* и оценка факторов риска распространения заболевания туберкулезом в Сибирском регионе России методами молекулярной эпидемиологии. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2003. – № 3. – С. 9-118.

61. Носова Е.Ю., Краснова М.А., Галкина К.Ю., Букатина А.А., Исаева Ю.Д. Молекулярно-генетические исследования во фтизиатрии // Туберкулез и болезни легких. – 2011. – №6. – С. 28-32.

62. Общая эпидемиология с основами доказательной медицины: учеб. пособие / под. ред. В. И. Покровского, Н. И. Брико. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 496 с.

63. Огарков О.Б., Медведева Т.В., Zozio T., Погорелов В.И., Некипелов О.М., Гутникова М.Ю., Купцевич Н.Ю., Ушаков И.В., Sola C. Молекулярное типирование штаммов микобактерий туберкулеза в Иркутской области (Восточная Сибирь) в 2000-2005 гг. // Молекулярная медицина. – 2007. – № 2. – С. 33-38.

64. Огарков О.Б., Медведева Т.В., Беликов С.И., Курепина Н.Е., Деникина Н.Н., Ушаков И.В. Оценка эффективности ERIC-PCR типирования *Mycobacterium tuberculosis* при изучении распространения устойчивых к антибиотикам штаммов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2002. – № 1. – С.21-24.

65. Отраслевые и экономические показатели противотуберкулёзной работы в 2009 - 2014 гг. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mednet.ru/ru/czentr-monitoringa-tuberkuleza/produkcziya-czentra/analiticheskie-obzory.html> (дата обращения 20.06.2017).

66. Пасечник О.А., Стасенко В.Л., Блох А.И. Эпидемиологические проявления туберкулезной инфекции в регионах Сибири с различной распространенностью ВИЧ-инфекции // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2015. – Т. 14, № 5 (84). – С. 31-35.

67. Петри, А. Наглядная медицинская статистика: пер. с англ. / А. Петри, К. Сэбин; под ред. В. П. Леонова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 168 с.

68. Покровский В.В. ВИЧ-инфекция и СПИД. Клинические рекомендации. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 186 с.

69. Пьянзова Т.В., Конончук О.Н., Примкулова М.В. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя у пациентов с сочетанием туберкулеза и ВИЧ-инфекции // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т. 91, № 9. – С. 58-59.

70. Пьянзова Т.В., Конончук О.Н., Примкулова М.В. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя у пациентов с сочетанием туберкулеза и ВИЧ-инфекции // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т.91, № 9. – С. 58-59.

71. Рахманова А.Г., Яковлев А.А., Комарова Д.В., Малашенков Е.А., Власова Ю.В., Козлов А.А. Характеристика летальных исходов от туберкулеза у больных с ВИЧ-инфекцией // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2012. – Т. 4, №2. – С. 120-123.

72. Розенберг В.Я., Плотникова Ю.К., Еропова Ю.С., Кошкина О.Г., Кощев М.Е., Зоркальцева Е.Ю. Мероприятия противодействия распространению сочетанной патологии туберкулез и ВИЧ-инфекция в Иркутской области в 2010-2013 гг. Итоги межведомственного взаимодействия // Туберкулез и болезни легких. –2014. – Т. 91, № 9. – С. 62-63.

73. Рублева Н.В., Коломиец В.М., Новикова С.Н., Лебедев И.Ю., Шахова Ю.И., Ледовская Т.И., Ковтун В.Н. Особенности психологического статуса больных ВИЧ- ассоциированным туберкулезом легких с низкой приверженностью лечению / под общей редакцией Л.В. Силиной, В.М. Коломиец, В.Я. Провоторова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инфекционные болезни как междисциплинарная проблема». – 2016. – С. 224-228.

74. Руководство по программному ведению лекарственно-устойчивого туберкулеза // Всемирная организация здравоохранения: Весь мир, 2007. –209 с.

75. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала // Новосибирск: Наука-Центр, 2011. – 156с.

76. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Молекулярно-генетические особенности лекарственной устойчивости к рифампицину и распространенность мутаций в гене *rpoB* на территории Саратовской области.// Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т.91, № 3. – С. 22-26.

77. Синицын М.В., Белиловский Е.М., Борисов С.Е., Рыбка Л.Н., Данилова И.Д., Котова Е.А. Сравнительная оценка эффективности лечения больных туберкулёзом в зависимости от наличия ВИЧ-инфекции. // Туберкулез и социально-значимые заболевания. –2016. – № 5. – С. 18-25.

78. Синьков В.В., Савилов Е.Д., Огарков О.Б. Эпидемиология туберкулёза в России: молекулярные и исторические доказательства в пользу сценария распространения пекинского генотипа *M. tuberculosis* в XX в // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 3. – С. 57-62.

79. Ситникова С.В., Удалова Т.Ю., Мордык А.В. Учет личностных особенностей больных с сочетанием туберкулеза и ВИЧ-инфекции при организации процесса лечения. // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 7. – С. 129-131.

80. Ситуация по туберкулезу в России в 2015 году [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mednet.ru/ru/czentr-monitoringa-tuberkuleza/produkcziya-czentra/analiticheskie-obzory.html> (дата обращения 28.03.2017).

81. Скорняков С.Н., Умпелева Т.В., Вязовая А.А., Кравченко М.А., Еремеева Н.И., Нарвская О.В. Генотипирование уральских изолятов *Mycobacterium tuberculosis* /Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9-11. – С. 2485-2488.

82. Скорняков С.Н., Шульгина М.В., Журавлев В.Ю., Тотолян А.А., Старшинова А.А., Покровский В.И., Загдын З.М., Сердобинцев М.С., Мушкин А.Ю., Борисов С.Е., Павлова М.В., Яблонский П.К., Соколович Е.Г., Аветисян А.О., Ариэль Б.М., Арчакова Л.И., Баласанянц Г.С., Беляков Н.А., Бердес А.И., Бирон М.Г. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / Главный редактор - Яблонский П.К.. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 240 с.

83. Справка. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации на 31 декабря 2016 г. [Электронный ресурс]. – М. – 2017. – Режим доступа: <http://docplayer.ru/53897054-Spravka-vich-infekciya-v-rossiyskoy-federacii-na-31-dekabrya-2016-g.html> (дата обращения 28.03.2017).

84. Стерликов С.А., Тестов В.В. Эффективность лечения больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя, зарегистрированных в 2010 г. // Туберкулез и болезни легких . – 2014. –Т.91, № 3. – С. 12-17.

85. Тарлыков П.В. Райымбек Д. Р., Аленова А. Х., Абилдаев Т. Ш., Раманкулов Е. М. Генотипирование изолятов *M. Tuberculosis* с широкой

лекарственной устойчивостью, циркулирующих в южных регионах Казахстана // Туберкулез и болезни легких . – 2015. - № 9. – С. 41-46.

86. Татьков С.И., Воронкова О.В., Уразова О.И., Сивков АЛО., Хасанова Р.Р., Новицкий В.В., Стрелис А.К., Мишустец С.П., Павлова В.Е., Наследникова И.О., Никулина Е.Л. Циркуляция на территории Томской области *M. tuberculosis* генетического семейства Beijing // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2008. – №4. – С. 13-17.

87. Туберкулез в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире.– М., 2015. – 312 с

88. Туберкулез в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах. - Информационно-аналитический обзор. – Новосибирск, 2011. – 54 с.

89. Тырылгин, М.А. Проблемы охраны здоровья населения Крайнего Севера: на примере региона Якутия / под ред. М. И. Томского // Рос. акад. наук, Сиб. отделение, Якут. науч. центр. – Новосибирск: Наука, 2008. – 303 с.

90. Умпелева Т.В., Кравченко М.А., Еремеева Н.И., Вязовая А.А., Нарвская О.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории уральского региона России // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т. 3, № 1 . – С. 21-28.

91. Филинюк О.В., Фелькер И.Г., Янова Г.В., Буйнова Л.Н., Колоколова О.В. Факторы риска неэффективной химиотерапии больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью // Туберкулез и болезни легких. – 2014. –Т.91, № 1. – С. 20-26.

92. Филиппова О.П., Ревякина О. В., Алексеева Т. В. Оценка эффективности лечения больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в сибирском и дальневосточном федеральных округах // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 9. – С. 6-12.

93. Фролова О.П., Новоселова О.А., Щукина И.В., Казенный А.Б. Оказание противотуберкулезной помощи больным ВИЧ с учетом стадий ВИЧ-инфекции //Здравоохранение. –2015. – № 12. – С. 72-79.

94. Фролова О.П., Новоселова О.А., Щукина И.В., Стаханов В.А., Казенный А.Б. Туберкулез у больных ВИЧ-инфекцией: эпидемиологическая ситуация в Российской Федерации, выявление и профилактика в современных условиях // Вестник РГМУ. – 2013. – № 4. – С. 44-48.

95. Фролова О.П., Шинкарева И.Г., Новоселова О.А. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации - фактор, замедляющий снижение заболеваемости туберкулезом. // Медицинский альянс. 2013. – № 1. – С. 50-55.

96. Цыбикова Э.Б. О причинах смерти впервые выявленных больных туберкулезом легких // Здравоохранение Российской Федерации. – 2013. – № 1. – С. 15-19.

97. Цыбикова Э.Б. Эпидемиологические индикаторы туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией [Электронный ресурс]. Эл. научн. журн. Социальные аспекты здоровья населения. – Режим доступа: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/438/30> (дата обращения 26.03.2017).

98. Шальмин А.С., Ясинский Р.Н., Растворов А.А., Мирошниченко Д.В. Факторы риска прогрессирования и критерии оценки течения ВИЧ/СПИД-ассоциированного туберкулеза легких. // Туберкулез, легочные болезни, ВИЧ-инфекция. – 2014. – № 4 (19). – С. 58-63.

99. Шурыгин А.А., Барламов О.П., Варанкина А.А., Ширинкина А.Е., Бобыкина С.Д. Особенности течения туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – Т.91, № 9. – С. 82- 86.

100. Эйсмонт Н.В., Скорняков С.Н. Влияние высокоактивной антиретровирусной терапии на эффективность стационарного лечения туберкулеза у больных с поздними стадиями ВИЧ-инфекции. // Уральский медицинский журнал. – 2012. – № 5. – С. 143-147.

101. Эйсмонт Н.В., Скорняков С.Н., Сенин А.М. Влияние стартового режима химиотерапии на эффективность стационарного лечения впервые выявленных больных туберкулезом в сочетании с поздними стадиями ВИЧ-инфекции. // Уральский медицинский журнал. – 2013. – № 8 (113). – С. 59-64.

102. Abubakar I., Zignol M., Falzon D., Raviglione M., Ditiu L., Masham S. et al. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership / *Lancet Infectious diseases*. –2013. – № 13(6). – P. 529-39.
103. Acosta CD., Dadu A., Ramsay A., Dara M. Drug-resistant tuberculosis in Eastern Europe: challenges and ways forward // *Public Health Action*. –2014. – № 21;4(Suppl 2). – P. 3-12.
104. Adams L.V., Kreiswirth B.N., Arbeit R.D. et al. Molecular epidemiology of HIV associated tuberculosis in Dar es Salaam, Tanzania: strain predominance, clustering, and polyclonal disease // *Journal of clinical microbiology*. – 2012. – № 50(8). – P. 2645–50.
105. Afanas'ev M.V., Ikryannikova L.N., Il'ina E.N., Kuz'min A.V., Larionova E.E., Smirnova T.G. et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* circulated in Moscow, Russian Federation // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2011. – № 30. – P. 181–191.
106. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010. – №8. –P. 260–271.
107. Anonymous. Global Tuberculosis Report 2012. [Электронный ресурс]. – Geneva: World Health Organization; 2012. – Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf (дата обращения 26.03.2017).
108. Anonymous. European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance // *Emerg. Infect. Dis.* 2006. – № 12(5). – P. 736–743.
109. Balabanova Y., Nikolayevskyy V., Ignatyeva O., Kontsevaya I., Mironova S., Kovalyov A. et al. Beijing clades of *Mycobacterium tuberculosis* are associated with differential survival in HIV-negative Russian patients // *Infect. Genet. Evol.* – 2015. – № 36. – P. 517-523.
110. Barrios-Payan J., Saqui-Salces M., Jeyanathan M., Alcantara-Vazquez A., Castanon-Arreola M., Rook G., et al. Extrapulmonary locations of mycobacterium

tuberculosis DNA during latent infection // *The Journal of infectious diseases*. – 2012. – № 206(8). – P. 1194–205.

111. Behr M.A., Waters W.R. Is tuberculosis a lymphatic disease with a pulmonary portal? // *The Lancet Infectious diseases*. – 2014. – № 14(3). – P. 250–255.

112. Benavente E.D., Coll F., Furnham N., McNerney R., Glynn J.R. et al. PhyTB: Phylogenetic tree visualisation and sample positioning for *M. tuberculosis* // *BMC bioinformatics*. – 2015. – 16 (1):155.

113. Bhattar P., Chatterjee A., D'souza D., Tolani M., Mistry N. (2012) Estimating Fitness by Competition Assays between Drug Susceptible and Resistant *Mycobacterium tuberculosis* of Predominant Lineages in Mumbai, India // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, №3. – e33507.

114. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. // *Trends Microbiol.* – 2002. – Vol. 10, №1. –P. 45-52.

115. Bonura C., Mammina C., Refrégier G. Sola C. The reconstruction of the *Mycobacterium tuberculosis* "S" family history using Sicily as a start point. What did we learn from 20 years of spoligotyping VNTR and SNP typing? [Электронный ресурс] Abstract of 35th Congress of the European Society of Mycobacteriology. 2014. Vol. 5. – Режим доступа : <https://www.researchgate.net/publication/266156625> (дата обращения 27.06.2015)

116. Borrell S., Gagneux S. Strain diversity, epistasis and the evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2011. – №17. – P. 815–820.

117. Bos K.I., Harkins K.M., Herbig A., Coscolla M., Weber N., Comas I., et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis // *Nature*. – 2014. – № 514(7523) – P. 494-497.

118. Brown A.C., Bryant J.M., Einer-Jensen K., Holdstock J., Houniet D.T., Chan J.Z. et al Rapid Whole-Genome Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Directly from Clinical Samples // *J. Clin. Microbiol.* – 2015. – № 53(7). – P. 2230-2237.

119. Bryant J.M., Schurch A.C., van Deutekom H., Harris S.R., de Beer J.L., de Jager V. et al. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data // *BMC Infectious Diseases*. – 2013. – 13:110.
120. Campbell P.J., Morlock G.P., Sikes R.D., Dalton T.L., Metchock B., Starks A.M. et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – № 55(5). – P. 2032-2041.
121. Carvalho A.C., DeRiemer K., Nunes Z.B., Martins M., Comelli M., Marinoni A. et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to contacts of HIV-infected tuberculosis patients. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2001. – № 164. – P. 2166-2171.
122. Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Harris S.R., Ignatyeva O., Kontsevaya I. et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population // *Nat. Genet.* – 2014. – № 46. – P. 279-286.
123. Casali N., Nikolayevskyy V., Balabanova Y., Ignatyeva O., Kontsevaya I., Harris S.R. et al. Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia // *Genome Res.* – 2012. – №22(4). –P. 735-45.
124. Caws M., Thwaites G., Dunstan S., Hawn T.R., Lan N.T., Thuong N.T. et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 28, №4(3). – e1000034.
125. Chihota V.N., Grant A.D., Fielding K., Ndibongo B., van Zyl A., Muirhead D., et al. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2010. – №14. – P. 1024–1031.
126. Christianson S., Wolfe J., Orr P., Karlowsky J., Levett P.N., Horsman G.B. et al. Evaluation of 24 locus MIRU-VNTR genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Canada // *Tuberculosis (Edinb)*. –2010. – № 90(1). – P. 31-38.
127. Click E.S., Moonan P.K., Winston C.A. Cowan L.S., Oeltmann J.E. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* phylogenetic lineage and clinical site of tuberculosis // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. – 2012. – № 54(2). – P. 211–219.

128. Cohen K.A., Abeel T., Manson McGuire A., Desjardins C.A., Munsamy V., Shea T.P. et al. Evolution of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis over Four Decades: Whole Genome Sequencing and Dating Analysis of Mycobacterium tuberculosis Isolates from KwaZulu-Natal // *PLoS Med.* – 2015. – Vol. 29, № 12(9). – e1001880.
129. Cohen T., Sommers B., Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of Mycobacterium tuberculosis // *Lancet Infect. Dis.* – 2003. № 3. P. 13–21.
130. Cohen T., van Helden P.D., Wilson D., Colijn C., McLaughlin M.M., Abubakar I. et al. Mixed-strain mycobacterium tuberculosis infections and the implications for tuberculosis treatment and control // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2012. – № 25(4). – P. 708-719.
131. Coll F., Mallard K., Preston M.D., Bentley S., Parkhill J., McNerney R., et al. SpolPred: rapid and accurate prediction of Mycobacterium tuberculosis spoligotypes from short genomic sequences // *Bioinformatics.* –2012. –№ 28(22). – 2991–2993.
132. Coll F., Preston M., Guerra-Assuncao J.A., Hill-Cawthorn G., Harris D., Perdigo J., et al. PolyTB: a genomic variation map for Mycobacterium tuberculosis // *Tuberculosis.* – 2014. – № 94(3). – P. 346–354.
133. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K.E., Kato-Maeda M., Parkhill J. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans // *Nat. Genet.* – 2013. – № 45(10). –P. 1176-1182.
134. Comolet T. Multidrug-resistant tuberculosis: challenges of a global emergence // *Bull. Soc. Pathol. Exot.* –2015. – № 108(4). – P. 290-298.
135. Constant P., Perez E., Malaga W., Lanéelle M.A., Saurel O., Daffé M. et al. Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the Mycobacterium tuberculosis complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 11. – № 277(41). – P. 38148-38158.
136. Corbett E.L., Charalambous S., Moloi V.M., Fielding K., Grant A.D., Dye C., et al. Human immunodeficiency virus and the prevalence of undiagnosed tuberculosis in African gold miners // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2004. – №. 170. – P. 673–679.

137. Couvin D., Rastogi N. Tuberculosis - A global emergency: Tools and methods to monitor, understand, and control the epidemic with specific example of the Beijing lineage // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2015. – №95. – Suppl 1:S177-189.
138. Crampin A.C., Mwaungulu J.N., Mwaungulu F.D., Mwafulirwa D.T., Munthali K., Floyd S. et al. Recurrent TB: relapse or reinfection? The effect of HIV in a general population cohort in Malawi // *AIDS*. – 2010. № 24. – P. 417–426.
139. Cruciani M., Malena M., Bosco O., Gatti G., Serpelloni G. The impact of human immunodeficiency virus type 1 on infectiousness of tuberculosis: a meta-analysis // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – №.33(11). – P.1922-1930.
140. Day J.H., Grant A.D., Fielding K.L., Morris L., Moloji V., Charalambous S. et al. Does tuberculosis increase HIV load? // *J. Infect. Dis.* – 2004. – №. 190. – P.1677–1684.
141. De Beer J.L., Kodmon C., van der Werf M.J., van Ingen J., van Soolingen D. ECDC MDR-TB Molecular Surveillance Project Participants. Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011 // *Euro Surveill.* – 2014. – №19. – pii: 20742
142. /Demay C Liens B, Burguière T, Hill V, Couvin D, Millet J, Mokrousov I. et al. SITVITWEB-a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – № 12(4). – P. 755-766.
143. Demissie M., Lemma E., Gebeyehu M., Lindtjorn B. Sensitivity to antituberculosis drugs in HIV-positive and negative patients in Addis Ababa // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2001. – №.33. – P. 914-919.
144. Dheda K., Gumbo T., Gandhi N.R., Murray M., Theron G., Udwadia Z. et al. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis // *Lancet Respir. Med.* – 2014. – № 2(4). – P. 321-338.
145. Drobniowski F, Nikolayevskyy V, Maxeiner H, Balabanova Y, Casali N, Kontsevaya I. et al. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation // *BMC Med.* – 2013. – 11:190.

146. Drobniowski F., Balabanova Y., Nikolayevsky V., Ruddy M., Kuznetsov S., Zakharova S. et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia // *JAMA*. –2005. – №. 293(22). – P. 2726-2731.
147. Dubiley S., Ignatova A., Mukhina T., Nizova A., Blagodatskikh S., Stepanshina V. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Tula area, central Russia, before Directly Observed Therapy Strategy // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2010. – Vol. 16, № 9. – P. 1421–1426.
148. Dymova M.A., Kinsht V.N., Cherednichenko A.G., Khrapov E.A., Svistelnik AV, Filipenko M.L. Highest prevalence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype isolates in patients newly diagnosed with tuberculosis in the Novosibirsk oblast, Russian Federation // *J. Med. Microbiol.* – 2011. – № 60(Pt 7). – P. 1003-1009.
149. Ebrahimi-Rad M., Bifani P., Martin C., Kremer K., Samper S., Rauzier J., et al. Mutations in putative mutator genes of Mycobacterium tuberculosis strains of the W-Beijing family // *Emerg. Infect. Dis.* – 2003. –№ 9. P. 838–845.
150. Eker B., Ortmann J., Migliori G.B., Sotgiu G., Muetterlein R., Centis R., et al. Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis, Germany. // *Emerg. Infect. Dis.* 2008. – Vol. 14, № 11. – P. 1700-1706.
151. Eldholm V., Rieux A., Monteserin J., Lopez J.M., Palmero D., Lopez B. et al. Impact of HIV co-infection on the evolution and transmission of multidrug-resistant tuberculosis // *Elife*. – 2016. – № 9. – pii: e16644.
152. Eldholm V. Balloux F. Antimicrobial Resistance in Mycobacterium tuberculosis: The Odd One Out. // *Trends Microbiol.* 2016. – №24(8). – P. 637-648.
153. Eldholm V., Monteserin J, Rieux A., Lopez B. Sobkowiak B.,RitaccoV. et al. Four decades of transmission of a multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis outbreak strain // *Nat/ Commun.* – 2015. № 11. – 6:7119.
154. Espinal M.A., Laserson K., Camacho M., Fusheng Z., Kim S.J., Tlali R.E. et al. Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries.// *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2001. – №.5. – P.887–893.

155. Fallow A., Domenech P., Reed M.B. Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of *Mycobacterium tuberculosis* are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants // *J. Bacteriol.* – 2010. – №192(8). – P. 2228-2238.
156. Fanosie A., Gelaw B., Tessema B., Tesfay W., Admasu A., Yitayew G. *Mycobacterium tuberculosis* Complex and HIV Co-Infection among Extrapulmonary Tuberculosis Suspected Cases at the University of Gondar Hospital, Northwestern Ethiopia // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 7, № 11(3). – e0150646.
157. Fenner L., Egger M., Bodmer T., Furrer H., Ballif M., Battegay M., et al. HIV infection disrupts the sympatric host-pathogen relationship in human tuberculosis // *PLoS Genet.* – 2013. – Vol. 9, №3. – e1003318.
158. Fenner L., Gagneux S., Helbling P., Battegay M., Rieder H.L., Pfyffer G.E., et al. *Mycobacterium tuberculosis* transmission in a country with low tuberculosis incidence: role of immigration and HIV infection // *J. Clin. Microbiol.* – 2012. – № 50(2). – P. 388-395.
159. Fenner L., Malla B., Ninet B., Dubuis O., Stucki D., Borrell S., et al. “Pseudo-Beijing”: evidence for convergent evolution in the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS One.* – 2011. № 6. – e24737.
160. Feuerriegel S., Schleusener V., Beckert P., Kohl T.A., Miotto P., Cirillo D.M., et al. PhyResSE: web tool delineating *Mycobacterium tuberculosis* antibiotic resistance and lineage from whole-genome sequencing data // *Journal of clinical microbiology.* – 2015. – Vol. 53, №. 6. – P.1908-1914.
161. Ford C.B., Lin P.L., Chase M.R., Shah R.R., Iartchouk O., Galagan J. et al. Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection // *Nat. Genet.* – 2011. – № 43(5). – P. 482-486.
162. Ford C.B., Shah R.R., Maeda M.K., Gagneux S., Murray M.B., Cohen T. et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis // *Nat/ Genet.* – 2013. – № 45(7). – P. 784-790.

163. Gagneux S., Burgos M.V., DeRiemer K., Encisco A., Munoz S., Hopewell P. et al. Impact of bacterial genetics on the transmission of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS Pathog.* – 2006. – № 2. – e61.
164. Gagneux S., DeRiemer K., Van T., Kato-Maeda M., de Jong B.C., Narayanan S et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Nat. lAcad. Sci. U S A.* – 2006. – Vol. 21, № 103(8). – P. 2869-2873.
165. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development // *Lancet Infect. Dis.* – 2007. – №7(5). – P. 328-337.
166. Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis // *Philos Trans. R. Soc.Lond. B. Biol. Sci.* – 2012. – № 367(1590). – P 850–859.
167. Gandhi N.R., Nunn P., Dheda K., Schaaf H.S., Zignol M., van Soolingen D., et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis // *Lancet.* – 2010. – Vol. 22, № 375(9728). – P. 1830-1843.
168. Gardy J.L., Johnston J.C., Ho Sui S.J., Cook V.J., Shah L., Brodtkin E. et al. Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 24, № 364(8). – P. 730-739.
169. Gauthier M., Bidault F., Mosnier A., Bablshvili N., Tukvadze N., Somphavong S. et al. High-throughput mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium tuberculosis* epidemiological studies. *J Clin Microbiol.* – 2015. № 53(2). – P. 498-503.
170. Gey van Pittius N.C., McEvoy C., Victor T.C., Van Helden P.D., Warren R.M. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success // *Tuberculosis (Edinb).* – 2011. – № 91(6). – P. 510–523.
171. Girardi E., Sabin C.A., d'Arminio Monforte A., Hogg B., Phillips A.N., Gill M.J. et al. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration Incidence of tuberculosis among HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy in Europe and North America // *Clinical Infectious Diseases.* –2005. – № 41. P. 1772–1782.

172. Glynn J.R., Whiteley J., Bifani P.J., Kremer K., van Soolingen D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review // *Emerg. Infect. Dis.* –2002. –№8(8). – P. 843–849.
173. Gopal R., Monin L., Slight S., Uche U., Blanchard E., Fallert Junecko B.A. et al. Unexpected role for IL-17 in protective immunity against hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* HN878 infection // *PLoS Pathog.* – 2014. –Vol. 15, № 10(5). – e1004099.
174. Groenheit R., Ghebremichael S., Pennhag A., Jonsson J., Hoffner S., Couvin D. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Strains Potentially Involved in the TB Epidemic in Sweden a Century Ago // *PLoS One.* –2012. –№.7(10). – e46848.
175. Groll A-V., Martin A., Stehr M., Singh M., Portaels F., da Silva P.E. et al. Fitness of *Mycobacterium tuberculosis* Strains of the W-Beijing and Non-W-Beijing genotype // *PLoSOne.* – 2010. –№ 5(4). – e10191.
176. Guerra-Assunção J.A., Crampin A.C., Houben RMGJ, Mzembe T., Mallard K., Coll F. et al. Glynn Large-scale whole genome sequencing of *M. tuberculosis* provides insights into transmission in a high prevalence area // *eLife.* – 2015. № 4. – e05166.
177. Guerra-Assunção J.A., Houben R.M., Crampin A.C., Mzembe T., Mallard K., Coll F., Khan P. et al. Recurrence due to relapse or reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*: a whole-genome sequencing approach in a large, population-based cohort with a high HIV infection prevalence and active follow-up // *J. Infect. Dis.* –2015. – № 211(7). – P. 1154-1163.
178. Gupta R.K., Rice B., Brown A.E., Thomas H.L., Zenner D., Anderson L., Pedrazzoli D., Pozniak A., Abubakar I., Delpech V., Lipman M. Does antiretroviral therapy reduce HIV-associated tuberculosis incidence to background rates? A national observational cohort study from England, Wales, and Northern Ireland // *The Lancet HIV.* – 2015. №2. –e243–e251.
179. Gurjav U., Burneebaatar B., Narmandakh E., Tumenbayar O., Ochirbat B., Hill-Cawthorne G.A. et al. Spatiotemporal evidence for cross-border spread of MDR-TB along the Trans-Siberian Railway line // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2015. – № 19(11). –P. 1376-1382.

180. Hanekom M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C., Victor T.C., Van Helden P.D., Warren R.M. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype: a template for success // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2011. – №91(6). – P. 510-523.
181. Hanekom M., Spuy van der G-D., Streicher E., Ndabambi S-L., McEvoy C-R-E. et al. A recently evolved sublineage of the Mycobacterium tuberculosis Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease.// *J Clin Microbiol*. – 2007. – № 45. – P. 2263–2266.
182. Hanekom M., Streicher E.M, Van de Berg D. Population structure of mixed Mycobacterium tuberculosis infection is strain genotype and culture medium dependent // *PLoS One*. –2013. –Vol. 30, № 8(7). – e70178.
183. Hang N.T., Maeda S., Keicho N., Thuong P.H., Endo H. Sublineages of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains and unfavorable outcomes of anti-tuberculosis treatment // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2015. – № 95(3). – P. 336-342.
184. Hershberg R., Lipatov M., Small P.M., Sheffer H., Niemann S., Homolka S., et al. High functional diversity in Mycobacterium tuberculosis driven by genetic drift and human demography. // *PLoS Biol*. – 2008. – Vol. 16, №6(12). – e311.
185. Hickson R.I., Mercer G.N., Lokuge K.M. (2012) A Metapopulation Model of Tuberculosis Transmission with a Case Study from High to Low Burden Areas // *PLoS ONE*. – 2012. – № 7(4). – e34411.
186. Hirsh A.E., Tsolaki A.G., DeRiemer K., Feldman M.W., Small P.M. Stable association between strains of Mycobacterium tuberculosis and their human host populations // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2004. –№ 101(14). –P. 4871–4876.
187. Ignatyeva O., Balabanova Y., Nikolayevskyy V., Koshkarova E., Radiulyte B., Davidaviciene E. et al. Resistance profile and risk factors of drug resistant tuberculosis in the Baltic countries // *Tuberculosis (Edinb)*. –2015. – № 95(5). –581-588.
188. Iseman M.D. Tuberculosis therapy: past, present and future // *Eur. Respir. J. Suppl*. 2002. – № 36. – P. 87-94.
189. Jiao W.W., Liu Z.G., Han R., Zhao X.Q., Dong F., Dong H.Y., et al. Prevalence of drug resistant Mycobacterium tuberculosis among children in China // *Tuberculosis (Edinb)*. –2015. – № 95(3). – P. 315-320.

190. Kato-Maeda M., Shanley C.A., Ackart D., Jarlsberg L.G., Shang S., Obregon-Henao A. et al. Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig // *Clin/ Vaccine Immunol.* – 2012. – № 19(8). – P. 1227-1237.
191. Kendall E.A., Fofana M.O., Dowdy D.W. Burden of transmitted multidrug resistance in epidemics of tuberculosis: a transmission modelling analysis // *Lancet Respir. Med.* – 2015. – № 3(12). – P. 963-972.
192. Kinander W., Bruvik T., Dahle U.R. Dominant *Mycobacterium tuberculosis* lineages in elderly patients born in Norway // *PLoS One.* – 2009. – №.4(12). – e8373.
193. Kohl T.A, Diel R., Harmsen D., Rothganger J., Walter K.M., Merker M., et al. Whole-genome-based *Mycobacterium tuberculosis* surveillance: a standardized, portable, and expandable approach // *Journal of clinical microbiology.* – 2014. № 52(7). – P. 2479–2486.
194. Köser C.U., Bryant J.M., Becq J., Torok M.E., Ellington M.J., Marti-Renom M.A. et al. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis* // *N. Engl. J. Med.* – 2013. № 369. – P. 290–292.
195. Kovalev S.Y., Kamaev E.Y., Kravchenko M.A., Kurepina N.E., Skorniakov S.N. Genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2005. – Vol. 9 (7). – P. 746-752.
196. Kremer K., van-der-Werf M.J., Au B.K., Anh D.D., Kam K.M., van-Doorn H.R. et al. Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. –№15(2). – P. 335–339.
197. Krishnan N., Malaga W., Constant P., Caws M., Tran T.H., Salmons J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* lineage influences innate immune response and virulence and is associated with distinct cell envelope lipid profiles // *PLoS One.* – 2011. –№ 6(9). – e23870.
198. Lahiri N., Shah R.R., Layre E., Young D., Ford C., Murray M.B. et al. Rifampin Resistance Mutations Are Associated with Broad Chemical Remodeling of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Biol. Chem.* – 2016. – Vol.1, № 291(27). – P. 14248-14256.

199. Lasunskaja E., Ribeiro S.C., Manicheva O., Gomes L.L., Suffys P.N., Mokrousov I. et al. Emerging multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence // *Microbes Infect.* – 2010. – №12(6). – P. 467-475.
200. Leeds I.L., Magee M.J., Kurbatova E.V., del Rio C., Blumberg H.M., Leonard M.K., et al. Site of extrapulmonary tuberculosis is associated with HIV infection // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* – 2012. – № 55(1). – P. 75–81.
201. Leimane V., Reikstina V., Holtz T., Zarovska E., Skripconoka V., Thorpe L.E. et al. Clinical outcome of individualized treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia: a retrospective cohort study // *Lancet* 2005. – №. 365. – P. 318–326.
202. Li D., Dong C.B., Cui J.Y., Nakajima C., Zhang C.L., Pan X.L. et al. Dominant modern sublineages and a new modern sublineage of Mycobacterium tuberculosis Beijing family clinical isolates in Heilongjiang Province, China // *Infect. Genet. Evol.* – 2014. – № 27. – P. 294-299.
203. Li Q.J., Jiao W.W., Yin Q.Q., Li Y.J., Li J.Q., Xu F. et al. Positive epistasis of major low-cost drug resistance mutations rpoB531-TTG and katG315-ACC depends on the phylogenetic background of Mycobacterium tuberculosis strains // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2017. – №49(6). – P. 757-762.
204. Lin H.H., Wang L., Zhang H., Ruan Y., Chin D.P., Dye C. Tuberculosis control in China: use of modelling to develop targets and policies // *Bull. World Health Organ.* – 2015. – Vol. 1, № 93(11). – P. 790-798.
205. Liu C.H., Li H.M., Lu N., Wang Q., Hu Y.L., Yang X. et al. Genomic sequence based scanning for drug resistance-associated mutations and evolutionary analysis of multidrug-resistant and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis // *J. Infect.* – 2012. – №65(5). – P. 412-422.
206. Lopez B., Aguilar D., Orozco H., Burger M., Espitia C., Ritacco V. et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes // *Clin. Exp. Immunol.* – 2003. – № 133. – P. 30-37.

207. Luo T., Comas I., Luo D., Lu B., Wu J., Wei L. et al. Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2015. – Vol. 30, №112(26). – P. 8136-8141.
208. Luo T., Yang C., Peng Y., Lu L., Sun G., Wu J. et al. Whole-genome sequencing to detect recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in settings with a high burden of tuberculosis // *Tuberculosis (Edinb).* – 2014. – № 94(4). – P. 434-440.
209. Mac-Arthur A., Gloyd S., Perdigao P., Noya A., Sacarlal J., Kreiss J. Characteristics of drug resistance and HIV among tuberculosis patients in Mozambique // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2001. – №5. – P.894–902.
210. Mannheimer S.B., Sepkowitz K.A., Stoeckle M., Friedman C.R., Hofner A., Riley L.W. Risk factors and outcome of human immunodeficiency virus-infected patients with sporadic MDR TB in New York City // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* –1997. – №.1. – P.319–325.
211. Martin A., Herranz M., Ruiz Serrano M.J., Bouza E., Garcia de Viedma D.. The clonal composition of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens could be modified by culture // *Tuberculosis.* – 2010. – № 90(3). – P. 201–207.
212. Matsuoka S., Uchiyama K., Shima H., Suzuki K., Shimura A., Sasaki Y. et al. Relationship between CT findings of pulmonary tuberculosis and the number of acid-fast bacilli on sputum smears // *Clin. Imaging.* – 2004. – №.28. – P. 119–123.
213. McGrath M., Gey van Pittius N.C., van Helden P.D., Warren R.M., Warner D.F. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* – 2014. – № 69(2). – P. 292-302.
214. Mears J., Abubakar I., Cohen T., McHugh T.D., Sonnenberg P. Effect of study design and setting on tuberculosis clustering estimates using *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR)*: a systematic review // *BMJ Open.* – 2015. – Vol. 21, № 5(1). – e005636.
215. Merker M., Blin C., Mona S., Duforet-Freboung N., Lecher S., Willery E. et al. Evolutionary history and global spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing lineage // *Nat. Genet.* – 2015. – Vol.47, № 3. – P. 242-249.

216. Mestre O., Luo T., Dos Vultos T., Kremer K., Murray A., Namouchi A., et al. Phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains constructed from polymorphisms in genes involved in DNA replication, recombination and repair // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 20, № 6(1). – e16020.
217. Middelkoop K., Bekker L.G., Mathema B., Myer L., Shashkina E., Whitelaw A., et al. Factors affecting tuberculosis strain success over 10 years in a high TB- and HIV-burdened community // *Int. J. Epidemiol.* – 2014. – №43(4). – P. 1114-1122.
218. Mokrousov I. Genetic geography of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multifacet mirror of human history? // *Infect. Genet. Evol.* – 2008. – № 8. – P. 777–785.
219. Mokrousov I., Jiao W.W., Sun G.Z., Liu J.W., Valcheva V., Li M. et al. Evolution of drug resistance in different sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – № 50(8). – P. 2820-3.
220. Mokrousov I., Vyazovaya A., Narvskaya O. *Mycobacterium tuberculosis* Latin American-Mediterranean family and its sublineages in the light of robust evolutionary markers // *J. Bacteriol.* – 2014. – №.196(10). – P.1833-1841.
221. Mokrousov I., Vyazovaya A., Otten T., Zhuravlev V., Pavlova E., Tarashkevich L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region // *PLoS One*. – 2012. – № 7(7). – e41318.
222. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L. et al. Russian "successful" clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol.50, №11. – P. 3757-3759.
223. Mokrousov I., Vyazovaya A., Otten T., Zhuravlev V., Pavlova E., Tarashkevich L., et al. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU/Latvian border region // *PLoS One*. – 2012. №7. – e41318.
224. Mokrousov I. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2013. – № 26. – P. 342-360.

225. Mokrousov I. Mycobacterium tuberculosis phylogeography in the context of human migration and pathogen's pathobiology: Insights from Beijing and Ural families // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2015. – № 95, Suppl 1:S167-176.
226. Mokrousov I., Valcheva V., Sovhozova N., Aldashev A., Rastogi N., et al. Penitentiary population of Mycobacterium tuberculosis in Kyrgyzstan: Exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype // *Infect. Genet. Evol.* – 2009. – № 9(6). – P. 1400-1405.
227. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype in Russia: in Search of Informative Variable-Number Tandem-Repeat Loci // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – № 46(11). – P. 3576–3584.
228. Morariu V.I., Srinivasan B.V., Raykar V.C., Duraiswami R., Davis L. Efficient kriging for real-time spatio-temporal interpolation // *Advances in Neural Information Processing Systems*. – 2008. – № 21. – P.1113-1120.
229. Morehead R.S. Delayed death from pulmonary tuberculosis: unsuspected subtherapeutic drug levels // *South. Med. J.* – 2000. – №. 93. – P.507–510
230. Mustafa S., Javed H., Hashmi J., Jamil N., Tahir Z., Akhtar A.M. Emergence of mixed infection of Beijing/Non-Beijing strains among multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis in Pakistan // *Biotech*. – 2016. –№ 6(1):108.
231. Nicol M.P., Wilkinson R.J. The clinical consequences of strain diversity in Mycobacterium tuberculosis // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 2008. – №102. – P.955-965.
232. Niemann S., Koser C.U., Gagneux S., Plinke C., Homolka S., Bignell H. et al. Genomic diversity among drug sensitive and multidrug resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis with identical DNA fingerprints // *PloS One*. – 2009. – № 4(10). – e7407.
233. Normark B-H, Normark S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Internal. Med.* – 2002. – № 252. – P. 91–106.
234. Nunes E.A., De Capitani E.M., Coelho E., Joaquim O.A., Figueiredo I.R., Cossa A.M. et al. Patterns of anti-tuberculosis drug resistance among HIV-infected

patients in Maputo, Mozambique, 2002–2003 // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2005. – №. 9. – P.494–500.

235. Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Sapozhnikova N., Graschenkova O., Steklova L. et al. Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis Caused by a Strain of Mycobacterium Tuberculosis W-Beijing Family in St. Petersburg, Russia // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2002. – № 21 (8). – P. 596-602.

236. Ordway D., Henao-Tamayo M., Harton M., Palanisamy G., Troudt J., Shanley C. et al. The hypervirulent Mycobacterium tuberculosis strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 1, № 179(1). – P. 522-531.

237. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* – 2012. – № 28. P. 1166-1167.

238. Park M.M., Davis A.L., Schluger N.W., Cohen H., Rom W.N. Outcome of MDR-TB patients, 1983–1993: prolonged survival with appropriate therapy // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* – 1996. – №153. – P.317–324.

239. Parwati I., van Crevel R., van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains // *Lancet Infect. Dis.* – 2010. – № 10(2). – P.103-111.

240. Pasipanodya J.G., Moonan P.K., Vecino E., Miller T.L., Fernandez M. et al. Allopatric tuberculosis host-pathogen relationships are associated with greater pulmonary impairment // *Infect. Genet. Evol.* – 2013. – № 16. – P. 433-40.

241. Peloquin C.A., Nitta A.T., Burman W.J., Brudney K.F., Miranda-Massari J.R., McGuinness M.E. et al. Low antituberculosis drug concentrations in patients with AIDS // *Ann. Pharmacother.* – 1996. – № 30. – P. 919–925.

242. Pereira M., Tripathy S., Inamdar V., Ramesh K., Bhavsar M., Date A. et al. Drug resistance pattern of Mycobacterium tuberculosis in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India // *Indian J. Med. Res.* – 2005. – № 21. – P.235–239.

243. Podlekareva D., Mocroft A., Dragsted U.B. For the EuroSIDA Study Group. Factors associated with the development of opportunistic infections in HIV-1–infected

adults with high CD4+ cell counts: a EuroSIDA study // *J. Infect. Dis.* – 2006. – № 194. – P.633–641.

244. Porco T.C., Oh P., Flood J.M. Antituberculosis drug resistance acquired during treatment: an analysis of cases reported in California, 1994-2006 // *Clin. Infect Dis.* – 2013. – № 56(6). – P. 761-769.

245. Reed M.B., Domenech P., Manca C., Su H., Barczak A.K., Kreiswirth B.N. et al. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response // *Nature.* – 2004. – Vol. 2, № 431(7004). – P. 84-87.

246. Reed M.B., Pichler V.K., McIntosh F., Mattia A., Fallow A., Masala S. et al. Major *Mycobacterium tuberculosis* lineages associate with patient country of origin // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – № 47(4). – P. 1119-1128.

247. Reid A., Scano F., Getahun H., Williams B., Dye C., Nunn P. et al. Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of TB/HIV collaboration // *Lancet Infect. Dis.* – 2006. – № 6. – P.483–495.

248. Ritacco V., Di Lonardo M., Reniero A., Ambroggi M., Barrera L., Dambrosi A., et al. Nosocomial spread of human immunodeficiency virus-related multidrug-resistant tuberculosis in Buenos Aires // *J. Infect. Dis.* – 1997. – №176. – P. 637–642.

249. Roetzer A., Diel R., Kohl T.A., Ruckert C., Nubel U., Blom J. et al. Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a *Mycobacterium tuberculosis* outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study // *PLoS Med.* – 2013. – №10. – e1001387.

250. Sandgren A., Strong M., Muthukrishnan P., Weiner B.K., Church G.M., Murray M.B. Tuberculosis drug resistance mutation database // *PLoS Med.* – 2009. – № 6. – e1000002.

251. Schiroli C., Carugati M., Zanini F., Bandera A., Di Nardo Stuppino S. et al. Exogenous reinfection of tuberculosis in a low-burden area. // *Infection.* – 2015. – № 43(6). – P. 647-53.

252. Schurch A.C., van Soolingen D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – № 12. – P. 602–609.

253. Sekizuka T., Yamashita A., Murase Y., Iwamoto T., Mitarai S., Kato S. et al.. TGS-TB: Total Genotyping Solution for Mycobacterium tuberculosis Using Short-Read Whole-Genome Sequencing // PLoS One. – 2015. – Vol. 13, № 10 (11). – e0142951.
254. Sergeev R., Colijin C., Cohen T. Models to understand the population-level impact of mixed strain M. tuberculosis infections // J. theoretical Biology. 2011. – № 280. – P. 88-100.
255. Shemyakin I.G., Stepanshina V.N., Ivanov I.Y., Lipin M.Y., Anisimova V.A., Onasenko A.G., O. et al. Characterization of drug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis derived from Russian inmates // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2004. – № 8. – P. 1194–1203.
256. Shi C., Wang X., Zhang H., Xu Z., Li Y., Yuan L. Immune responses and protective efficacy induced by 85B antigen and early secreted antigenic target-6 kDa antigen fusion protein secreted by recombinant bacille Calmette-Guérin // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). – 2007. – №39(4). – P. 290–296.
257. Shin S.S., Modongo C., Ncube R., Sepako E., Klausner J.D., Zetola N.M. Advanced Immune Suppression is Associated With Increased Prevalence of Mixed-Strain Mycobacterium tuberculosis Infections Among Persons at High Risk for Drug-Resistant Tuberculosis in Botswana // The Journal of infectious diseases. – 2014. – Vol. 211, № 3, – P. 347–351.
258. Shitikov E., Kolchenko S., Mokrousov I., Bespyatykh J., Ischenko D., Ilina E. et al. Evolutionary pathway analysis and unified classification of East Asian lineage of Mycobacterium tuberculosis // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 23, № 7(1):9227.
259. Skiba Y., Mokrousov I., Ismagulova G., Maltseva E., Yurkevich N., Aitkhozhina N. et al. Molecular snapshot of mycobacterium tuberculosis population in Kazakhstan: a country-wide study // Tuberculosis. – 2015. – Vol. 95, № 5. – P. 538-546.
260. Sola C., Ferdinand S., Mammina C., Nastasi A., Rastogi N. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis // J. Clin. Microbiol. – 2001. № 39(4). – P. 1559-65.

261. Stavrum R., Mphahlele M., Ovreas K., Muthivhi T., Fourie P.B., Weyer K. et al. High diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in South Africa and preponderance of mixed infections among ST53 isolates // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. – № 47. – P. 1848–1856.
262. Steiner A., Stucki D., Coscolla M., Borrell S., Gagneux S. KvarQ: targeted and direct variant calling from fastq reads of bacterial genomes // *BMC genomics.* – 2014. – № 15:881.
263. Stucki D., Ballif M., Bodmer T., Coscolla M., Maurer A.M., Droz S. et al. Tracking a tuberculosis outbreak over 21 years: strain-specific single-nucleotide polymorphism typing combined with targeted whole-genome sequencing // *J. Infect. Dis.* 2015. – Vol. 15, № 211(8). – P. 1306-1316.
264. Suchindran S., Brouwer E.S., Van Rie A. Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? A systematic review // *PLoS One.* – 2009. – № 4(5). – e5561.
265. Sun G., Luo T., Yang C., Dong X., Li J., Zhu Y. et al. Dynamic population changes in *Mycobacterium tuberculosis* during acquisition and fixation of drug resistance in patients // *J. Infect. Dis.* – 2012. – № 206. – P. 1724-33.
266. Supply P., Warren R.M., Banuls A.L., Lesjean S., Van Der Spuy G.D. Lewis L.A. et al. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area // *Mol. Microbiol.*-2003. – № 47. – P.529–538.
267. Supply P., Allix C., Lesjean S., Cardoso-Oelemann M., Rüsç-Gerdes S., Willery E. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. ClinMicrobiol.* – 2006. – №.44. –P. 4498–4510.
268. Tamhane A., Chheng P., Dobbs T., Mak S., Sar B. et al. Predictors of smear-negative pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients, Battambang, Cambodia // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* – 2009. – №.13. – P. 347–354.

269. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – № 30(12). –P. 2725-2729.
270. Tappero J.W., Bradford W.Z., Agerton T.B., Hopewell P., Reingold A.L., Lockman S. et al. Serum concentrations of antimycobacterial drugs in patients with pulmonary tuberculosis in Botswana // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – №.41. – P.461–469.
271. Thuong N.T., Hawn T.R., Thwaites G.E., Chau T.T., Lan N.T., Quy H.T. et al. A polymorphism in human TLR2 is associated with increased susceptibility to tuberculous meningitis // *Genes. Immun.* – 2007. – Vol.8, № 422. – e8.
272. Thwaites G., Caws M., Chau T.T., D'Sa A., Lan N.T., Huyen M.N. et al. Relationship between *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the clinical phenotype of pulmonary and meningeal tuberculosis // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – № 46. – P. 1363-1368.
273. Tounghousova O.S., Bjune G., Caugant D.A. Epidemic of tuberculosis in the former Soviet Union: social and biological reasons // *Tuberculosis (Edinb).* –2006. – № 86(1). – P. 1-10.
274. Tounghousova O.S., Mariandyshv A., Bjune G., Sandven P., Caugant D.A. *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family // *Clin. Infect. Dis.* – 2003. –Vol. 1, № 37(5). – P. 65-72.
275. Trinh Q.M., Nguyen H.L., Do T.N., Nguyen V.N., Nguyen B.H., Nguyen T.V. et al. Tuberculosis and HIV co-infection in Vietnam // *Int. J. Infect. Dis.* – 2016. № 46. – P. 56-60.
276. Uchiya K., Takahashi H., Yagi T., Moriyama M., Inagaki T., Ichikawa K. et al. Comparative genome analysis of *Mycobacterium avium* revealed genetic diversity in strains that cause pulmonary and disseminated disease // *PloS one.* – 2013. – № 8(8). - e71831
277. Udhwadia ZF. MDR, XDR, TDR tuberculosis: ominous progression // *Thorax.* 2012. –№ 67. – P. 286–288.

278. van Crevel R., Nelwan R.H., de Lenne W., Veeraragu Y., van der Zanden AG, Amin Z. et al. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment // *Emerg. Infect. Dis.* – 2001. – №7(5). – P. 880–883.

279. van Crevel R., Parwati I, Sahiratmadja E, Marzuki S, Ottenhoff TH, Netea MG, van der Ven A Infection with Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis // *J. Infect. Dis.* –2009. – Vol. 1, № 200(11). – P. 1671-1674.

280. van Rie A., Victor T.C., Richardson M., Johnson R., van der Spuy G.D., Murray E.J., et al. Reinfection and mixed infection cause changing Mycobacterium tuberculosis drug-resistance patterns // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005. – № 172. – P. 636–642.

281. van Soolingen D., Qian L., de Haas P.E., Douglas J., Traore H., Portaels F., Qing H.Z et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – № 33(12). – P. 3234–3238.

282. Velayati A.A., Masjedi M.R., Farnia P., Tabarsi P., Ghanavi J., Ziazarifi A.H. et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran // *Chest.* – 2009. – № 136(2). – P. 420-425.

283. Viana-Niero C., de Haas P.E., van Soolingen D., Leão S.C. Analysis of genetic polymorphisms affecting the four phospholipase C (plc) genes in Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates // *Microbiology.* –2004. –№ 150 (Pt 4). – P. 967-978.

284. von Reyn C.F., Kimambo S., Mtei L., Arbeit R.D., Maro I., Bakari M., et al. Disseminated tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: ineffective immunity, polyclonal disease and high mortality // *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease.* – 2011. – № 15(8). – P. 1087–1092.

285. Wada T., Iwamoto T., Maeda S.. Genetic diversity of the Mycobacterium tuberculosis Beijing family in East Asia revealed through refined population structure analysis // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – № 291(1). – P. 35-43.

286. Walker T.M., Lalor M.K., Broda A., Saldana Ortega L., Morgan M., Parker L. et al. Assessment of Mycobacterium tuberculosis transmission in Oxford shire, UK, 2007-12, with whole pathogen genome sequences: an observational study // *The Lancet Respiratory Medicine*. – 2014. – №2. – P. 285–292.
287. Wan K., Liu J., Hauck Y., Zhang Y., Liu J., Zhao X., et al. Investigation on Mycobacterium tuberculosis diversity in China and the origin of the Beijing clade // *PLoS One* 2011.№ 6. – e29190.
288. Wang C., Peyron P., Mestre O., Kaplan G., van Soolingen D., Gao Q., et al. Innate immune response to Mycobacterium tuberculosis Beijing and other genotypes // *PLoS One*. – 2010. – № 5. –e13594.
289. Warren R.M., Victor T.C., Streicher E.M., Richardson M., Beyers N., Gey van Pittius N.C. et al. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2004. –№ 169. – P. 610–614.
290. Weniger T., Krawczyk J., Supply P., Niemann S., Harmsen D.. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria // *Nucleic acids research*. – 2010. –№ 38(WebServer issue):W326–31.
291. Werngren J., Hoffner S.E. Drug-susceptible Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. // *J. Clin. Microbiol*. –2003. –№ 41(4). – P.1520-1524.
292. Weyer K., Mirzayev F., Migliori G.B., Van Gemert W., D'Ambrosio L., Zignol M. et al. Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF // *Eur. Respir. J*. – 2013. – № 42. – P. 252–271.
293. Weyer K., van der Walt M., Brand J., Lancaster J., Levin J. Survey of tuberculosis drug resistance in South Africa: final report. [Электронный ресурс] Pretoria: Medical Research Council, 2003. – Режим доступа: <http://www.mrc.ac.za/operationaltb/reports.htm> (дата обращения 15.06.2017).
294. WHO. Global tuberculosis report 2015. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http:// www.who.int/tb/publications/global_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) (дата обращения 15.06.2017).

295. Wirth T., Hildebrand F., Allix-Béguec C., Wölbeling F., Kubica T., Kremer K. et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *PloS Pathog.* – 2008. – № 4(9):e1000160.
296. Wlodarska M., Johnston J.C., Gardy J.L., Tang P. A microbiological revolution meets an ancient disease: improving the management of tuberculosis with genomics // *Clin. Microbiol. Rev.* –2015. –№ 28(2). –P. 523-539.
297. Yin Qing-qin., Liu Hai-can., Jiao Wei-wei., Li Qin-jing., Han Rui., Tian Jian-ling et al. Evolutionary History and Ongoing Transmission of Phylogenetic Sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype in China // *Sci. Rep.* – 2016. № 6: 34353.
298. Yuan X., Zhang T., Kawakami K., Zhu J., Zheng W., Li H. et al. Genotyping and clinical characteristics of multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in a tertiary care tuberculosis hospital in China // *BMC Infect. Dis.* – 2013. –Vol.12, № 13:315.
299. Zetola N.M., Modongo C., Moonan P.K. Ncube R. Clinical outcomes among persons with pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* isolates with phenotypic heterogeneity in results of drug-susceptibility tests // *The Journal of infectious diseases.* – 2014. – № 209(11). – P.1754-1763.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

Генотипы МБТ, выделенных от больных ТБ легких на изучаемых территориях
Северной Азии (абс.)

Генотип/ Регион изучения	Саха (Якутия)	Иркутская область	Республика Бурятия	Забайкальский край	Всего
Beijing	162	509	216	18	905
H	5	10	6	0	21
LAM	33	81	57	1	172
T	50	34	13	7	104
S	51	5	4	1	61
Haarlem	27	4	5	0	36
X	6	8	2	0	16
Ural	26	26	25	0	77
Uganda	9	3	1	0	13
orphan	7	14	2	2	25
mix	1	25	7	0	33
Всего	377	719	338	29	1463

Таблица 2

Субтипы Beijing на изучаемых территориях Северной Азии (абс.)

Генотип/ Регион изучения	Саха (Якутия)	Иркутская область	Республика Бурятия	Забайкальский край	Всего
Beijing 16	74	208	53	0	335
Beijing 17	47	153	53	0	253
Beijing 82	0	0	2	0	2
Beijing 83	0	21	1	0	22
Beijing84	6	5	0	0	11
Beijing 85	1	0	0	0	1
Beijing 86	0	2	2	4	8
Beijing 87	0	0	1	0	1
Beijing 91	0	1	0	0	1
Beijing 93	0	0	1	0	1
Beijing 94	0	8	0	0	8
Beijing 95	0	2	0	0	2
Beijing 97	0	1	1	0	2
Beijing 99	0	2	0	0	2
Beijing 101	1	0	0	0	1
Beijing 104	1	0	0	0	1
Beijing 105	1	0	0	0	1
Beijing 121	0	1	1	0	2
Beijing 123	0	3	1	0	4
Beijing 135	1	2	2	0	5
Beijing 136	0	1	0	0	1
Beijing 137	2	12	11	0	25
Beijing 138	0	12	0	0	12
Beijing 172	0	1	0	0	1
Beijing 196	0	3	0	0	3
Beijing203	2	8	1	0	11
Beijing 245	0	0	1	0	1
Beijing 364	0	3	0	0	3
Beijing 438	0	1	0	0	1
Beijing 465	0	1	1	0	2
Beijing 499	0	1	0	0	1
Beijing 571	1	3	5	0	9
Beijing 592	10	1	9	6	26
Beijing573	0	0	0	0	0
Beijing 642	0	8	52	5	65
Beijing 706	2	0	0	0	2
Beijing 707	0	1	1	0	2
Beijing 721	0	2	2	0	4
Beijing 1012	0	8	0	0	8
Beijing orphan	13	34	17	3	67

Распределение субтипов Beijing, выделенных от больных с разными формами течения ТБ на территориях Северной Азии (%)

Генотип/ Группы больных	Общая выборка	Впервые выявленные случаи	Хроническое течение	Рецидив
Beijing 16	22,9	23,9	20,4	26,5
Beijing 17	17,3	14,5	23,5	17,6
Beijing 82	0,1	0,2	0,0	0,0
Beijing 83	1,5	1,3	2,0	0,0
Beijing84	0,8	0,7	0,9	0,0
Beijing 85	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 86	0,5	0,3	1,1	0,0
Beijing 87	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 91	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 93	0,1	0,0	0,2	0,0
Beijing 94	0,5	0,5	0,7	0,0
Beijing 95	0,1	0,1	0,2	0,0
Beijing 97	0,1	0,1	0,0	2,9
Beijing 99	0,1	0,1	0,2	0,0
Beijing 101	0,1	0,0	0,2	0,0
Beijing 104	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 105	0,1	0,0	0,2	0,0
Beijing 121	0,1	0,1	0,2	0,0
Beijing 123	0,3	0,2	0,5	0,0
Beijing 135	0,3	0,3	0,5	0,0
Beijing 136	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 137	1,7	2,1	0,9	0,0
Beijing 138	0,8	1,0	0,5	0,0
Beijing 172	0,1	0,0	0,2	0,0
Beijing 196	0,2	0,1	0,5	0,0
Beijing203	0,8	0,8	0,7	0,0
Beijing 245	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 364	0,2	0,3	0,0	0,0
Beijing 438	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 465	0,1	0,1	0,2	0,0
Beijing 499	0,1	0,1	0,0	0,0
Beijing 571	0,6	0,5	0,9	0,0
Beijing 592	1,8	1,6	2,0	2,9
Beijing573	0,0	0,0	0,0	0,0
Beijing 642	4,4	3,4	7,0	0,0
Beijing 706	0,1	0,1	0,0	2,9
Beijing 707	0,1	0,1	0,2	0,0
Beijing 721	0,3	0,3	0,2	0,0
Beijing 1012	0,5	0,6	0,2	2,9
Beijing orphan	4,6	5,1	3,4	5,9

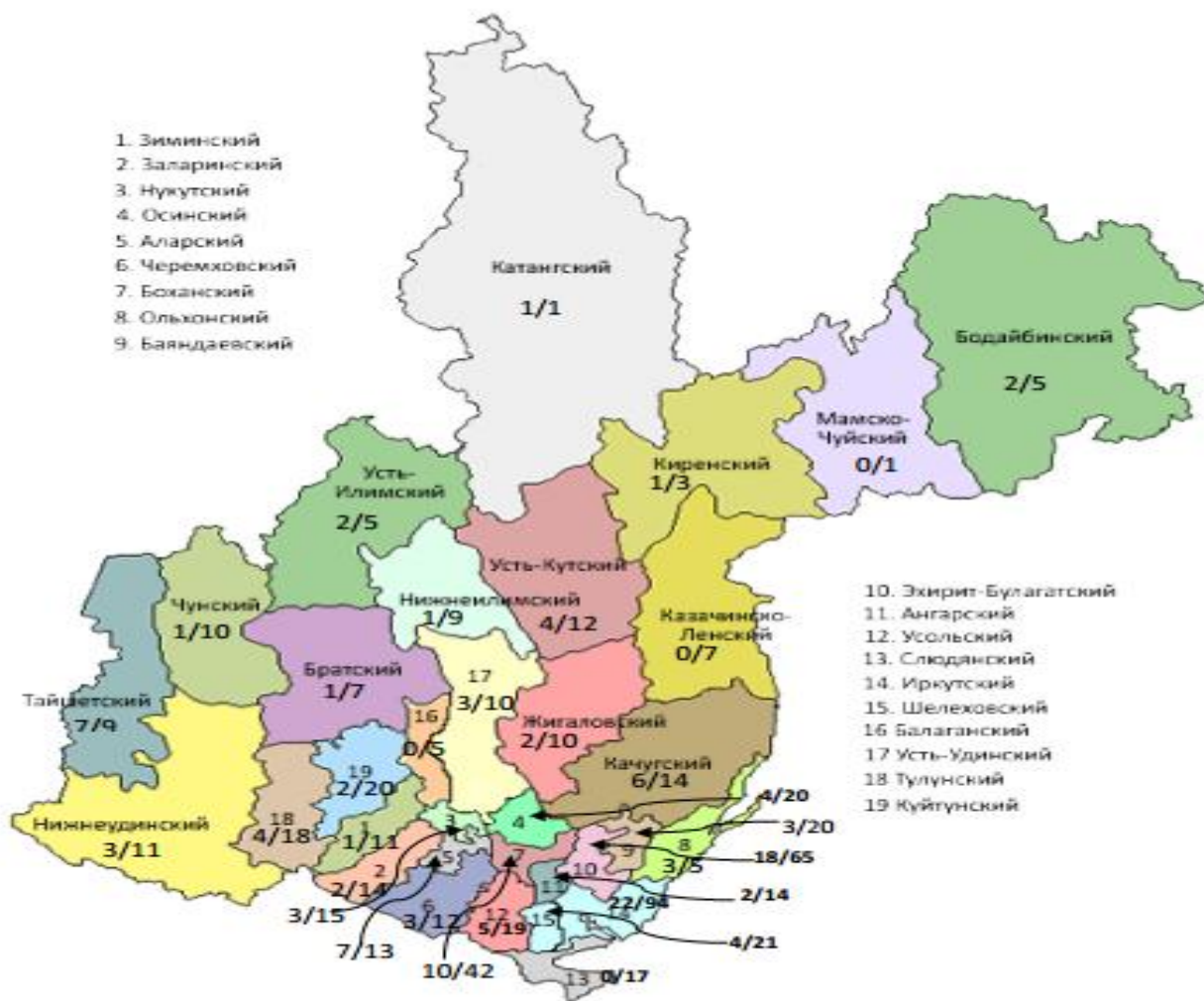


Рисунок 1. Распределение штаммов W148/B0, выделенных от больных ТБ, в соотношении к общему количеству идентифицированных образцов МБТ по районам Иркутской области (%)

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR (24): Categorical (1), Spoiligs: Categorical (1), RD: Categorical (1), SNP: Categorical (1)

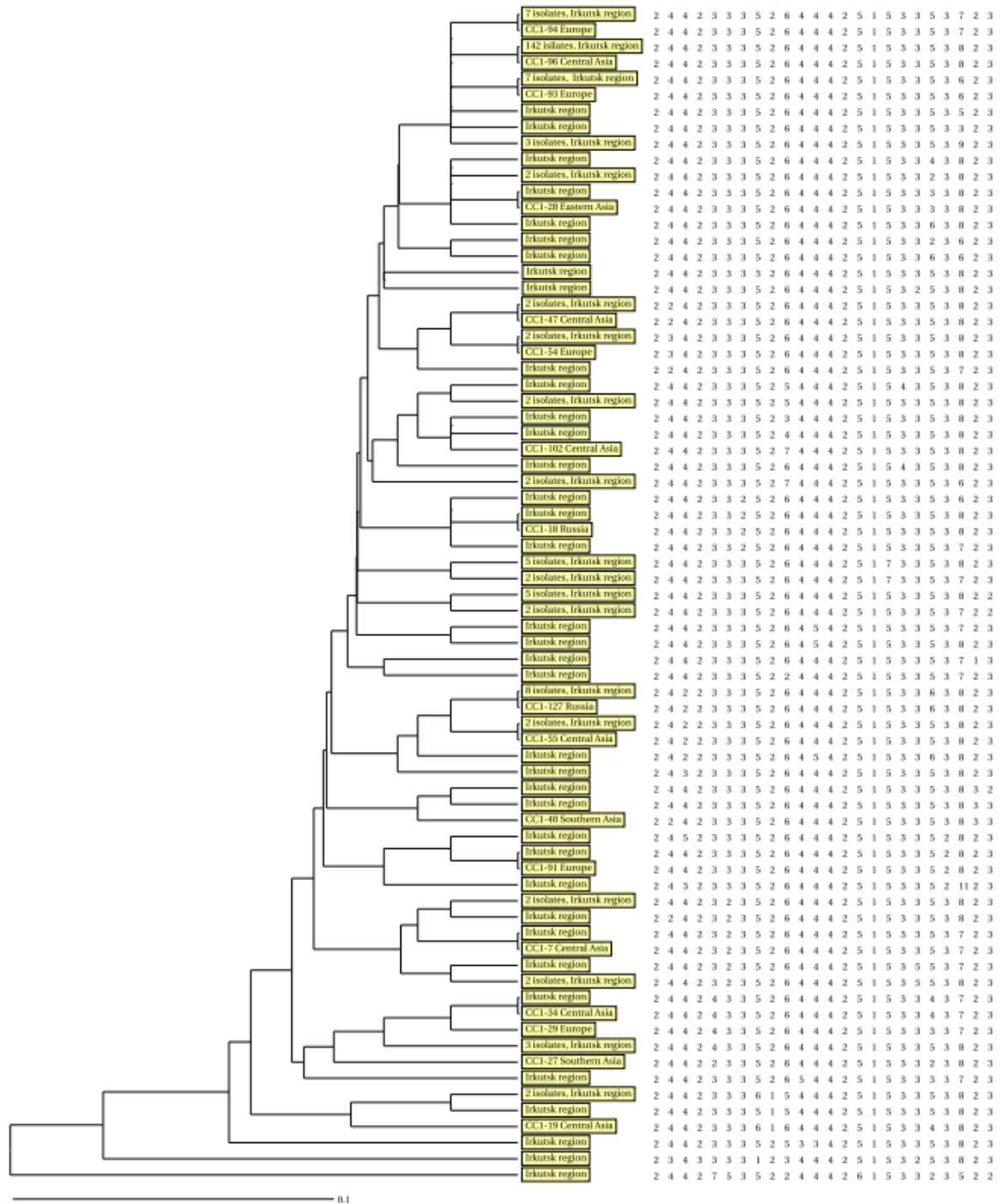


Рисунок 2. UPGMA древо профилей субтипа CC1 генотипа Weijing *M. tuberculosis* от больных туберкулезом в Иркутской области

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

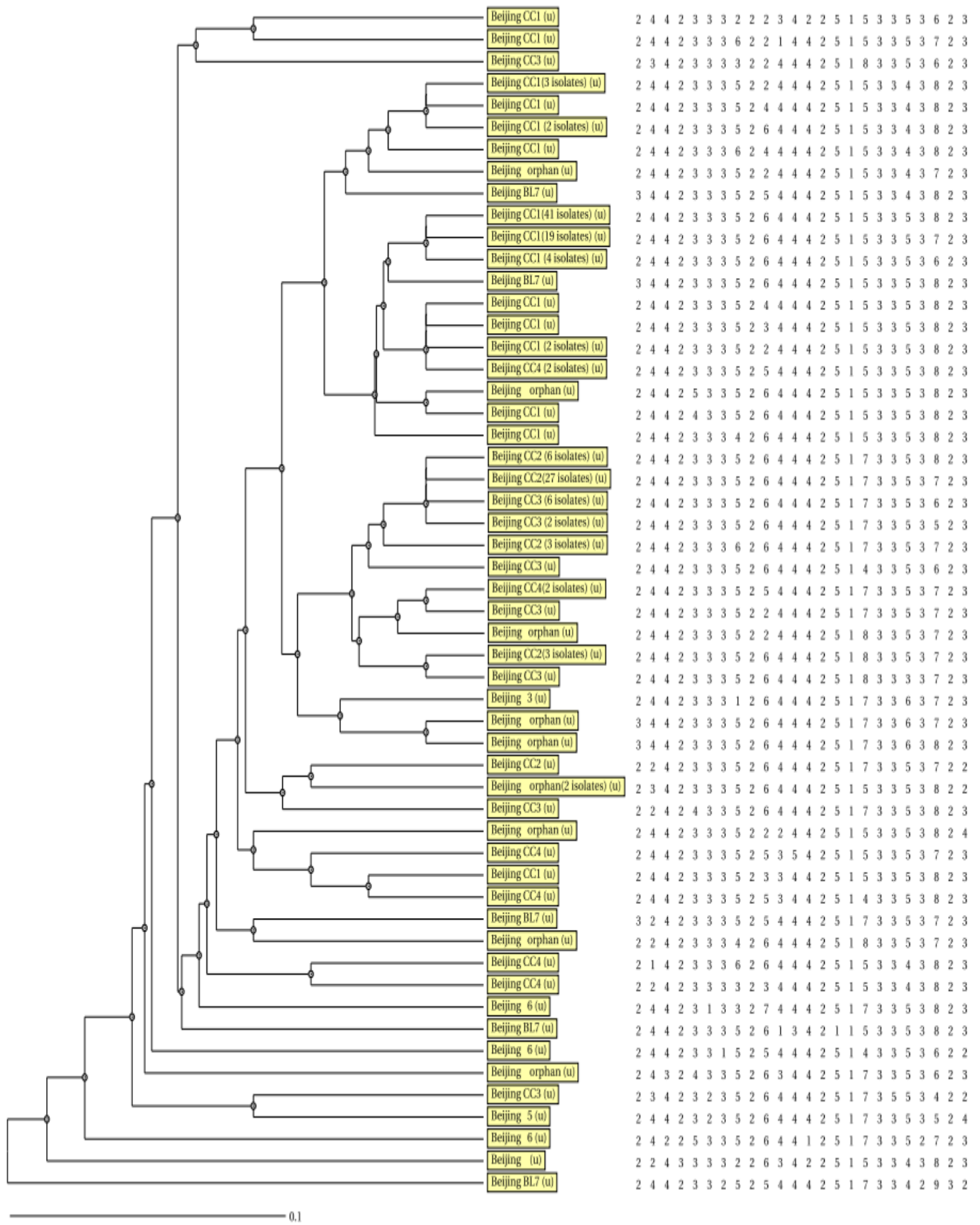


Рисунок 3. UPGMA древо профилей субтипа CC1 генотипа Beijing *M. tuberculosis* от больных туберкулезом в Саха (Якутии)

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

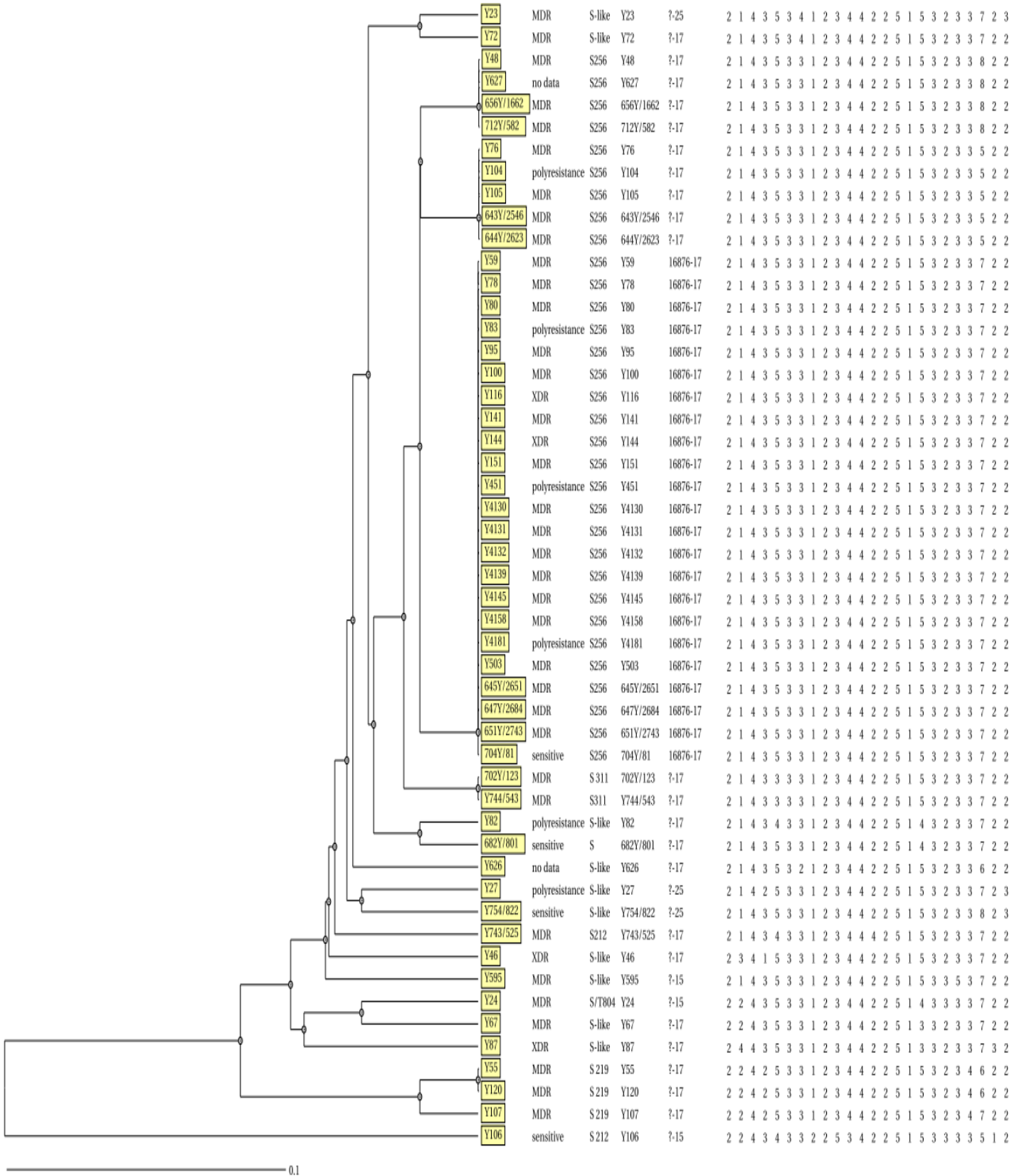


Рисунок 4. UPGMA древо профилей генотипа *S. M. tuberculosis* в Саха (Якутии)

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

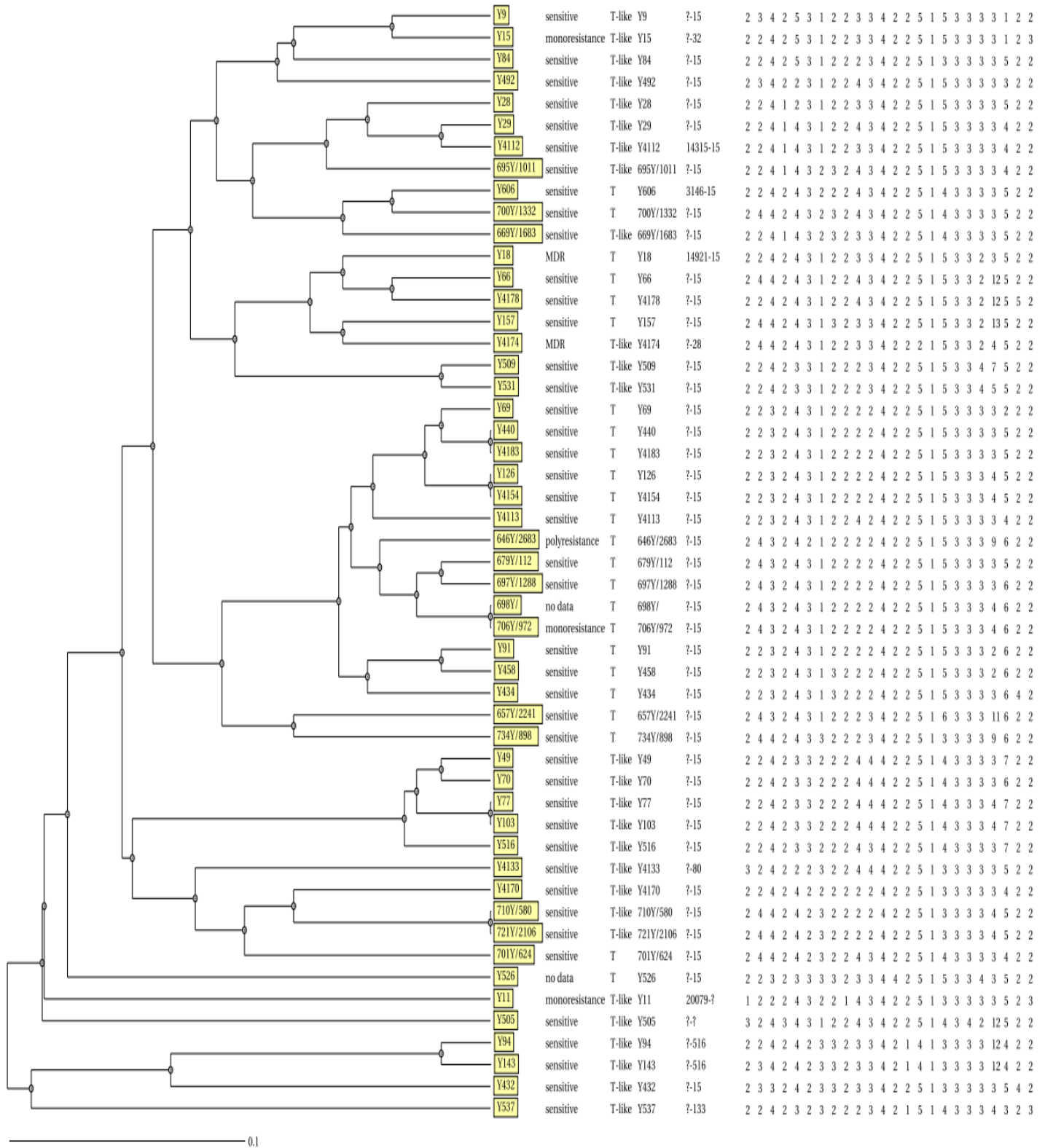


Рисунок 5. UPGMA древо профилей генотипа T *M. tuberculosis* в Саха (Якутии)

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

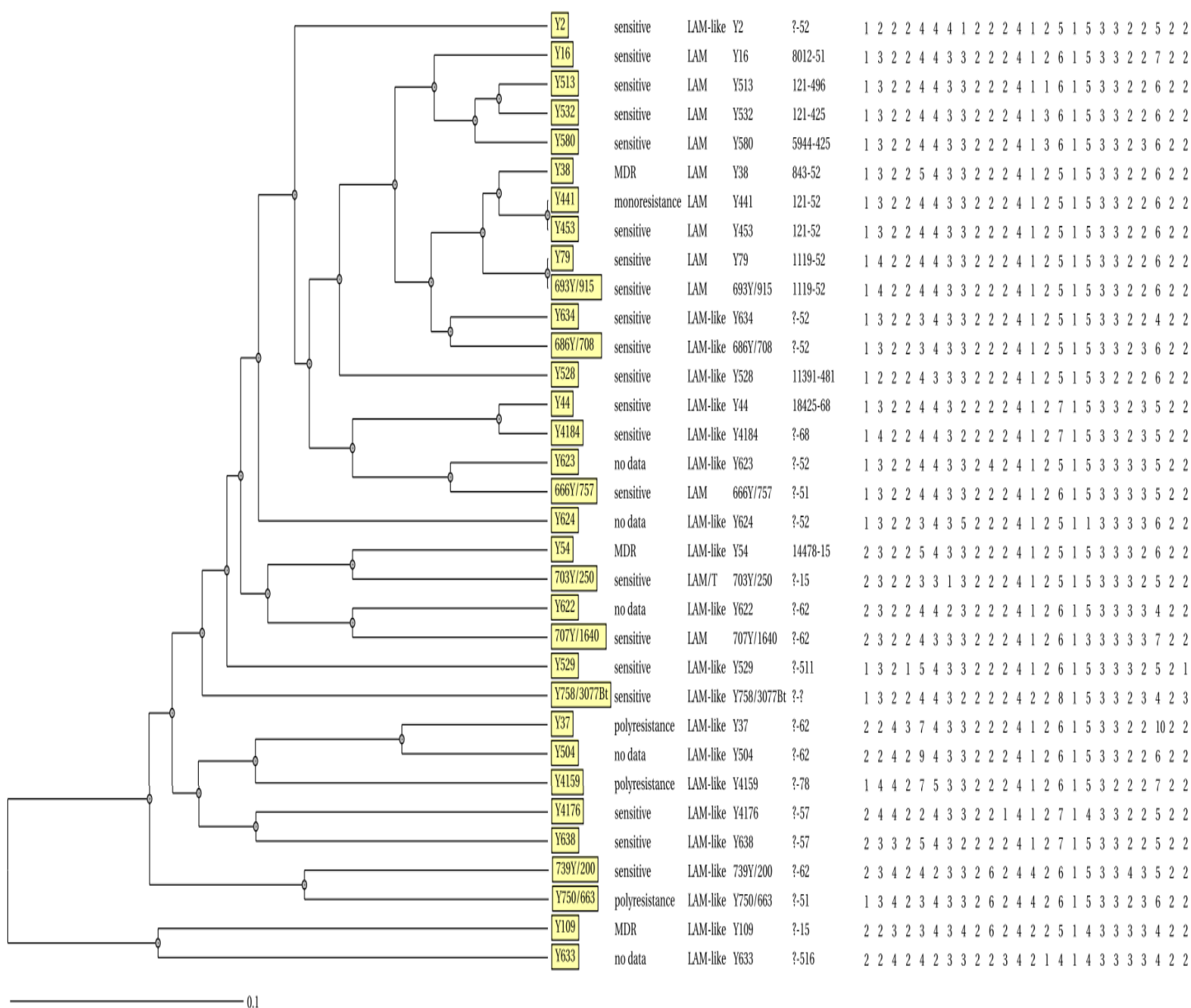


Рисунок 6. UPGMA древо профилей генотипа LAM *M. tuberculosis* в Саха (Якутии)

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

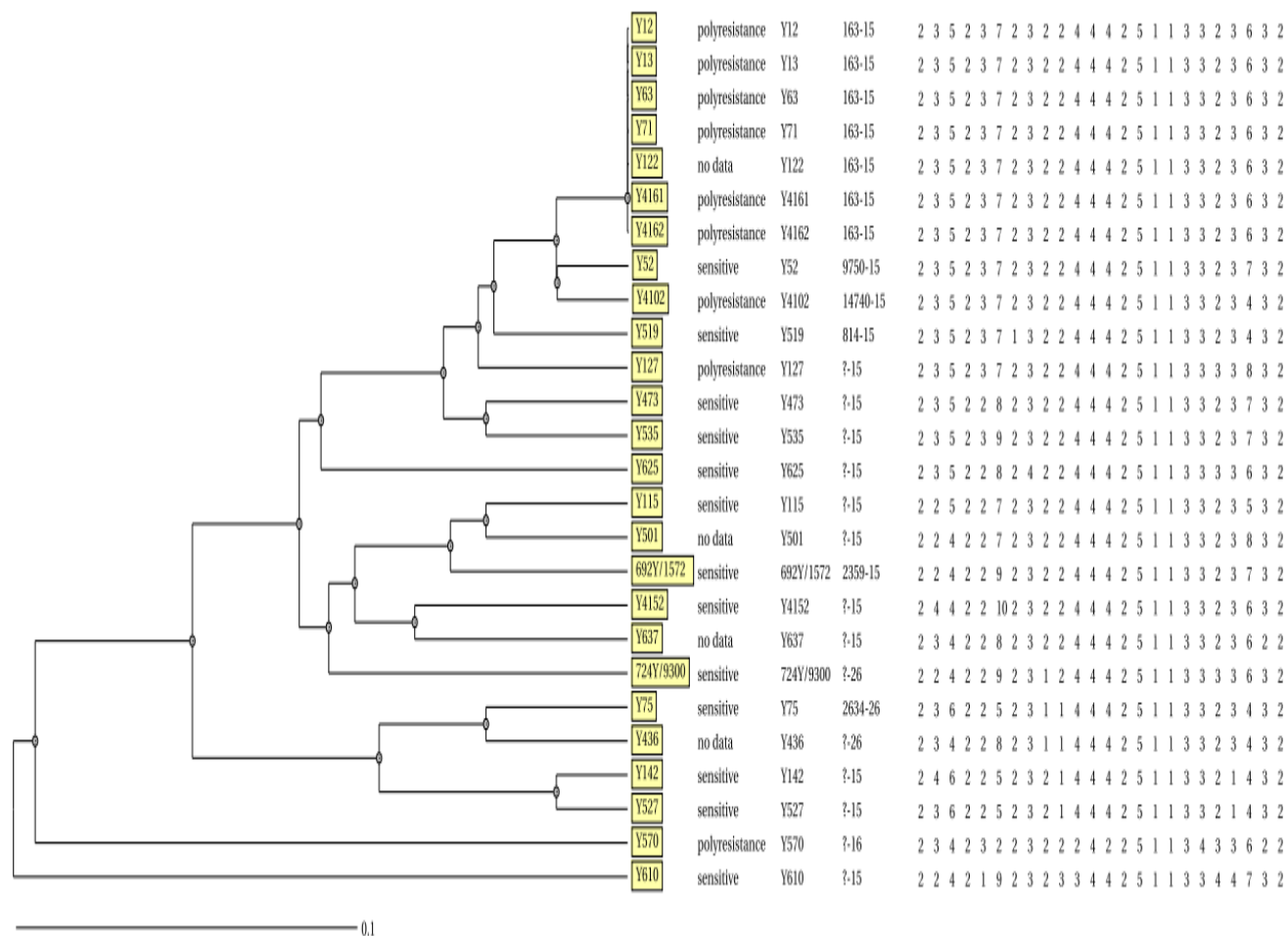


Рисунок 7. UPGMA древо профилей генотипа Ural *M. tuberculosis* в Саха (Якутии)

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

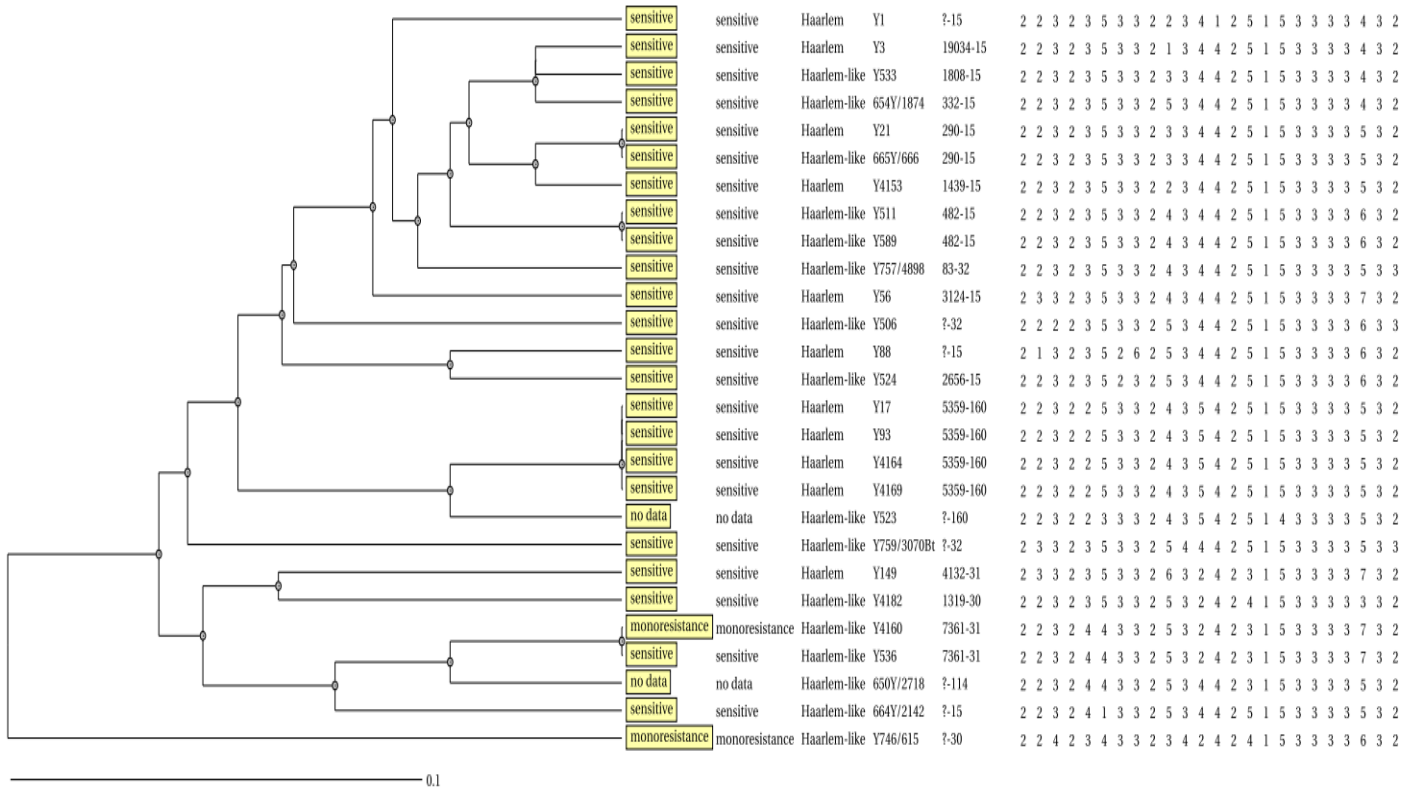


Рисунок 8. UPGMA древо профилей генотипа Haarlem *M. tuberculosis* в Саха (Якутии)

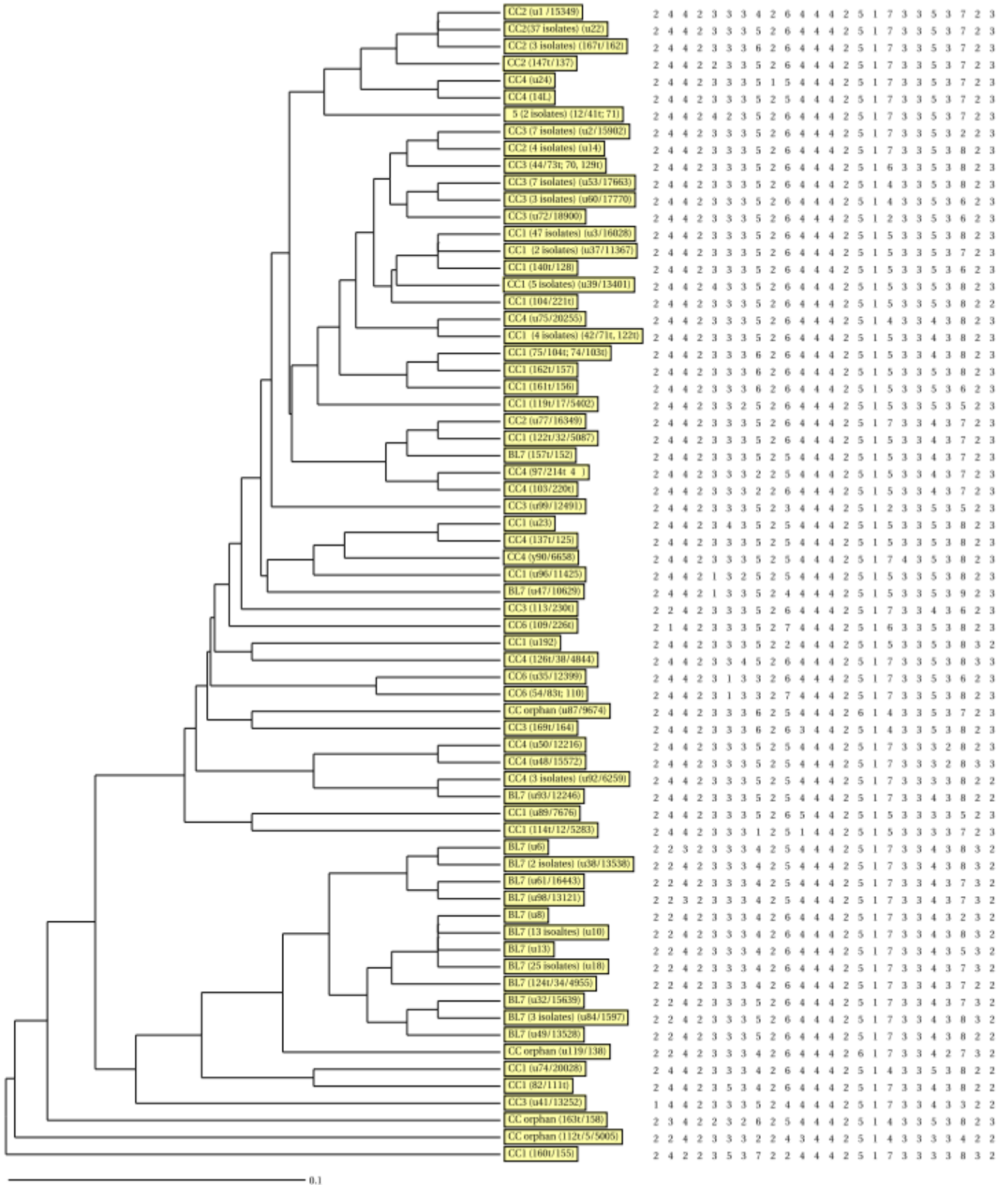
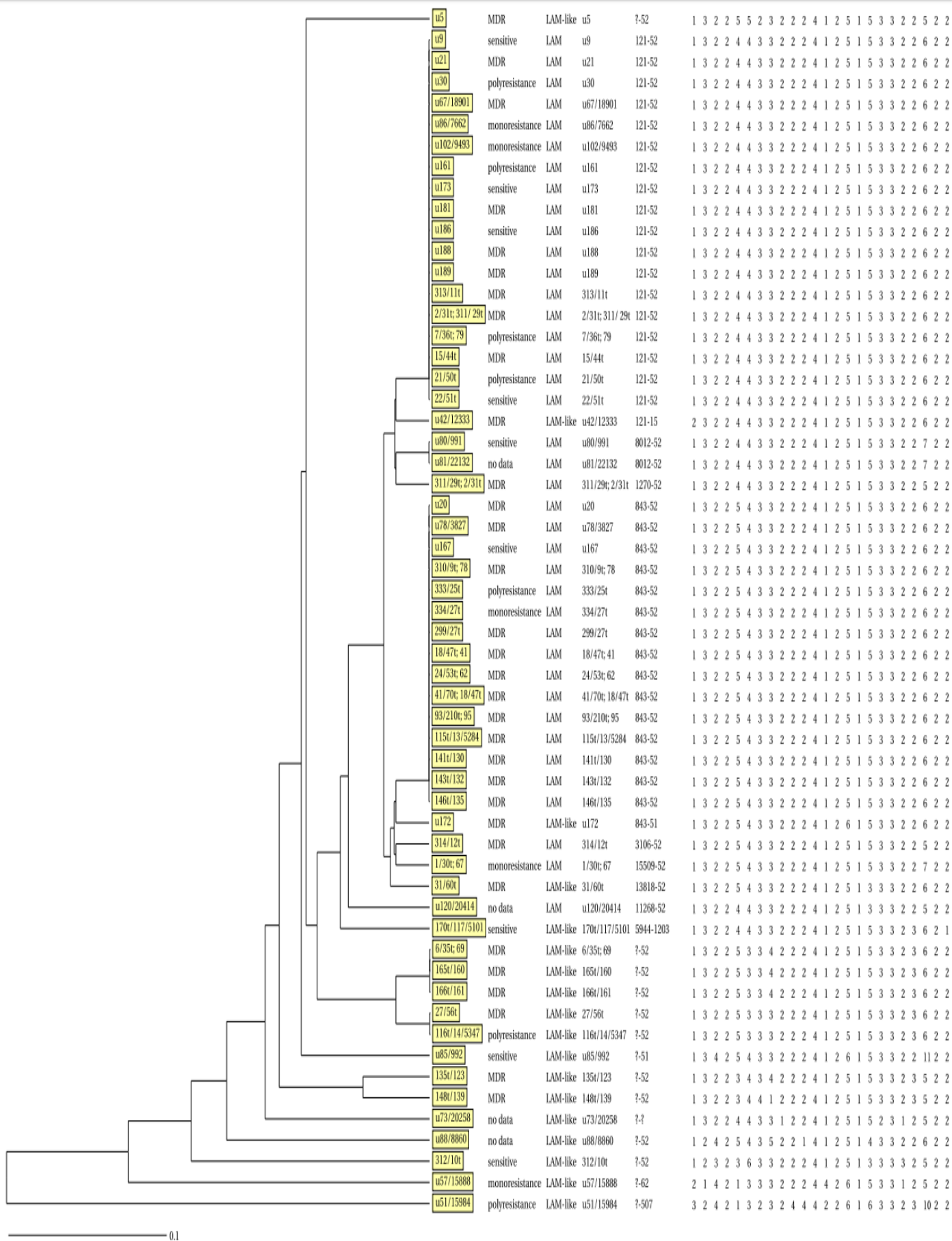


Рисунок 9. UPGMA древо профилей генотипа Beijing *M. tuberculosis* в Бурятии



0.1

Рисунок 10. UPGMA древо профилей генотипа LAM *M. tuberculosis* в Бурятии

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

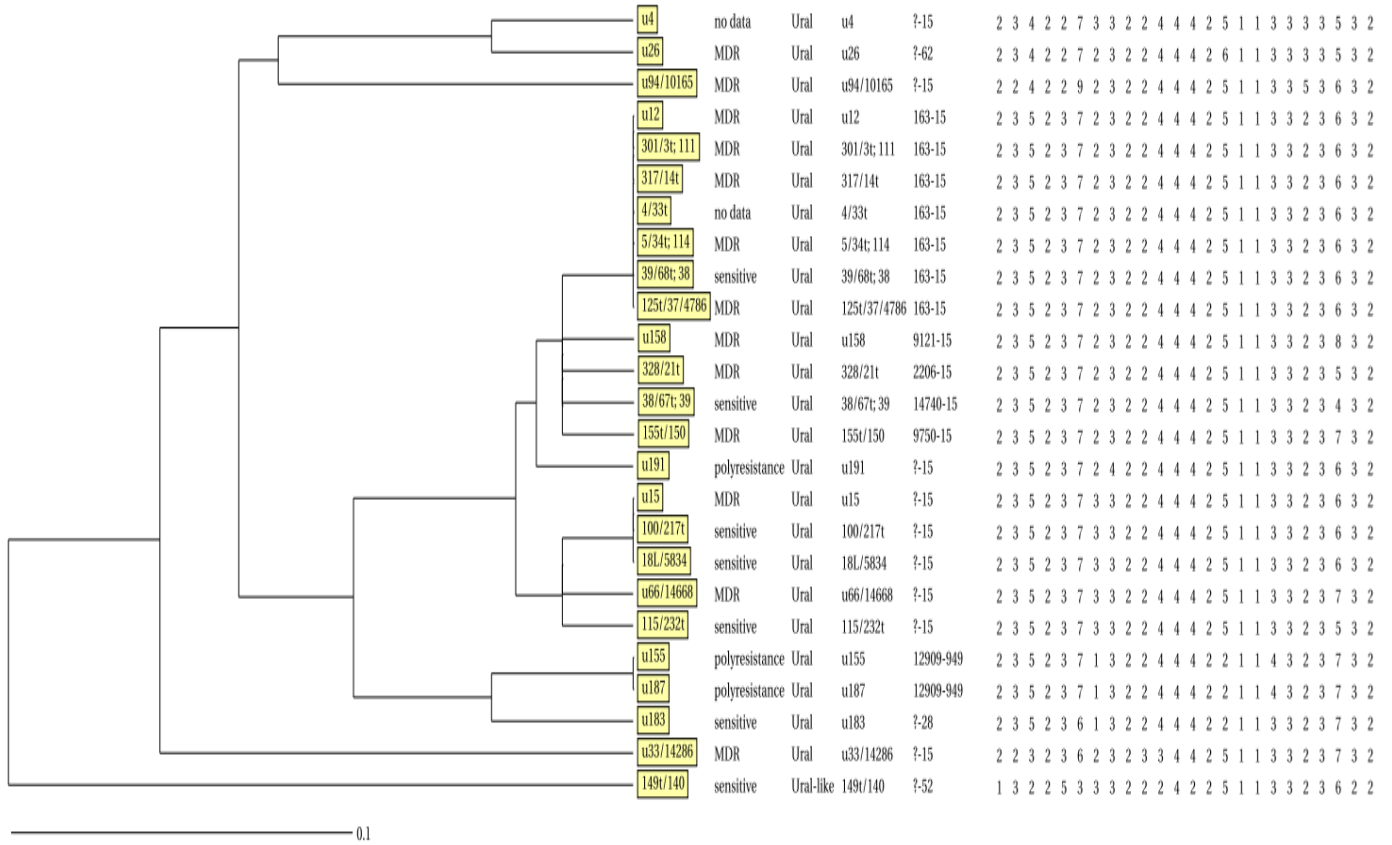


Рисунок 11. UPGMA древо профилей генотипа Ural *M. tuberculosis* в Бурятии

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR (24): Categorical

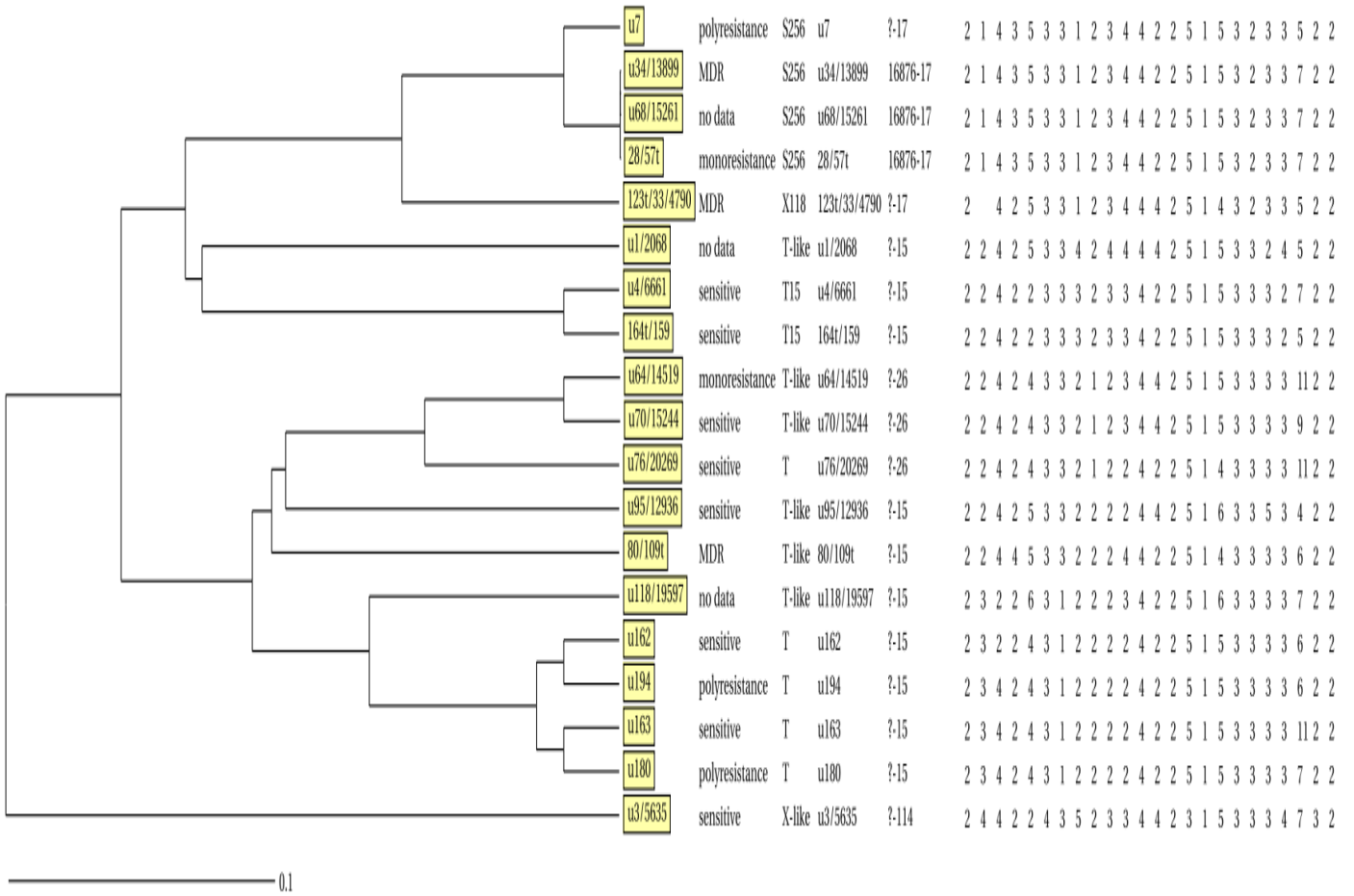


Рисунок 12. UPGMA древо профилей генотипов T,S и X *M. tuberculosis* в Бурятии

UPGMA-Tree, MIRU-VNTR [24]: Categorical

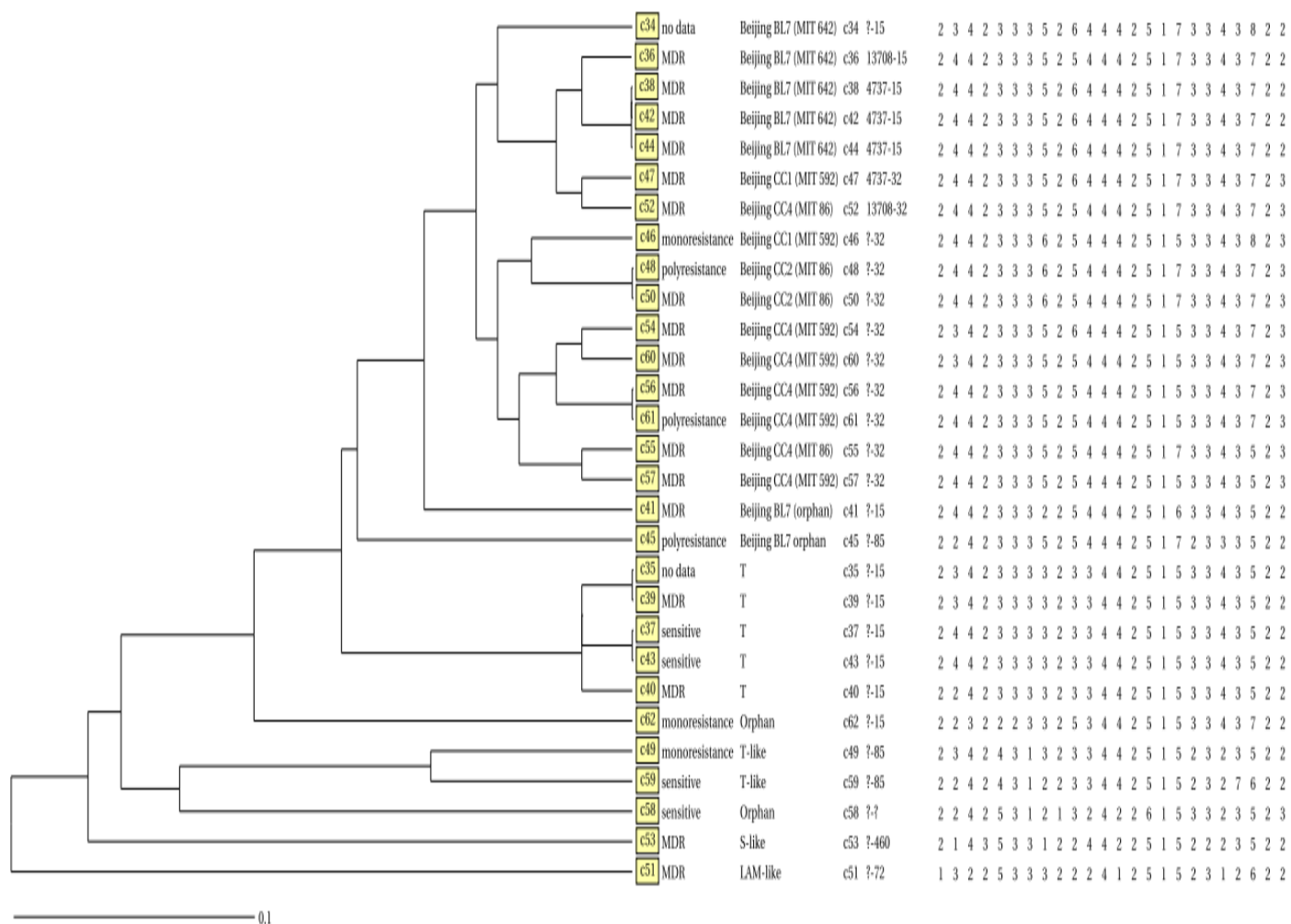


Рисунок 13. UPGMA древо профилей генотипов *M. tuberculosis* в Агинском АО Читинской области

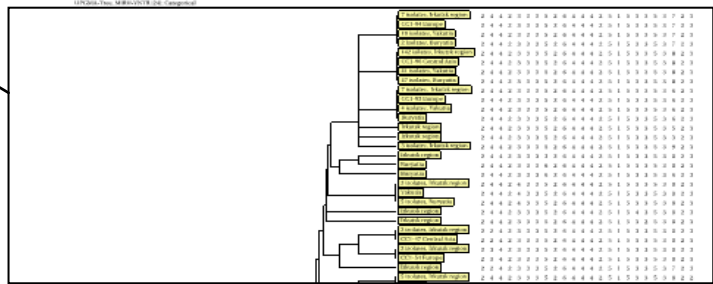
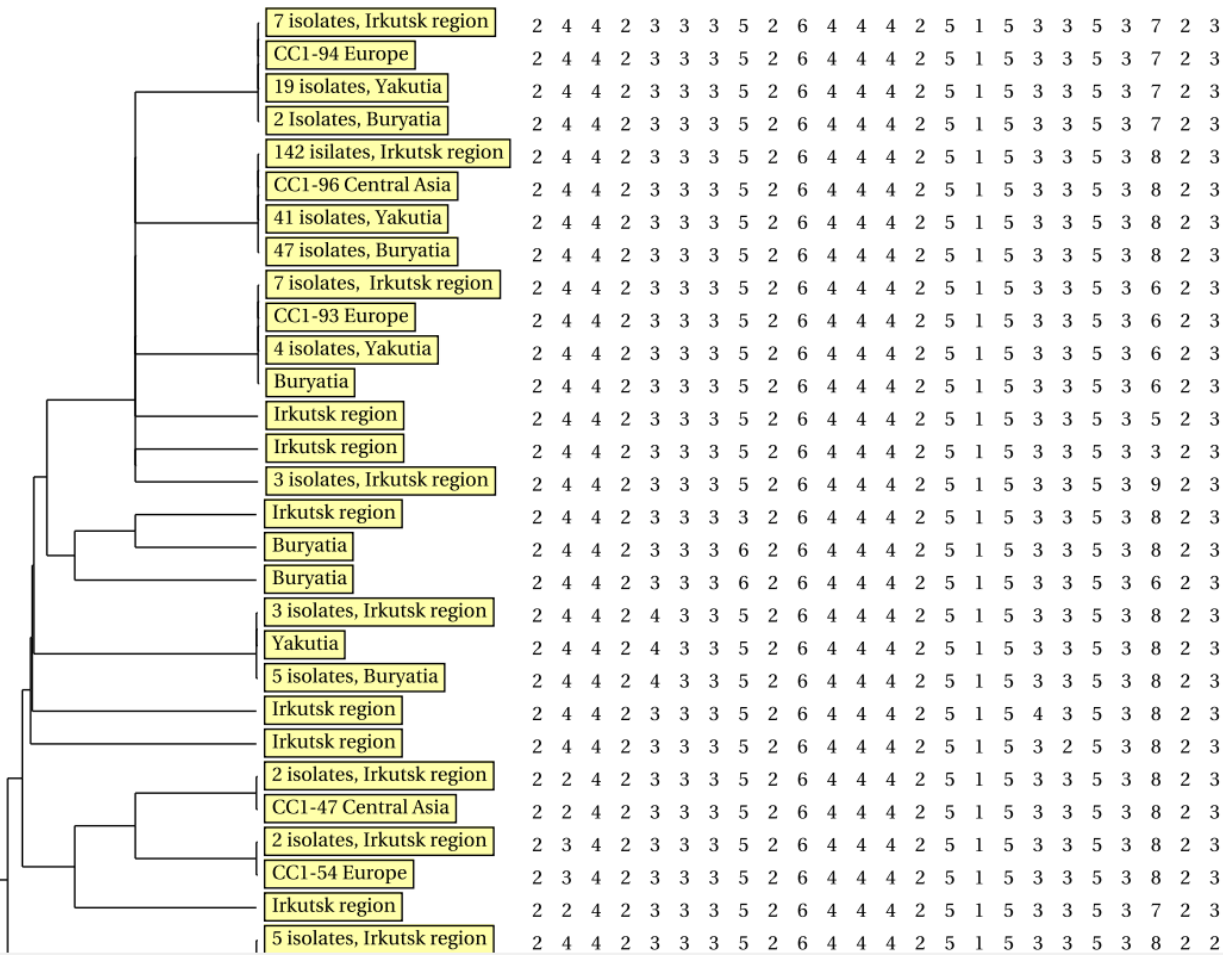


Рисунок 14. UPGMA древо профилей субтипа CC1 генотипа Beijing *M. tuberculosis* от больных туберкулезом в изучаемых регионах Северной Азии

В прямоугольнике выделен фрагмент, представленный в увеличенном виде вверху.

