

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТАДЖИКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМ. АБУАЛИ ИБНИ СИНО»**

УДК 579.873.22

На правах рукописи

ПИРМАХМАДЗОДА БОБОДЖОН ПИРМАХМАД

**КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВНЕДРЕНИЯ ГЕНОМНОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА В
РЕСПУБЛИКЕ ТАДЖИКИСТАН
(КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 14.01.16 – Фтизиатрия

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Бобоходжаев О.И.

Душанбе – 2025

Оглавление

Перечень сокращений, условных обозначений	4
Введение	6
Общая характеристика исследования	9
Глава 1. Клиническое значение секвенирования генома микобактерий туберкулёза (Обзор литературы)	15
1.1. Актуальные проблемы современной фтизиопульмонологической науки и пути их решения с помощью внедрения секвенирования генома микобактерий туберкулеза	15
1.2. Актуальность проведения секвенирования генома микобактерий туберкулёза для Республики Таджикистан	16
1.3. Причины возникновения мутаций и влияние противотуберкулезных препаратов на развитие лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза	21
1.4. Вопросы идентификации туберкулёзных и нетуберкулёзных микобактерий	26
Глава 2. Материал и методы исследования	48
2.1. Дизайн исследования	47
2.2. Изучаемые переменные	49
2.3. Метод секвенирования для идентификации неизвестных патогенов	57
2.4. Клинические критерии диагностики	59
2.5. Микробиологическая верификация	59
Глава 3. Эффективность внедрения и применения нового метода секвенирования генома микобактерий	64
3.1. Результаты идентификации микобактерий и спектра их лекарственной устойчивости с применением секвенатора	64
3.2. Результаты идентификации штаммов микобактерий с применением секвенатора	82

3.3. Результаты идентификации нетуберкулезных микобактерий и спектра их лекарственной устойчивости с применением секвенатора..	89
Глава 4. Эффективность лечения больных с лекарственно устойчивыми формами туберкулёза лёгких и нетуберкулезных микобактериозов лёгких после применения нового метода секвенирования генома микобактерий.....	95
4.1. Лечение больных с лекарственно устойчивыми формами туберкулёза лёгких и микобактериоза лёгких.....	95
4.2. Излечение случая туберкулёза с ошибочно установленной тотальной лекарственной устойчивостью после установления диагноза ШЛУ-ТБ по результатам секвенирования.....	99
Глава 5. Обзор полученных результатов.....	104
Выводы.....	118
Рекомендации по практическому использованию результатов исследования.....	120
Список литературы.....	121
Публикации по теме диссертации.....	147
Приложение 1.....	150

Перечень сокращений, условных обозначений

АМБП	активный мониторинг безопасности препаратов
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГЦЗНТ	Городской центр защиты населения от туберкулеза
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КРЛ	краткосрочный режим лечения
ЛУ-ТБ	лекарственно-устойчивый туберкулез
ЛЧ-ТБ	лекарственно-чувствительный туберкулез
МБ	микобактериоз лёгких
МБТ	микобактерии туберкулеза
мКРЛ	модифицированная краткая схема лечения РУ-ТБ только пероральными препаратами
МЛУ-ТБ	множественно- лекарственно устойчивый туберкулез
МТБК	микобактерии туберкулезного комплекса
НКЛ	непосредственно-контролируемое лечение
НЛОЗ	Национальная лаборатория общественного здравоохранения
НРЛ	Национальная референс лаборатория
НТМБ	нетуберкулёзные микобактерии
НЦТПиГХ	Национальный центр туберкулеза, пульмонологии и грудной хирургии
НЯ	нежелательные явления
ПВР	противотуберкулезные препараты второго ряда
ПМСП	первичная медико-санитарная помощь
ПТП	противотуберкулезные препараты
РТ	Республика Таджикистан
РУ-ТБ	рифампицин-устойчивый туберкулез
РЦЗНТ	Республиканский центр защиты населения от туберкулеза

СНРЛ	Супранациональная Референс Лаборатория
ТБ	туберкулез
ТБЛ	туберкулез легких
ТЛЧ	тест на лекарственную чувствительность
ХТ	химиотерапия
ЦВКК	Центральная врачебная консультативная комиссия
ЦЗНТ	Центр защиты населения от туберкулеза
ШЛУ-ТБ	Туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью
ЭКГ	Электрокардиограмма
ВРаL	Схема лечения, состоящая из бедаквилина, претоманида и линезолида
GDF	Глобальный Фонд по лекарственным средствам
GeneXpert	Анализ Xpert® на МБТ/RIF
HbA1c	Гемоглобин A1c
HBV	Вирус гепатита В
HCV	Вирус гепатита С
LPA	Метод линейных зондов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), современная эпидемиологическая ситуация характеризует Республику Таджикистан (РТ) как одну из приоритетных стран, требующих особого внимания в контексте борьбы с туберкулёзом (ТБ). В частности, РТ входит в перечень 18 государств Европейского региона ВОЗ, где наблюдается значительное бремя туберкулёзной инфекции. Более того, эпидемиологическая значимость страны усугубляется тем, что она включена в список 30 государств мирового масштаба, где регистрируется высокая распространённость резистентных форм ТБ [WHO, Global TB Report, 2022].

В 2023 году бремя множественно устойчивого ТБ (МЛУ-ТБ) в РТ было оценено ВОЗ как и в 2022 году в 2200 случаев, что несколько ниже прогнозов на 2021 год (2700 случаев). В то же время, согласно данным официальной статистики в 2023 году всего было выявлено только 422 случаев МЛУ-ТБ или 19,2% от оценочного числа ВОЗ; в 2022 году - 472 и в 2021 году – 496 случаев МЛУ-ТБ [WHO, TB country profile, 2021, 2022, 2023].

Анализ эпидемиологической ситуации по ТБ в РТ отражает также неоднозначную ситуацию. По данным ГУ «Республиканский центр по защите населения от ТБ» (2022), наблюдается существенное снижение таких эпидемиологических показателей как заболеваемость туберкулёзом и её распространенность. Так, заболеваемость ТБ сократилась с 56,5 случаев на 100 тыс. населения в 2019 году до 39,7 на 100 тыс. населения в 2022 году. Аналогичная тенденция отмечена в показателях смертности от ТБ, где показатель низился с 2,2 случаев на 100 тыс. населения в 2019 году до 1,0 в 2022 году, с промежуточными значениями 1,4 и 1,3 в 2020 и 2021 годах соответственно. Однако оценки ВОЗ представляют иную картину. Согласно международным данным, наблюдается постепенный рост как заболеваемости ТБ (с 83 случаев на 100 тыс. населения в 2019 году до 88 в 2021 году), так и смертности от ТБ (с 7,9 случаев в 2019 году до 12 случаев на 100 тыс.

населения в 2021 году). Эта диссоциация между национальной статистикой и международными оценками указывает на необходимость дальнейшего совершенствования системы эпидемиологического надзора за ТБ в республике [WHO Country TB Profile, 2019, 2020].

Критический анализ эпидемиологической ситуации по ТБ выявил существенное расхождение между национальной статистикой и оценками ВОЗ. Примечательно, что эти показатели демонстрируют противоположные тренды: в то время как официальные данные указывают на последовательное снижение заболеваемости и смертности, международные оценки фиксируют их неуклонный рост. Количественный анализ этой диспропорции позволяет предположить, что около трети случаев ТБ остаются невыявленными в системе национального эпидемиологического надзора. Особую обеспокоенность вызывает рост распространённости лекарственно устойчивых форм ТБ (ЛУ-ТБ), что требует проведения дополнительных эпидемиологических исследований для точной оценки масштаба данной проблемы и разработки эффективных стратегий противодействия.

В ежедневной клинической практике фтизиатры встречаются с комплексом диагностических проблем, выходящих за рамки недостаточного выявления ТБ, роста распространённости ЛУ-ТБ и микобактериозов. Внедрение современных высокочувствительных диагностических методов выявило существенную методологическую проблему: идентификацию группы пациентов, у которых при положительном результате микроскопии на кислотоустойчивой микобактерии (МБТ+) молекулярно-генетические тесты (GeneXpert MTB-RIF, Hain-test) не подтверждают наличие *M. tuberculosis*.

Данное явление указывает на вероятное наличие микобактериозов (МБ) лёгких, то есть заболеваний, вызванных нетуберкулёзными атипичными микобактериями (НТМБ). Существенными трудностями, ограничивающими адекватную диагностику МБ в Республике Таджикистан, является недостаточное развитие соответствующей лабораторной базы. Как следствие,

отсутствие документированных случаев МБ в клинической практике может свидетельствовать о систематической гипердиагностике ТБ.

В Республике Таджикистан научных исследований по изучению вышеперечисленных проблем до настоящего времени не проводилось и данное исследование проводится впервые.

Степень научной разработанности изучаемой проблемы. В повседневной клинической практике врачи фтизиатры зачастую встречаются с фактами несоответствия данных лабораторной идентификации спектра лекарственной устойчивости микобактерий ТБ и клинической динамикой лечения больных с ЛУ-ТБ, подобранными в соответствии с чувствительностью микобактерий ТБ (МБТ) противотуберкулезными препаратами (ПТП). Другими словами, встречаются случаи отсутствия эффекта от лечения, схема которого, подобрана основываясь на данных лабораторных исследований, и наоборот, факт наличия клинического эффекта от применения устойчивых к микобактериям ПТП. Указанные казуистические наблюдения, в основном, связаны с неточной идентификацией спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП.

Таким образом, возникает необходимость во внедрении новых более эффективных высокоспецифичных методов идентификации спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП, каковым является геномное секвенирование МБТ. Это особенно важно для улучшения исходов лечения больных с ЛУ-ТБ.

Связь исследования с программами (проектами), научной тематикой. Данное научное исследование проведено в рамках выполнения научной темы кафедры фтизиопульмонологии ГОУ «ТГМУ им. Абуали ибни Сино», выполняемой в период 2017–2021гг. по теме «Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью: методы диагностики и эффективность лечения в Республике Таджикистан». Имеется также связь данного исследования с выполнением «Национальной программы защиты населения от туберкулеза в Республике Таджикистан на 2021–2025 годы».

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель исследования: провести научное обоснование эффективности внедрения нового метода геномной идентификации *M. tuberculosis* и нетуберкулёзных микобактерий, идентификации спектра их лекарственной устойчивости к противотуберкулёзным препаратам в Республике Таджикистан.

Задачи исследования:

1. Оценить эффективность и обоснованность внедрения нового метода геномного секвенирования микобактерий в практике фтизиатрической службы Республики Таджикистан.

2. Изучить принадлежность микобактерий к семействам штаммов *M. Tuberculosis*, их лекарственную устойчивость к противотуберкулёзным препаратам с помощью нового метода геномного секвенирования.

3. Изучить результаты верификации заболеваний лёгких, вызванных нетуберкулёзными микобактериями с помощью применения нового метода геномного секвенирования.

4. Анализировать эффективность лечения больных ТБ и МБ лёгких, спектр лекарственной устойчивости которых уточнён с применением нового метода геномного секвенирования микобактерий.

Объектом исследования стали образцы культуры 340 больных ТБ, которые были исследованы новым методом геномной идентификации спектра лекарственной устойчивости микобактерий ТБ. Перед проведением секвенирования образцов культуры больных ТБ, согласно задачам нашего научного исследования, разделили их на 3 этапа анализа:

Первый этап –внедрить данный метод и тем самым улучшить идентификацию спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к ПТП и идентификацию НТМБ.

Второй этап –идентифицировать *M. tuberculosis*, НТМБ и других легочных заболеваний, что позволило назначить дифференцированное лечение больных и тем самым повысить эффективность их лечения.

Третий этап – провести сполиготипирование штаммов МБТ, которое позволило выявить их принадлежность к различным семействам МБТ.

Предмет исследования. Улучшение идентификации микобактерий, спектра лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* к ПТП и НТМБ, что привело к повышению эффективности лечения больных ТБ и МБ легких.

Научная новизна исследования заключается в:

1. Впервые улучшена идентификация МБТ и НТМБ и изучен спектр их чувствительности к антибактериальным препаратам через внедрение нового метода геномной идентификации микобактерий.

2. Впервые проведено сполиготипирование штаммов МБТ, которое выявило их принадлежность преимущественно к семействам *Beiging*.

3. Впервые проанализирована эффективность лечения больных с ТБ и МБ легких новым методом геномного секвенирования микобактерий и проведена более точное определение спектра их лекарственной устойчивости к ПТП и НТМБ.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования. Проведенные исследования позволили улучшить уточнение диагноза ТБ и МБ лёгких и их лекарственной устойчивости, провести дифференциальную диагностику между туберкулёзом и микобактериозом лёгких.

Внедренный в практику здравоохранения новый метод геномной идентификации микобактерий повышает эффективность лечения больных ТБ и МБ легких: идентификация разновидностей микобактерий даёт возможность отделить больных ТБ легких от больных с нетуберкулезными МБ легких, что позволяет повысить эффективность их лечения.

Положения, выносимые на защиту.

1. Идентификация разновидностей микобактерий даёт возможность отделить больных с нетуберкулезными МБ легких от больных с ТБ легких, что позволило провести им эффективное лечение макролидами и ПТП, назначенными в зависимости от спектра их лекарственной устойчивости.

2. Сполиготипирование штаммов МБТ выявило их принадлежность к семействам Beijing, Ural, CAS, LAM, H, T и X. Изучение штаммов в зависимости от спектра устойчивости показывает, что среди всех устойчивых штаммов, - 69,8% приходится на линию Beijing и - 80,2% являются рифампицин-устойчивыми штаммами.

3. Внедренный в практику здравоохранения новый метод геномной идентификации МБТ повышает эффективность лечения больных с ЛУ-ТБ от - 83% до - 89,2%, при этом успешность лечения больных с НТМБ составляет - 91,7%.

Степень достоверности результатов диссертации подтверждается достаточным объемом материалов исследования, многолетними наблюдениями, современными методами статистической обработки результатов исследований, публикациями и обсуждениями компонентов диссертации на форумах разного уровня, включая международные конференции.

Выводы и рекомендации основаны на научном анализе данных о идентификации МБТ и НТМБ, а также спектре их лекарственной устойчивости к ПТП и макролидам путем внедрения нового метода геномной идентификации микобактерий.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту ВАК при Президенте Республики Таджикистан по специальности: 14.01.16 – Фтизиатрия: пункт 1. Патогенез туберкулеза, изучение свойств возбудителя микобактерий туберкулеза, взаимодействие возбудителя туберкулеза и организма больного, методы выявления микобактерий туберкулеза, иммунологические, генетические, патоморфологические, биохимические, патофизиологические изменения в организме больных в процессе болезни и лечения; пункт 2. Клинические проявления туберкулеза органов дыхания у детей, подростков и взрослых, нарушения функции органов дыхания и других органов и систем при туберкулезе, туберкулез с сопутствующими заболеваниями, диагностика

туберкулеза органов дыхания с использованием клинических, лабораторных, лучевых, бронхолегочных и других методов исследования, дифференциальная диагностика туберкулеза органов дыхания и других заболеваний легких; пункт 3. Лечение туберкулеза органов дыхания: химиотерапия, патогенетическая терапия, санаторно-курортное лечение, амбулаторная химиотерапия, организационные формы проведения химиотерапии, реабилитационное лечение туберкулеза и его последствий; пункт 4. Выявление, эпидемиология и статистика туберкулеза, диспансерное наблюдение за контингентами больных туберкулезом, организация борьбы с туберкулезом. Профилактика, противотуберкулезная вакцинация, химиопрофилактика, санитарная профилактика туберкулеза, лучевая диагностика, туберкулино-диагностика, бактериологическая и молекулярно-генетическая диагностика в выявлении туберкулеза, эпидемиология туберкулеза в меняющихся условиях, изучение резервуара туберкулезной инфекции и путей заражения, взаимозаражения туберкулезом человека и животных, новые формы противотуберкулезных мероприятий, диспансерной, стационарной и санаторной работы, статистической отчетности и обработки статистических данных.

Личный вклад соискателя ученой степени в исследование. Автором лично налажен и внедрён в практику здравоохранения новый метод геномного секвенирования МБТ. Для достижения этой цели автор лично систематически связывался с представителями производителей данного секвенатора в Великобритании, вёл с ними переговоры, добился его доставки вместе с расходным материалом, организовал первоначально обучающий тренинг и затем пригласив их в Таджикистан организовал обучающий тренинг на рабочем месте. Все указанные активности были осуществлены без финансовых взаимоотношений, только в рамках научного сотрудничества. В рамках исследования автором был подготовлен протокол исследования, проведен сбор материала и его статистическая обработка, анализ и интерпретация полученного материала. Весь основной объем работы, включая 80% всех исследований на секвенаторе (остальные 20%, выполнены

лаборантом) был выполнен самостоятельно и содержит ряд новшеств, которые свидетельствуют о личном вкладе диссертанта в науку. Написание всех глав диссертации, формулировка цели и задач, положений, выносимых на защиту, выводов и практических рекомендаций выполнены лично диссертантом.

Апробация и реализация результатов диссертации.

Основные результаты диссертации доложены на: 50-ой Всемирной конференции по легочному здоровью (UNION Conference, 2019); научно-практической конференции на тему: «Коронавирусная инфекция в Республике Таджикистан: эпидемиология, диагностика и современные возможности лечения» (Душанбе, 2020); 10-й Региональный симпозиум по вопросам лечения туберкулёза в Восточной Европе и Центральной Азии “Научный прорыв: решение проблемы лекарственно-устойчивого туберкулёза в наших руках”, (Душанбе, 2023); научно-практической конференции, XX (юбилейная) научно–практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием, посвященная годам развития цифровой экономики и инновации 2025-2030 «Интеллектуальные технологии в медицинском образовании и науке: инновационные подходы» (Душанбе, 2025); кафедральном совещании кафедры фтизиопульмонологии ГОУ «ТГМУ им. Абуали ибни Сино» (Протокол №2, от 03.03.2025 г.); заседании проблемной межкафедральной комиссии по терапевтическим дисциплинам ГОУ «ТГМУ им. Абуали ибни Сино» с участием специалистов фтизиатров (Протокол №18, от 10.05.2025г.).

По результатам проведенных научных исследований с участием автора разработано в объеме 279 страниц, утверждено распоряжением МЗиСЗН РТ (от 17.10.2024, №704) и издано тиражом в 100 экз. учебно-методическое руководство для врачей «Национальное руководство по управлению за туберкулезом в Республике Таджикистан». Данное учебно-методическое руководство внедрено в образовательный процесс для проведения практических и лекционных занятий для студентов 5-го курса медико-профилактического факультета (акт внедрения от 30 ноября 2024 г., №5), а

также внедрено во всех учреждениях противотуберкулезной службы (акт внедрения от 24.10.2024.).

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 18 научных работ, в том числе 9 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК при Президенте Республики Таджикистан и Министерства образования и науки Российской Федерации.

Структура и объем диссертации. Материал диссертации изложен на 149 страницах компьютерного текста, и включает разделы: введение, общая характеристика работы, 4 главы собственных исследований, обзор полученных результатов, выводы, рекомендации по практическому использованию результатов исследования, 1 приложение и список используемой литературы. Диссертация иллюстрирована 16 таблицами и 15 рисунками. Список литературы включает 211 литературных источников, из них на русском – 73, на английском – 138.

ГЛАВА 1. КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Актуальные проблемы современной фтизиопульмонологической науки и пути их решения с помощью внедрения секвенирования генома микобактерий туберкулеза

Одной из актуальных проблем фтизиатрической науки является проблема идентификации возбудителя ТБ - *M. tuberculosis*, идентификация различных его штаммов, что позволило бы дифференцировать виды микобактерий ТБ, например, у трудовых мигрантов и их семейных контактов [25, 57, 80, 85, 157]. Идентификация выводов МТБК даст возможность ответить на дискутируемый в течение многих лет вопрос: заболел ли ТБ трудовой мигрант в стране миграции или же он уже был инфицирован, и трудовая деятельность в период миграции способствовала активации ТБ процесса. Также будет известен «индексный» пациент, от которого произошло возможное инфицирование и заболевание у членов семьи, у близких родственников и других лиц, бывших с ним в тесном и длительном контакте [15, 41, 58, 81, 103].

Другой важной проблемой фтизиопульмонологии является правильная идентификация спектра лекарственной чувствительности МБТ к ПТП у конкретного больного. Это важно для правильного подбора ПТП при установлении режима химиотерапии. В клинической практике врачи фтизиатры зачастую встречаются с фактами несоответствия данных лабораторного определения спектра лекарственной устойчивости микобактерий ТБ и клинической динамикой лечения больных с ЛУ-ТБ подобранными в соответствии с чувствительностью возбудителя противотуберкулезными препаратами (ПТП). Иногда встречаются случаи отсутствия эффекта от лечения, схема которого, подобрана основываясь на данных лабораторных исследований, и наоборот, факт наличия клинического эффекта от применения устойчивых к микобактериям ПТП. Указанные

казуистические наблюдения, в основном, связаны с неточной идентификацией спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП.

Ещё одной актуальной проблемой фтизиопульмонологии является факт того, что часто, в клинической практике встречаются случаи, когда больного лечат от ТБ, а при идентификации штамма МБТ выясняется, что возбудителем его заболевания является не *M. tuberculosis*, а нетуберкулезные микобактерии, которые вызывают микобактериоз легких, который имеет очень схожую с ТБ легких клинико-рентгенологическую картину.

Имеет место ещё одна проблема, связанная с идентификацией штаммов МБТ: это дифференцированная верификация рецидивов (повторной атаки заболевания вследствие остаточных посттуберкулезных изменений в легких после перенесенного ТБ) ТБ с реинфицированием (повторным инфицированием после перенесенного ТБ) МБТ больных, ранее перенесших ТБ [68].

В Республике Таджикистан научных исследований по изучению всех вышеперечисленных проблем не проводилось, так как не было внедрено метода верификации этих состояний. На основании вышеизложенного, мы провели поиск и анализ доступной литературы по указанным проблемам, по эффективности использования метода секвенирования генома МБТ в разных странах мира.

1.2. Актуальность проведения секвенирования генома микобактерий туберкулёза для Республики Таджикистан

Спектр применения современных молекулярных технологий весьма широк. Они позволяют детально изучать геном и ДНК современных микобактерий (производя их своеобразную геномную «паспортизацию»), и это дает возможность изучать эволюцию возбудителя туберкулёза на уровне, совершенно недоступном ранее [49, 74].

Секвенирование нового поколения - мощный инструмент для улучшения ведения и контроля за ТБ [62, 46]. Данные полногеномного секвенирования можно использовать для быстрого и точного обнаружения

образцов мутаций возбудителей, связанных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам [30].

Первый полный геном ТБ был опубликован в 1998 году из штамма H37Rv [70]. Используя технологии полногеномного секвенирования при ТБ появилась возможность ответить на многие вопросы, перечисленные нами в начале настоящего обзора. Полногеномное секвенирование генома микобактерий ТБ может предоставить исчерпывающие данные для прогнозирования их чувствительности и резистентности к лекарственным средствам, провести для сравнения эпидемиологический анализ штаммов в разных странах [8, 52]. Кроме того, существование набора данных полногеномного секвенирования позволяет исследователям оценить генетическое разнообразие по всему геному клинических образцов [73-135].

Технологии секвенирования позволяют определить чувствительность к препаратам примерно через 8–9 дней, в то время как для проведения тестов другими методами на чувствительность и получение результата требуется более 14 дней. Эта технология становится ценным инструментом для мониторинга устойчивости к антибиотикам, что позволяет провести оптимизацию режимов химиотерапии. Полногеномное секвенирование можно провести непосредственно из клинических образцов, поскольку для их для интерпретации доступны инструменты в онлайн-версиях. Например, для анализа лекарственной устойчивости существует веб-сервер TB-Profiler позволяющий пользователям используя данные секвенирования анализировать геном *M. Tuberculosis* для прогнозирования его происхождения и лекарственной устойчивости [17, 55, 61, 126].

Увеличение распространённости ЛУ-ТБ в Российской Федерации в значительной степени обусловлено экспансией штаммов МБТ генетического семейства Beijing, которые характеризуются выраженной тенденцией к формированию лекарственной резистентности [59, 73, 131, 138].

Историческая идентификация генотипа Beijing, являющегося ключевым представителем восточно-азиатской филогенетической линии *M.*

tuberculosis [74], была осуществлена в период 1992-1994 гг. при исследовании штаммов, циркулирующих в северном регионе Китая. Наименование генотипа происходит от места его первичного выявления - Пекина (Beijing). Для первоначальной характеристики данного генетического семейства были использованы две молекулярно-генетические методики: анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов IS6110 (RFLP) и спейсерное олигонуклеотидное типирование (сполиготипирование, spoligotyping) [89]. Филогенетический анализ с использованием макроэволюционных маркеров позволил установить существование двух основных сублиний штаммов Beijing: современной и древней [81]. На территории постсоветского пространства современная сублиния представлена преимущественно генетическими кластерами Beijing B0/W148 и Beijing 94-32, причем последний включает субкластер Beijing CAO (Central Asian Outbreak) [147-157].

Ключевым молекулярным отличием между сублиниями является структура локуса NTF: древние (предковые) штаммы характеризуются его интактностью, тогда как современные варианты содержат одну или две инсерции IS6110 [204]. Древняя сублиния, в свою очередь, подразделяется на ранний (RD181[+]) и поздний (RD181[-]) древние типы [29].

Глобальные молекулярно-эпидемиологические исследования демонстрируют преобладание современной сублинии Beijing над древними вариантами [92]. Уникальную ситуацию представляют Япония и Корея, где до 80% популяции составляют штаммы древней сублинии [95, 103]. При этом, несмотря на детальную изученность российской популяции штаммов генотипа Beijing в целом, информация о распространенности древних сублиний остается ограниченной.

Стоит отметить, что популяция возбудителя туберкулеза в России имеет свои региональные особенности. В одном исследовании показано, что в структуре популяции преобладают штаммы генетического семейства Beijing (до 60 % случаев), для которых доказаны большая вирулентность по

сравнению с другими генетическим семействами и более строгая ассоциация с лекарственной устойчивостью [45, 60].

В Казахстане MIRU-VNTR-типирование показало, что большинство изолятов относится к семейству W-Beijing. Молекулярно-генетический анализ исследуемой выборки выявил ограниченное генетическое разнообразие изолятов, среди которых лишь три не принадлежали к доминирующему генетическому семейству W-Beijing: два относились к семейству LAM и один к семейству S. Преобладание штаммов W-Beijing, характеризующихся повышенной склонностью к формированию множественной и широкой лекарственной устойчивости (МЛУ и ШЛУ), может служить одним из ключевых факторов, обуславливающих рост распространенности ЛУ-ТБ в Республике Казахстан. [10, 55]. Комплексный молекулярно-генетический анализ, включающий полногеномное секвенирование, прогнозирование лекарственной устойчивости и эпидемиологическое генотипирование (*in silico* сполиготипирование, определение локусов RD и вставок IS6110), позволил получить новые данные о генетической вариабельности МЛУ/ШЛУ изолятов семейства LAM в Центральной Азии. В Казахстане были идентифицированы два генотипа семейства LAM (SIT42 и SIT42/LAM-RUS), ассоциированные с множественной и широкой лекарственной устойчивостью.

Формирование приобретенной лекарственной устойчивости у локальных изолятов семейства LAM представляет серьезную эпидемиологическую угрозу, потенциально снижающую эффективность стандартизированных терапевтических подходов в региональных программах борьбы с туберкулезом. Однако ограниченный объем собранных геномных последовательностей не позволяет достоверно установить происхождение и пути распространения исследуемых изолятов LAM. Для выявления генетических детерминант, определяющих патогенность и эпидемиологический потенциал изолятов LAM, необходимо проведение сравнительного анализа полученных данных полногеномного

секвенирования с другими циркулирующими изолятами сублинии LAM 4.3.3 [9].

Анализ эпидемиологической ситуации в Кыргызской Республике демонстрирует парадоксальную картину: несмотря на успешную реализацию стратегии DOTS и общее улучшение основных эпидемиологических показателей (заболеваемость, распространенность, смертность), в стране регистрируется высокий уровень случаев МЛУ-ТБ как среди гражданского населения, так и в пенитенциарной системе.

Распределение лекарственной чувствительности МБТ демонстрирует четкую зависимость от истории предшествующего лечения. Наибольшая доля чувствительных штаммов (52,2%) наблюдается среди впервые выявленных случаев, снижаясь до - 28,1% при рецидивах и достигая минимума (17,8%) у ранее леченных пациентов. При этом частота полирезистентных форм относительно стабильна: - 11,8% среди новых случаев, - 10,8% при рецидивах и 8,5% у ранее леченных пациентов. Особую тревогу вызывает высокая распространенность МЛУ-штаммов, составляющая - 21,9% среди новых случаев и демонстрирующая драматический рост до 49,2% при рецидивах и 64% среди ранее леченных пациентов [69].

Индонезия одна из восьми стран, на долю которых приходится две трети от общего числа случаев ТБ в мире с процентом 8,5% [191]. Университетский медицинский центр Гронингена внедрил технологии полногеномного секвенирования для быстрой идентификации различных бактерий. Результаты секвенирования клинических образцов легочного ТБ в Папуа (Индонезия) позволили внести данные для анализа эпидемиологии и эволюции развития ТБ, используются для мониторинга развития генных мутаций штаммов, связанных с устойчивостью к противотуберкулезным препаратам. Например, из данных полногеномного секвенирования стало известно, что большинство образцов, которые ранее были

идентифицированы как широкая лекарственная устойчивость, оказались штаммами с множественной лекарственной устойчивостью [129].

В современной научной литературе всё большее внимание уделяется роли микробиома в патогенезе различных заболеваний, включая туберкулёз лёгких [60]. Исследования последних лет сфокусированы преимущественно на сравнительном анализе бактериальных профилей дыхательных путей у пациентов с активной формой туберкулёза лёгких и здоровых индивидуумов [136, 141]. Методология изучения бактериального состава мокроты базируется на секвенировании специфического участка гена 16S рРНК. Примечательно, что у пациентов с локализованными формами туберкулёза лёгких наблюдается дисбаланс в таксономической представленности бактерий в мокроте, при этом общее биологическое разнообразие микробиома остаётся сохранным [203]. Данные наблюдения существенно расширяют наше понимание патофизиологических механизмов развития туберкулёзной инфекции.

Таким образом, проведенный обзор результатов исследований последних лет по секвенированию генома микобактерий ТБ позволит нам более рационально и эффективно использовать данный новый метод идентификации возбудителя ТБ.

1.3. Причины возникновения мутаций и влияние противотуберкулезных препаратов на развитие лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза

Проблема формирования ЛУ МБТ остается одним из ключевых вызовов современной фтизиатрии [42, 43, 176]. В настоящее время феномен резистентности к противотуберкулезным препаратам рассматривается как комплексное явление, реализующееся на двух взаимосвязанных уровнях: непосредственно в микобактериях туберкулеза и в инфицированных соматических клетках организма человека.

В современной фтизиатрии достигнуты существенные успехи в понимании факторов и механизмов, лежащих в основе формирования

лекарственной резистентности патогена [5, 71]. Однако клеточные механизмы, обуславливающие развитие устойчивости к ПТП на уровне соматических клеток хозяина, остаются малоизученной областью современной медицинской науки [18, 31, 93]. Эта проблема требует более глубокого исследования для разработки эффективных терапевтических стратегий. Данный аспект требует углубленного изучения для разработки новых терапевтических стратегий.

Изучение молекулярной архитектуры МБТ позволило расшифровать фундаментальные генетические механизмы, лежащие в основе формирования резистентности к противотуберкулезным препаратам. Ключевым открытием стала идентификация хромосомных мутаций как основного молекулярного субстрата развития лекарственной устойчивости у микобактерий [40, 30, 102].

Формирование лекарственной устойчивости у МБТ может происходить спонтанно в процессе их репликации. При этом развитие множественной лекарственной устойчивости путем спонтанных мутаций представляется маловероятным событием, поскольку отсутствует единый генетический локус, ответственный за данный фенотип, а мутации, обуславливающие резистентность к различным препаратам, возникают независимо друг от друга. В туберкулезном воспалении микробная популяция может достигать значительных размеров - до 10^7 микробных клеток. При воздействии противотуберкулезных препаратов происходит селекция резистентных штаммов, которые впоследствии становятся доминирующими в микробной популяции. Данный процесс особенно выражен у пациентов с обширным поражением легочной ткани, характеризующимся множественными кавернами [44, 53, 88].

Молекулярные механизмы формирования лекарственной устойчивости МБТ характеризуются специфическими генетическими нарушениями для каждого противотуберкулезного препарата. Формирование лекарственной устойчивости к ПТП происходит посредством различных генетических

механизмов. Развитие резистентности к аминогликозидным антибиотикам, таким как стрептомицин и канамицин, обусловлено генетическими альтерациями в генах *gpsL* и *grs*, которые влияют на транспорт через клеточную мембрану и взаимодействие с 16рРНК. В свою очередь, устойчивость к рифампицину возникает вследствие мутаций в гене *groV*, результатом которых является ингибирование РНК-полимеразной активности и, как следствие, нарушение процесса синтеза РНК [101, 116].

Генетические мутации микобактерий туберкулеза могут индуцировать развитие резистентности к любому противотуберкулезному препарату, однако вероятность формирования такой устойчивости существенно варьирует в зависимости от специфических характеристик лекарственного средства. Примечательно, что рифампицин, обладающий выраженной противотуберкулезной активностью, характеризуется наименьшей вероятностью развития к нему резистентности [98, 119, 169, 196].

Важно отметить, что мутации, обуславливающие лекарственную устойчивость, не предоставляют микобактериям селективного преимущества в отсутствие воздействия соответствующего противотуберкулезного препарата. Селективный отбор резистентных штаммов инициируется только при контакте микобактериальной популяции с антимикробным агентом [1].

Частота возникновения спонтанных мутаций в геноме микобактерий туберкулеза демонстрирует универсальный характер, не зависящий от географического положения или региональных особенностей. Этот фундаментальный биологический показатель остается константным в глобальном масштабе. Следовательно, наблюдаемые различия в распространенности резистентных форм туберкулеза между странами следует интерпретировать не как результат региональных особенностей мутационного процесса, а как индикатор эффективности реализации национальных противотуберкулезных программ. Высокая частота лекарственно-устойчивых форм в отдельных странах свидетельствует о недостатках в организации противотуберкулезных мероприятий [38, 177].

Развитие лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза тесно связано с нерациональной антибактериальной терапией, особенно при использовании монотерапевтического подхода. При назначении единственного эффективного противотуберкулезного препарата наблюдается селективный процесс: чувствительные микобактерии быстро элиминируются, в то время как резистентные штаммы получают преимущество для размножения. Этот процесс селективного отбора приводит к формированию лекарственно-устойчивой популяции возбудителя в течение нескольких недель монотерапии. Более того, последующая замена одного препарата на другой способствует селекции штаммов с множественной лекарственной устойчивостью [105, 179].

Эффективность противотуберкулезных препаратов существенно варьирует в зависимости от метаболического состояния различных субпопуляций микобактерий. Особую проблему представляют "дремлющие" или "латентные" субпопуляции, которые демонстрируют устойчивость ко всем известным противотуберкулезным средствам. Показательным примером метаболической зависимости антимикробного действия является пиразинамид, активность которого проявляется исключительно в кислой среде. В условиях монотерапии такие метаболические особенности создают благоприятные условия для селективного выживания лекарственно-устойчивых мутантов в популяциях с измененным метаболизмом [175].

Среди противотуберкулезных препаратов изониазид демонстрирует наиболее раннее проявление бактерицидной активности. В первые 48 часов терапии наблюдается селективное преимущество изониазид-резистентных мутантов. Несмотря на то, что при непрерывном лечении этот краткосрочный эффект нивелируется, прерывистый характер терапии создает условия для накопления устойчивых штаммов. В частности, если двухдневный курс лечения прерывается, а затем возобновляется на аналогичный период, происходит прогрессирующее увеличение популяции изониазид-

резистентных мутантов к завершению каждого терапевтического цикла [106, 150, 175].

Феномен субингибирующих концентраций противотуберкулезных препаратов представляет серьезную проблему в терапии туберкулеза, поскольку эти концентрации способны лишь временно подавлять рост микобактерий, но не обеспечивают их полную элиминацию. В таких условиях происходит селективный отбор резистентных штаммов: в то время как чувствительные микобактерии замедляют свой рост, устойчивые варианты продолжают активно размножаться. Формирование субингибирующих концентраций может быть обусловлено различными факторами: неадекватным дозированием препаратов, нарушением режима приема лекарственных средств пациентом или нарушениями абсорбции в желудочно-кишечном тракте. Особую проблему представляют фармакокинетические особенности противотуберкулезных препаратов: асинхронность в достижении терапевтических концентраций различными компонентами комбинированной терапии может создавать эффект функциональной монотерапии [120, 145].

После прекращения приема противотуберкулезных препаратов сохраняется их остаточное ингибирующее действие, продолжительность которого варьирует в зависимости от фармакологических особенностей конкретного лекарственного средства [149, 153, 166].

Нерациональная тактика противотуберкулезной терапии может приводить к феномену амплификации лекарственной устойчивости - прогрессирующему усилению резистентности микобактерий вследствие кумулятивного накопления генетических мутаций [13, 14, 53, 181].

Эпидемиологический анализ позволил выделить несколько ключевых групп риска по развитию лекарственно-устойчивого туберкулеза. К ним относятся лица, имеющие контакт с больными резистентными формами заболевания, контингент пенитенциарной системы, мигранты, лица без определенного места жительства, лица с алкогольной и наркотической

зависимостью, а также пациенты с иммунодефицитными состояниями [110, 151, 193, 208, 211]. Наряду с фактором контакта, существенное значение в развитии лекарственной устойчивости имеет предшествующая неадекватная химиотерапия, особенно в случаях нарушения режима лечения. Среди множества потенциальных факторов риска статистически достоверную значимость продемонстрировал только один - прерывание курса терапии продолжительностью 90 дней и более, что позволяет рассматривать его как ведущий предиктор развития множественной лекарственной устойчивости [41, 76, 85, 163,].

1.4. Вопросы идентификации туберкулёзных и нетуберкулёзных микобактерий

В семействе *Mycobacteriaceae* род актиномицетов *Mycobacterium* занимает особое положение, включая уникальную группу микроорганизмов с характерными биологическими свойствами. Ключевыми особенностями этих бактерий являются аэробный метаболизм, отсутствие подвижности, способность к грамположительному окрашиванию, а также специфическая устойчивость к воздействию кислот и щелочей при применении карболового фуксина [16, 64,].

Род *Mycobacterium* характеризуется значительным таксономическим разнообразием, насчитывая порядка 200 различных видов, подвигов и комплексов, при этом таксономическая структура продолжает расширяться за счет идентификации новых представителей [173]. Историческое значение данного рода определяется тем, что его представители являются возбудителями двух древнейших заболеваний человечества - проказы (*Leprosae*) и туберкулеза, которые на протяжении тысячелетий были причиной неисчислимых человеческих страданий и смертей [6, 32, 107].

В современной микробиологии принято разделять микобактерии на две ключевые группы по их морфологическим и биохимическим характеристикам: атипичные микобактерии и типичные, являющиеся классическими возбудителями туберкулёза у человека и животных [33].

Комплекс *Mycobacterium tuberculosis complex*, представляющий группу типичных микобактерий, объединяет семь основных патогенных видов: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* и *M. microti*, каждый из которых способен вызывать туберкулёзную инфекцию у различных хозяев [161]. Принципиальной особенностью микобактерий туберкулеза (МБТ) является их строгая патогенность для человека, отсутствие природных резервуаров и аэрозольный механизм передачи [37].

НТМБ, подобно МБТ, способны вызывать поражение различных органов и систем, однако наиболее характерными клиническими формами являются легочные инфекции, лимфаденит и инфекционные поражения кожи и мягких тканей [2].

К «атипичным микобактериям» или НТМБ относят вездесущие сапрофитные и потенциально патогенные виды, вследствие естественной устойчивости к стрессовым условиям, таким как высушивание, голодание, экстремальные температуры и pH, воздействие хлора, а также устойчивость к противомикробным препаратам [161]. Общеизвестно, что НТМБ широко распространены в окружающей среде и представляют собой новую причину распространения инфекционных заболеваний во всем мире [48]. Экологической особенностью НТМБ является их широкое распространение в природных условиях: они колонизируют различные экологические ниши, включая почву, водоемы, сельскохозяйственные угодья и пастбища. Эта способность к повсеместному распространению в окружающей среде обусловила их альтернативные наименования: потенциально патогенные микобактерии окружающей среды или убиквитарные (вездесущие) микобактерии. [65]. Их замечательная естественная устойчивость к дезинфицирующим средствам и антибиотикам и способность выживать в условиях с низким содержанием питательных веществ позволяет НТМБ колонизировать и сохранять в искусственных средах, таких как системы распределения воды в домашних условиях и больницах [28]. Это совпадение между средой человека и НТМБ открыло новые возможности для

воздействия на человека и для выражения, часто игнорируемого и недооцениваемого патогенного потенциала.

Исторически виды в роде *Mycobacterium* классифицировались в зависимости от скорости роста колоний в субкультуре как быстрорастущие (видимый невооруженным глазом рост менее 7 дней) и медленно растущие (видимые невооруженным глазом рост более 7 дней), а также по производству пигментов как скотохромогенные (о бактериях, образующих пигменты в темноте), фотохромогенные (образование пигментов связано с воздействием света) или нехромогенные [39, 161, 108]. Обычно это разделение основано на интервале образования колоний субкультурой на твердых средах [7, 20]. Однако мало известно о скорости роста НТМБ в жидких бульонных средах [21, 34, 50].

Быстрорастущие НТМБ у видов *M. abscessus* являются патогенными микроорганизмами, которые вызывают различные заболевания, включая кожные и респираторные инфекции [109, 133]. Зарегистрированные вспышки МБЛ у хирургических пациентов в Бразилии с 2004 по 2009 годы и у пациентов с муковисцидозом в Соединенном Королевстве (Великобритания) в 2006-2012 годах подчёркивают необходимость изучения генетического разнообразия клинических штаммов *M. abscessus* [104].

Пациенты с лёгочными поражениями *M. abscessus* были в основном стройными, пожилыми женщинами, некурящими и имели ранее существующие заболевания лёгких [162].

Высокопатогенные виды быстрорастущих микобактерий — это комплексы *M. chelonae* и *M. abscessus* являются уникальными [80]. Позже стало известно, что *M. abscessus* complex состоит из 3 подвидов: *M. abscessus*, *M. bolletii* и *M. massiliense* [161]. Однако в настоящее время доказано, что единый таксон объединяет *M. massiliense* и *M. bolletii*, как *M. abscessus* subsp. *bolletii* и *M. abscessus* subsp. *massiliense* [161]. Используя новые геномные методы, стало ясно, что 3 подвида группы *M. abscessus* следует рассматривать как отдельные виды [92, 128]. Помимо специфической

идентификации, эти высокопроизводительные наборы данных секвенирования генома были чрезвычайно полезны для понимания эпидемиологии инфекций, связанных с наличием быстро растущих микобактерий, в верификации диагноза и в понимании патогенеза специфической патологии [80, 113].

Этиологическая структура микобактериозов легких (МБЛ) у человека в современных условиях определяется преимущественно комплексом *M. avium*, включающим восемь видов медленно растущих нетуберкулезных микобактерий (НТМБ): *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimera*, *M. colombiense*, *M. arosiense*, *M. bouche-durhonense*, *M. marseillense* и *M. timonense* [161]. Особый интерес представляет внутривидовая дифференциация *M. avium*, включающая несколько подвидов с различной хозяйской специфичностью и эколого-географическими характеристиками. С клинической точки зрения наибольшую значимость имеет подвид *M. avium subsp. hominissuis*, являющийся основным этиологическим агентом МБЛ у человека [134].

В настоящее время описано более 40 видов НТМБ, которые могут явиться этиологическим фактором заболеваний лёгких, среди которых наиболее часто встречаются представители *M. avium complex* [161].

Среди оппортунистических патогенов особое место занимает комплекс *M. avium* (МАС), представленный медленно растущими кислотоустойчивыми микобактериями. Эти микроорганизмы, обладающие широким распространением в природной среде [7, 23], способны вызывать инфекционный процесс у различных биологических видов, включая человека, а также диких и домашних животных и птиц [80, 95, 96, 131, 151].

Комплекс "родственных" микобактерий включает различные штаммы с вариабельной патогенностью. Первоначально *M. avium* был известен преимущественно как этиологический агент "птичьего" туберкулёза и возбудитель спорадических инфекций у других животных [23]. В ходе дальнейших исследований были выявлены как высоковирулентные штаммы

M. avium, способные инфицировать кур, кроликов и человека [79], так и штаммы *M. intracellulare*, изначально считавшиеся непатогенными, но позднее продемонстрировавшие способность вызывать заболевания у животных и людей [82].

Среди подвидов *M. avium* в современной таксономической классификации особое клиническое значение приобрел подвид *hominissuis*, являющийся этиологическим агентом микобактериозов как у людей, в том числе с ВИЧ-инфекцией, так и у свиней. В отличие от него, подвиды *avium*, *silvaticum* и *paratuberculosis* характеризуются преимущественной тропностью к птицам и другим представителям животного мира [182].

Интересный факт опубликован Rowlinson M.C. с коллегами (2022), которые обнаружили, что эвапотранспирация (потенциал атмосферы для поглощения воды) предопределяет кластеризацию заболевания в районе, а давление пара (мера воды в атмосфере при данной температуре) предрасполагает распространённости лёгочных заболеваний, связанных с НТМБ [100].

Диагностика микобактериоза легких требует комплексного подхода: результаты микробиологической идентификации НТМБ должны рассматриваться в неразрывной связи с клинической картиной и данными рентгенологического обследования пациента. Только такой интегративный анализ позволяет достоверно верифицировать наличие легочной формы микобактериоза. [185]. Даже среди пациентов с положительной респираторной культурой на НТМБ, обычно ассоциированной с инфекцией лёгких, только 25-60% будут соответствовать критериям верификации лёгочной формы МБ [82].

Точность микробиологической диагностики основывается на строгом соблюдении трехэтапного алгоритма верификации, включающего: адекватный сбор биологического материала, применение корректных методов культивирования и точную видовую идентификацию выделенного микроорганизма. После получения качественных образцов в достаточном

количестве и успешного выделения культуры принципиальное значение приобретает точная видовая идентификация *Mycobacterium* [46]. В современной лабораторной практике традиционные методы идентификации, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, уступили место более совершенным технологиям - многолокусному секвенированию генов и масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией. [161].

Правильная идентификация видов становится всё более важной по мере того, как появляются данные об относительной склонности различных видов к вызыванию НТМБ заболевания лёгких. Например, в когорте пациентов с *M. avium complex*, выделенных из респираторных образцов, пациенты с *M. avium* или *M. intracellulare* были значительно (в 2-3 раза) более склонными к критериям для верификации лёгочных форм МБ, чем пациенты с *M. chimaera* [114]. Другие авторы обнаружили относительные различия в вероятности того, что *M. avium* и *M. intracellulare* или даже *M. avium subspecies* ассоциированы с лёгочной болезнью при выделении из респираторных образцов [155].

Раньше для идентификации микобактерий использовалась панель культуральных и биохимических тестов. Однако эти анализы трудоёмки или вообще не способны идентифицировать виды микобактерий. Кроме того, некоторые высокомерные виды (например, *M. haemophilum* или *M. genavense*) требуют особых условий роста (источник гемина или необычно кислый pH), что требует использования редко используемых и специальных сред, а также изысканное сотрудничество между клиницистом, запрашивающим тест и специалистом лаборатории, выполняющим тест [188]. Род *Mycobacterium* включает в себя строгие патогены, потенциально или оппортунистические патогены и непатогенные сапрофитные виды [143].

НТМБ, которые также называют оппортунистическими микобактериями, могут стать патогенными в определенных условиях. Колонизация может определяться отсутствием иммунной реакции хозяина,

тогда как в случае инфекции хозяин может ответить реакцией на кожную реакцию или продукцию антител, но без проявления болезни [86].

Потенциально патогенные нетуберкулёзные микобактерии (НТМБ), занимающие промежуточное положение между высоковирулентными патогенами (*M. tuberculosis complex* и *M. leprae*) и сапрофитами [94], приобретают всё большую клиническую значимость как возбудители микобактериозов [162, 202]. Точная оценка распространённости микобактериозов в глобальном масштабе затруднена ввиду отсутствия систем официальной регистрации этих заболеваний. Однако локальные исследования демонстрируют отчётливую тенденцию к росту заболеваемости: так, исследование Побегалова О.Е. и соавт. (2020) показало, что в Санкт-Петербурге за период 2006-2013 гг. доля НТМБ среди выделенных микобактерий возросла с 0,3 до 2%, а заболеваемость микобактериозами увеличилась в 18 раз - с 0,3 до 0,73 на 100 000 населения [20]. НТМБ характеризуются широким спектром патогенности для различных организмов. В человеческой популяции они способны вызывать разнообразные клинические проявления [139, 164], преимущественно поражая лёгочную систему [186], хотя возможны и экстрапульмональные формы заболевания [174]. Особую озабоченность вызывает восприимчивость к НТМБ-инфекциям лиц с иммунодефицитными состояниями [111], а также возможность инфицирования в детском возрасте [144]. В ветеринарной практике НТМБ представляют значительную проблему для птицеводства (*M. avium complex*), животноводства и аквакультуры [132], причём документированы случаи существенного экономического ущерба от *M. marinum* на рыбоводческих фермах [159].

Для определения уровня НТМБ на видовом уровне малозатратные методы с низким разрешением включают в себя фенотипическую и биохимическую типизацию, которые имеют возможность только видовой идентификации. Однако, когда клинические и экологические изоляты

выделяются только на уровне вида, выводы следует формулировать с осторожностью [87, 124, 138].

Для лабораторной диагностики НТМБ специалистами Московского Научно-практического центра борьбы с туберкулёзом разработан многоступенчатый алгоритм исследования. Методология включает первичное одновременное выращивание биоматериала как на плотных, так и на жидких питательных средах. Для повышения точности диагностики и выявления смешанных культур проводится дополнительное субкультивирование на агаровой среде 7Н11, что также позволяет при необходимости осуществить видовую идентификацию классическими микробиологическими методами [35, 51].

Интересные данные получили Стерликов С.А., и соавт. (2021), по данным исследований, проведенных в ряде областей Российской Федерации. В исследовании авторы использовали пробирки системы ВАСТЕС MGIT с ростом культуры микобактерий. Для идентификации микобактерий использовались тесты GenoType Mycobacterium (Hain Diagnostika, Nehren, Germany). Испытание на восприимчивость к лекарственным препаратам проводили с помощью системы MGIT 960. Всего было обработано 1745 системных положительных пробирок MGIT 960. Комплекс МБТ составлял 67,45% выделенных проб, 30,83% были НТМБ, 0,17% были *M. bovis* - BCG и 1,55% не были идентифицированы до видового уровня. Среди лёгочных НТМБ в основном выявлялись *M. fortuitum* (45,71%), *M. abscessus* (26,21%) и *M. intracellulare* (10,41%) [4].

Существует несколько типов анализов, которые легко и правильно идентифицируют микобактерии из культуры. Одна из схем идентификации микобактерий, включает мультиплексный анализ ПЦР в реальном времени. Схема состоит из 3 ступенчатых ПЦР. При подобном подходе, авторами было обнаружено 1136 изолятов МБТ и 618 изолятов НТМБ [73].

Akalu G.T. и другие (2022) изучили клиническую пользу ПЦР посредством GeneXpert для дифференциальной диагностики ТБ и НТМБ в

199 формалинообработанных, парафинированных образцах лёгочной ткани, которая характерна для хронического гранулематозного воспаления. Выявили МБТ в 137 образцах, 17 случаев НТМБ и 45 других случаев, отличных от микобактерии. Микобактерии были идентифицированы путем кислотостойкого окрашивания в 50 из 154 случаев (32,5%). Все 50 случаев с положительным окрашиванием в кислой области показали позитивные результаты ПЦР [123]. Подобный подход рекомендует и ряд других исследователей [81, 107, 110, 144].

Современные подходы к молекулярно-генетической идентификации нетуберкулёзных микобактерий (НТМБ) базируются на детекции специфических генетических маркеров, включая микобактериальный ген *hsp65* и характерный для микобактерий туберкулёза ген IS6110. Для детального исследования геномного полиморфизма и популяционной структуры штаммов *M. avium* применяется комплексный подход, сочетающий VNTR-типирование, основанное на анализе переменных тандемных повторов, с RFLP-типированием, использующим инсерционные последовательности IS1245 и IS1311 [95]. ПЦР анализ гена *hsp65* также подтвердил наличие генов МТВ у 2 из 3 пациентов. Эти данные показывают, что ПЦР-амплификация и секвенирование микобактериального *hsp65* гена является чувствительным анализом для идентификации видов НТМБ в пунктатах лёгочной ткани [140, 194, 205, 209].

Тайвань является эндемическим регионом для ТБ, в этом регионе также увеличивается заболеваемость лёгочной инфекцией, вызванной НТМБ. Исследователями из этой страны были идентифицированы 24 пациента с подтвержденными лёгочными НТМБ. Эти пациенты были гистологически классифицированы на 4 типа: фиброзно-кавернозный (n=10), узловой бронхоэктатический (n = 4), саркоидный (n = 6) и другие (n = 4). Обычно фиброзно-кавернозный тип (90%) развивается в верхних долях ранее леченных пациентов с предшествующими заболеваниями лёгких. Узловой бронхоэктатический тип имел место главным образом в средней доле

женщин среднего возраста без предшествующих заболеваний лёгких. Саркоидный тип обычно ассоциировался с *M. avium complex* инфекцией и развивался у женщин пожилого возраста [165, 187].

Conrad W.H. и другие (2017) на основе проведенных расчётов затрат на диагностику и идентификацию НТМБ в Соединенных Штатах Америки в период с 2001 по 2014 годы рекомендовали также указанную методологию [152].

Молекулярные методы, используемые для характеристики НТМБ на уровне штамма, включают высокоэффективную жидкостную хроматографию, повторяющуюся ПЦР, ПЦР с произвольной амплифицированной полиморфной ДНК, гель-электрофорез с импульсным полем для выделения больших фрагментов рестрикции, полиморфизма длины фрагмента рестрикции, амплифицированного полиморфизма длины фрагмента, частичное секвенирование гена и мультиплексная ПЦР [158, 210].

Тетраплексная полимеразная цепная реакция (Т-ПЦР) была разработана для одновременной амплификации 4 хорошо известных ДНК-мишеней МБТ. Было обнаружено, что специфичность была 100% в том, что она способна отличать МБТ и НТМБ во всех исследованных случаях [84, 122].

Диагностика микобактериоза легких (МБЛ) основывается на многократном выделении чистой культуры возбудителя с обязательной последующей видовой идентификацией [160, 146, 156, 190]. Дифференциальная диагностика НТМБ и МБТ осуществляется посредством стандартизированного алгоритма лабораторного исследования, включающего несколько последовательных этапов.

Рекомендуется придерживаться последовательности проведения культурально-биохимических и молекулярно-генетических исследований в лабораториях разных уровней, что значительно повышает диагностическую ценность используемых тестов [112, 117, 121, 125].

По данным Awuh J.A. и других (2017) высокоэффективный жидкостной хроматографический анализ миколиновых кислот и частичное генное секвенирование в комбинации для оценки окончательной идентификации видов НТМБ повышает уверенность в идентификации правильных видов [148].

Точная, быстрая микробиологическая диагностика ТБЛ и других микобактериальных инфекций начинается с надлежащего сбора образцов и быстрого транспорта в лабораторию. Для обеспечения сбора наилучшего возможного образца медицинский работник должен быть надлежащим образом подготовлен, а пациент предоставил четко представленные и полностью понятные инструкции для сбора мокроты и других образцов для получения качественного образца с достаточным объемом и для предотвращения заражения НТМБ [6].

По данным исследования Владимировой Е.Б. и соавторов (2019), применение молекулярно-генетических методов Genotype рекомендуется как эффективный инструмент для оптимизации диагностики как лекарственно-устойчивых форм ТБ, так и микобактериозов [32].

В масштабном исследовании Tateishi Y. и соавторов (2021) с применением метода Genotype MTBDRplus была обследована когорта из 612 пациентов, включавшая 595 случаев ТБЛ (512 впервые выявленных и 83 рецидива) и 17 случаев легочного микобактериоза. При анализе видового состава НТМБ оба метода показали преобладание *M. avium* (47,1%) и *M. intracellulare* (23,5%) [99].

Исследование Cowman S. с соавторами (2019) представило оптимизированный протокол идентификации НТМБ. Методология базируется на использовании мокроты в качестве основного диагностического материала с последующим применением комбинированного культивирования на двух типах сред: плотной яичной среде Левенштейна-Йенсена и жидкой среде в системе ВАСТЕС MGIT 960. Идентификация НТМБ проводилась путём микроскопического исследования

с окраской по Цилю-Нильсену с последующим выполнением стандартизированных культуральных и биохимических тестов. Дополнительная молекулярно-генетическая верификация осуществлялась с помощью специализированного диагностического набора GenoType Mycobacterium CM производства компании Hain LifeScience (Германия) [161].

В лаборатории Красноярского противотуберкулёзного диспансера проведены микробиологические исследования штаммов НТМБ, изолированных от пациентов с впервые диагностированным туберкулёзом лёгких. Культивирование осуществлялось на элективной среде Левенштейна-Йенсена с добавлением салицилата натрия. Видовая идентификация НТМБ проводилась согласно стандартизированной методике (Приказ МЗ РФ от 21.03.2003, приложение №8 к Приказу МЗ РФ от 22.11.95 г. №324), основанной на оценке скорости роста, пигментообразования и температурного оптимума роста (22, 28 и 37°C). Применение данного диагностического алгоритма позволило установить, что доля НТМБ среди всех выделенных микобактерий составляла от 0,07 до 0,64% [6].

Наибольшую эффективность продемонстрировала жидкая среда Миддлбрука 7Н9, обеспечивающая не только максимальный выход культур, но и существенное сокращение времени детекции роста: в 1,9 раза по сравнению с яичной и в 1,5 раза по сравнению с агаровой средой [33].

Результаты исследования продемонстрировали значимое преимущество комбинированного использования различных типов питательных сред: применение плотных сред в дополнение к жидким обеспечивает выделение до 10% дополнительных изолятов, что научно обосновывает необходимость их совместного использования в диагностическом процессе. Важным наблюдением стало обнаружение возможности присутствия нескольких видов микобактерий в клинических изолятах, полученных как на жидких, так и на плотных средах [33].

Исследование лекарственной устойчивости НТМБ к противотуберкулезным препаратам, проведенное Камалиевой Ю.Р. и соавторами (2021) на базе Национального центра проблем туберкулеза Республики Татарстан, включало молекулярно-генетическую идентификацию культур с использованием метода GenoType®MycobacteriumCM/AS. Из 412 исследованных культур было выделено 68 изолятов НТМБ, причем 58 из них представляли медленно растущие формы с следующим видовым распределением: *M. celatum* - 54 изолята, *M. avium* - 2, *M. malmoense* - 1 и *M. lentiflavum* – 1 [17].

Клиническая значимость различных видов НТМБ существенно варьирует. Так, *M. gordonae* и *M. simiae* преимущественно вызывают колонизацию респираторного тракта и лишь в исключительных случаях могут выступать в качестве этиологического фактора инфекционного процесса [133]. В противоположность этому, выделение *M. kansasii* и *M. szulgai* из респираторных образцов практически всегда коррелирует с наличием выраженной клинической симптоматики заболевания [63]. В некоторых случаях болезнь лёгких может быть диагностирована на основе одной положительной культуры для этих организмов (особенно *M. kansasii*). Напротив, существуют также НТМБ, такие как *M. simiae* и *M. fortuitum*, которые обычно не являются респираторными патогенами, если диагностические критерии МБ соблюдены [65]. Наконец, существуют такие виды НТМБ, как *M. gordonae* и комплекс *M. terrae*, которые почти всегда представляют собой контаминацию (загрязнение) респираторных образцов [28].

По данным ряда авторов, методы гибридизации нуклеиновых кислот AccuProbe (Hologic Gen-Probe Inc, San Diego, CA) также позволяют быстро идентифицировать комплекс *M. tuberculosis*, *M. avium* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae* и *M. kansasii* в течение 2 часов после обнаружения роста в культуре, так как они не включают амплификации [2]. Авторы описывают перекрестное взаимодействие комплекса AccuProbe МТВ с

изолятами типа *M. celatum* или *M. terrae* в случаях, когда тест не проводился при соответствующей температуре гибридизации (между 60 и 61° С, а не 60 ± 1° С). Сообщалось также, что в редких случаях некоторые штаммы *M. gordoniae* и *M. kansasii* могут быть ложно отрицательными с AccuProbe. Это оговорку следует учитывать, когда другие анализы приводят к идентификации изолята, такого как *M. gordoniae* или *M. kansasii*. Пробы, основанные на выделении ДНК / РНК обычно способны также идентифицировать микобактерии в загрязнённых жидких культурах в зависимости от степени заражения, поскольку они обладают чувствительностью и специфичностью почти в 100% [27].

Maurer F.P. и соавт. (2019) и другие исследователи указали на потенциальную неадекватность неселективных методов идентификации, таких как анализы ДНК-зондов гибридизации, мультиплексную ПЦР гена 16S рРНК или анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов (PRA) для близкородственных видов НТМБ, таких как *M. intracellulare* и *M. chimaera* [104]. Их исследование поддерживает идею о том, что слияние микобактерий в группы или комплексы заслонит уникальные характеристики, такие как их экология, эпидемиология, вирулентность и даже восприимчивость к антимикробным агентам. Было также показано, что метод Invader (Third Wave Technologies, Madison, WI) является надёжным методом гибридизации для быстрого выявления изолятов микобактерий. Этот анализ может точно различать различия в одной базе и может измерять непосредственно на геномной ДНК без предварительной амплификации с использованием изотермических условий. Данный анализ позволил правильно идентифицировать в общей сложности 888 клинических и эталонных штаммов и идентифицировать 116 (95,1%) 122 положительных жидких культур системы MGIT 960 в течение 4 часов [107].

В исследовании Старковой Д.А. и соавторов (2020) большинство пациентов (71%) имели только одну положительную НТМБ-культуру, и только у 2 пациентов (3%) с изолятами *M. abscessus* после завершения

терапии ТБ отметили прогрессирующую лёгочную форму МБ. Авторы использовали серологический тест, основанный на наборе иммуноферментного анализа, который обнаруживает антитело IgA сыворотки к антигену гликопептидолипидного ядра, характерный для *M. avium complex* [7].

Встречаются сведения, что повсеместность НТМБ делает их частыми контаминантами [63]. Для микробиологического подтверждения лёгочной формы МБ пациенты нуждаются по меньшей мере в двух отдельных культурально-позитивных образцах, одной культуре - положительной бронхоальвеолярной промывке или одном положительном микробиологическом образце в сочетании с гистологическим подтверждением инфекции НТМБ. Однако, чтобы отличить лёгочную формы МБ от колонизации НТМБ, может потребоваться длительное наблюдение, включающее в комплекс верификации клиническое и рентгенологическое подтверждение болезни [199].

В системе здравоохранения Республики Беларусь внедрен комплексный подход к лабораторной диагностике нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), основанный на применении современных молекулярно-генетических методов исследования [38]. Диагностический алгоритм включает многоступенчатую оценку микробиологических характеристик, охватывающую морфологию колоний, особенности пигментообразования и результаты культивирования на специализированных средах [91].

Макарова М.В. и Гунтупова Л.Д. (2020), используя указанные методы у 40 пациентов диагностировали МБ лёгких (*M. avium complex* – 35%, *M. kansasii* – 25%, *M. xenopi* – 20%, *M. fortuitum* – 12,5% и *M. chelonae* – 7,5%). У 95% больных отмечена выраженная клиническая симптоматика с полиморфными рентгенологическими проявлениями. Отметили постоянное и массивное выделение НТМБ. Так, люминесцентной микроскопией кислотоустойчивые микобактерии выявили из мокроты у 62,5% больных, у

22,5% обнаружены также в бронхоальвеолярной лаважной жидкости. Посевы мокроты на жидкой питательной среде позволили выделить НТМБ у 65%, в том числе у 50% 2 раза и более. На плотной питательной среде культуры НТМБ выделены из мокроты у 45%, в том числе у 20% 2 раза и более [33].

Таким образом, несмотря на многообразие подходов и методов идентификации НТМБ, многие исследователи рекомендуют строго придерживаться следующих принципов: адекватный сбор образцов, правильные методы выращивания и точная идентификация микроорганизма [3, 12, 25, 26, 47, 57, 58, 66].

В современном понимании рецидив и реинфекция рассматриваются как равнозначные механизмы реактивации ТБ, однако их относительный вклад существенно варьирует в различных эпидемиологических условиях. Так, эпидемиологическое исследование, проведенное в Лондоне в 2015 году, продемонстрировало преобладание случаев реинфекции [127], тогда как исследование в Камеруне выявило доминирование рецидивов [168].

Наблюдаемая вариабельность может быть обусловлена несколькими факторами. Хронологически рецидивы имеют тенденцию к более раннему возникновению по сравнению со случаями реинфекции [54]. При этом необходимо учитывать возможность недоявления и недостаточной верификации случаев реинфекции [68]. Особого внимания заслуживает контингент ВИЧ-инфицированных пациентов, характеризующийся повышенным риском как прогрессирования латентной инфекции в активное заболевание, так и развития реинфекции.

Критериями клинического выздоровления при туберкулезе являются наличие минимальных остаточных изменений в легочной ткани в сочетании с отсутствием бактериовыделения на протяжении трех месяцев после успешного завершения курса лечения [56].

Проблемы идентификации туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в разы усложняются у трудовых мигрантов. Об этом свидетельствуют многочисленные исследования из разных стран мира [12,

24, 26, 67, 84, 146].

Тем не менее некоторые авторы указывают на важность идентификации штаммов микобактерий среди мигрантов, что позволит верифицировать региональные их особенности [98, 173, 178, 191, 195, 211].

Быстрые молекулярные методы исследования стали основой современной лабораторной диагностики туберкулёза, как при первичном выявлении заболевания, так и при его реактивации [22, 184]. Молекулярно-генетический метод GeneXpert МТВ/RIF, продемонстрировавший высокую диагностическую эффективность в многочисленных исследованиях, был рекомендован ВОЗ в качестве приоритетного метода диагностики [72, 207].

В современной лабораторной диагностике туберкулеза наиболее широкое распространение получили диагностические наборы ХАЙН Genotype для выделения и анализа ДНК микобактерий [28]. Несмотря на высокую стоимость и ограниченную доступность, методы секвенирования штаммов микобактерий туберкулеза предоставляют уникальную возможность детальной геномной и протеомной характеристики различных кластеров *Mycobacterium tuberculosis* [7, 51].

Применение технологий секвенирования генома позволяет проводить дифференциальную диагностику между случаями рецидива и реинфекции на основе анализа генетического разнообразия штаммов. При этом следует учитывать возможность выявления идентичных генотипов при реинфицировании. Особого внимания заслуживает тот факт, что хотя эндогенная реактивация и экзогенная реинфекция в равной степени участвуют в развитии рецидивов туберкулеза, случаи повторного заражения характеризуются более высокой вероятностью развития лекарственной устойчивости [90, 206].

В процессе дифференциальной диагностики между первичным туберкулезом и его реактивацией ключевое значение приобретает определение статуса инфицированности организма микобактериями туберкулеза [83]. Эффективность диагностики латентной туберкулёзной

инфекции во многом определяется качеством функционирования общей лечебной сети, что особенно важно при анализе данных о ранее проведенной профилактической химиотерапии [84, 169, 105]. Наличие коморбидных состояний, включая ВИЧ-инфекцию, сахарный диабет, ожирение и ХОБЛ, значительно увеличивает вероятность активации туберкулёзного процесса, что требует повышенного клинического внимания к данной категории пациентов [201].

С эпидемиологической точки зрения, ключевое значение имеет своевременная диагностика ТБЛ, вне зависимости от характера процесса - первичного или реактивации. Не менее важным аспектом эпидемиологического контроля является обеспечение максимального охвата выявления новых случаев заболевания [178].

В современных условиях временной интервал между снятием с диспансерного учета и развитием рецидива составляет в среднем 3 года [167]. При этом одним из ключевых факторов, способствующих развитию рецидивов, признается отсутствие адекватной противорецидивной терапии [172].

Исследование Meghji J. и соавторов (2020) выявило равнозначный вклад эндогенного рецидива и экзогенной реинфекции в развитие повторных случаев туберкулеза. При этом случаи реинфекции характеризуются более высокой вероятностью развития лекарственной устойчивости во время вторичного эпизода заболевания. Дифференциальная диагностика между рецидивом и реинфекцией приобретает ключевое значение для оптимизации стратегий контроля над туберкулезом. Особую настороженность вызывает проблема приобретенной лекарственной устойчивости при рецидивах, в частности, развитие резистентности к изониазиду при первичном эпизоде заболевания [163].

Несмотря на наличие обширных исследований факторов риска рецидива ТБ в различных группах пациентов [167], требуется проведение дополнительных научных исследований, фокусирующихся на

специфической когорте больных, перенесших МЛУ-ТБ. Особую значимость приобретают данные исследования, демонстрирующие, что в течение первых трех лет после успешного завершения лечения МЛУ-ТБ частота рецидивов достигает в среднем 10% [168].

Развитие нового эпизода туберкулеза возможно даже после успешного завершения полного курса химиотерапии и может быть обусловлено двумя различными механизмами: эндогенной реактивацией или экзогенной инфекцией. Дифференциальная диагностика между этими механизмами основывается на сравнительном анализе изолятов, выделенных при первом и втором эпизодах заболевания. Традиционно идентичность изолятов интерпретируется как свидетельство рецидива, тогда как выявление различных штаммов указывает на экзогенную реинфекцию. Однако следует учитывать, что в регионах с преобладанием определенного кластера штаммов туберкулеза существует вероятность повторного заражения идентичным изолятом, что может затруднять дифференциальную диагностику [163].

Результаты исследований в регионах с высокой заболеваемостью туберкулезом демонстрируют, что реинфекция является доминирующим механизмом развития рецидивов заболевания [127].

В рамках крупномасштабного исследования были проанализированы 1451 случай туберкулёза с положительным результатом посева, включающие как впервые диагностированные, так и повторные случаи заболевания. Среди обследованных пациентов у 30 был выявлен второй эпизод рецидива туберкулёза. Детальный анализ 23 случаев показал, что временной интервал между первичным заболеванием и рецидивом в среднем составлял 24 месяца [192].

В отличие от первичных случаев заболевания, диагностика рецидивирующего туберкулёза характеризуется более длительным периодом верификации, что создаёт повышенный риск передачи туберкулёзной инфекции в популяции [77]. При этом установлена четкая корреляция между неадекватным ведением первичного случая заболевания и последующим

развитием рецидива [115].

В контексте общей тенденции к снижению заболеваемости туберкулёзом обращает на себя внимание парадоксальный рост частоты рецидивов на 2%, зафиксированный в одном из исследований [78]. Научная дискуссия продолжается относительно роли классических факторов риска в развитии рецидивов заболевания, включая такие параметры как возраст, половая принадлежность и наличие деструктивных изменений при рентгенологическом исследовании грудной клетки [130, 198, 197].

В современной фтизиатрии исследование мокроты рассматривается как золотой стандарт оценки результативности противотуберкулёзной терапии. Однако на заключительных этапах лечения многие пациенты оказываются не в состоянии предоставить образцы мокроты для анализа, что вынуждает клиницистов опираться на данные рентгенографического исследования органов грудной клетки. При этом научные данные свидетельствуют об отсутствии строгой корреляции между положительной рентгенологической динамикой и элиминацией микобактерий [110], что обуславливает актуальность разработки более достоверных критериев оценки терапевтической эффективности.

Особую обеспокоенность вызывает проблема приобретенной лекарственной устойчивости при рецидивах туберкулеза, учитывая, что сам факт рецидива является фактором риска развития резистентности к противотуберкулёзным препаратам [97]. Исследования демонстрируют возможность эволюции изониазид-резистентного туберкулеза в множественно лекарственно-устойчивые формы при повторных эпизодах заболевания. При этом изониазид-резистентные формы характеризуются более высокой частотой неэффективного лечения и рецидивов по сравнению с лекарственно-чувствительным туберкулёзом [167, 130, 198, 180, 171].

Таким образом, наши научные исследования по идентификации штаммов микобактерий ТБ позволят раскрыть как часто в Таджикистане возникают реинфицирование или рецидив туберкулёзного процесса, что

позволит внести соответствующие изменения в программу борьбы с ТБ в Республике Таджикистан.

Резюме: проведенный аналитический обзор литературы, охватывающий 211 публикаций исследователей из ближнего и дальнего зарубежья позволяет раскрыть важное клиническое значение геномного секвенирования микобактерий туберкулеза, которое сводится к определению причин возникновения мутаций и влияния ПТП на развитие ЛУ-ТБ; идентификации туберкулёзных и нетуберкулёзных микобактерий; идентификации природы происхождения туберкулёза среди трудовых мигрантов; и идентификации вида реактиваций легочного процесса после перенесенного туберкулёза лёгких, чему и посвящены наши научные исследования.

В 2023 году противотуберкулёзная служба Таджикистана приобрела два аппарата секвенирования генома микобактерии ТБ, которые, согласно научным достижениям, имеют возможности дать ответ на все вышеуказанные вопросы. В настоящее время мы собираем для исследования выделенные ДНК от микобактерий ТБ по каждой из указанных ниже групп больных:

- Сравнительный анализ эпидемиологической ситуации по туберкулёзу (ТБ) в Республике Таджикистан выявляет значительное расхождение между национальной статистикой и оценками ВОЗ, указывающее на существенное недовыявление случаев заболевания, превышающее 30%. В контексте этой проблемы особую актуальность приобретает необходимость уточнения распространённости лекарственной устойчивости (ЛУ-ТБ) среди лекарственно-чувствительных форм ТБ (ЛЧ-ТБ) [14, 13, 70, 177].
- Внедрение современных диагностических технологий привело к выявлению специфической группы пациентов, демонстрирующих положительный результат микроскопии на кислотоустойчивой микобактерии (МБТ+), при отрицательных результатах молекулярно-генетических экспресс-тестов (GeneXpert MTB-RIF, Hain-test) на М.

tuberculosis. Данный феномен указывает на вероятное наличие заболеваний, вызванных нетуберкулёзными атипичными микобактериями (НТМБ). Однако отсутствие в стране технологической базы для идентификации НТМБ существенно затрудняет дифференциальную диагностику этих состояний [36].

Идентификация различных штаммов микобактерии ТБ позволило бы дифференцировать этиологические факторы ТБ у трудовых мигрантов и их семейных контактов [57, 58, 123, 181]. Другими словами, появится возможность ответить на дискутируемый в течение многих лет вопрос: заболел ли ТБ трудовой мигрант в стране миграции или же он уже был инфицирован, и трудовая деятельность в период миграции способствовала активации ТБ процесса [6, 62, 66, 94].

➤ Дифференцированная верификация рецидивов ТБ с реинфицированием микобактерией ТБ больных, ранее перенесших ТБ также всё ещё недоступна в Республике Таджикистан [11, 19].

В Республике Таджикистан научных исследований по изучению всех вышеперечисленных проблем не проводилось, так как не был внедрен метод верификации этих состояний.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Дизайн исследования включал:

1-й этап: Кросс-секционное исследование, направленное на изучение улучшения выявления вида микобактерий и спектра их лекарственной устойчивости с применением нового геномного секвенирования (340 образцов).

2-й этап: Кросс-секционное исследование, направленное на изучение эффективности верификации заболеваний лёгких, по клиничко-рентгенологической картине схожих с ТБ легких, но вызванных НТМБ и другими респираторными инфекциями (12 образцов НТМБ и 29 ХОБЛ), а также сполиготипирование штаммов МБТ с применением нового геномного секвенирования (299 образцов МБТК).

3-й этап: Когортное исследование, направленное на изучение эффективности лечения больных (81 больных с Рифампицин устойчивой формой ТБ и 259 больных с ЛЧ-ТБ, 12 больных с НТМБ и 29 больных с ХОБЛ).

Критериями включения больных в данное научное исследование были больные с заболеваниями лёгких, по клиничко-рентгенологической картине схожих с ТБ легких или вызванных НТМБ и другими респираторными инфекциями; а также больные с наличием верифицированной МЛУ/РУ-ТБ и в качестве сравнения эффективности лечения – больные с верифицированной формой ЛЧ-ТБ.

Для достижения цели и задач исследования нами был использован недавно собранный и архивированный в соответствии с лабораторными стандартными операционными процедурами биологический материал образцов микобактерий туберкулезного комплекса (МТБК) полученных от больных ТБ (мокрота, плевральная жидкость, гной, биоптат из лимфатических узлов, жидкость из брюшной полости, спинномозговая жидкость, индуцированная мокрота), поступивших из всех

противотуберкулёзных учреждений страны в 2023 году. Из общего числа исследованных образцов 20 были образцы внелегочной локализации: периферические лимфоузлы- 4, внутригрудных лимфоузлов - 2, костно-суставной - 6, плеврит - 4, абдоминальный - 1, мочеполовой системы – 3.

В данной работе мы использовали следующие определения форм ТБ:

МЛУ-ТБ - устойчивость к изониазиду и рифампицину;

пре-ШЛУ-ТБ – это туберкулез, который отвечает определению МЛУ-ТБ, или рифампицин-устойчивого ТБ, и дополнительно устойчив к фторхинолонам (левофлоксацину и моксифлоксацину);

ШЛУ-ТБ – сокращенное название туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью, то есть формы туберкулеза, вызываемой штаммом бактерий *M. tuberculosis*, обладающим устойчивостью к рифампицину в сочетании с устойчивостью к любому из фторхинолонов (левофлоксацину или моксифлоксацину) и по меньшей мере к еще одному препарату группы А (бедаквилину или линезолиду);

Тотальная устойчивость – подразумевает ШЛУ-ТБ с подтвержденной устойчивостью к препаратам первого и второго ряда, к фторхинолонам и к препаратам группы А.

Объектом исследования стали образцы из собранных образцов и культуры 340 больных, которые были исследованы новым методом геномной идентификации спектра лекарственной устойчивости микобактерий ТБ, отобранных случайным образом из числа образцов, поступивших в Национальную референс-лабораторию (НРЛ). Также нами была изучена эффективность лечения больных ЛУ-ТБ и МБ легких.

2.2. Изучаемые переменные

В ходе клинического обследования пациентов проведен комплексный анализ следующих параметров:

✓ Анамнестические данные включали детальную оценку эпидемиологического анамнеза (контакт с больными туберкулезом, наличие диспансерного учета как контактного лица), клинического

течения заболевания (дебют, выраженность интоксикационного синдрома, длительность периода от манифестации до госпитализации в специализированный стационар). Особое внимание уделялось анализу иммунопрофилактики (результаты туберкулинодиагностики, вакцинация БЦЖ, характеристики поствакцинального рубца и его влияние на развитие локальных форм туберкулеза), предшествующего лечения (включая химиопрофилактику) и данным предыдущих рентгенологических исследований.

✓ Объективное обследование включало тщательную пальпацию периферических лимфатических узлов с оценкой их размеров, локализации, консистенции и наличия патологических изменений (свищи, рубцы), а также классическое физикальное исследование органов грудной клетки методами перкуссии и аускультации.

✓ Комплексное бактериологическое исследование включало различные методы анализа биологического материала: микроскопию мазков мокроты и промывных вод бронхов (в том числе индуцированной мокроты), бактериоскопию с окраской по Циль-Нильсену, молекулярно-генетическую диагностику методом GeneXpert. Определение лекарственной чувствительности проводилось с использованием HUIIN-test, а также культуральными методами на жидких (MGIT-960) и плотных (Левенштейна-Йенсена) питательных средах.

✓ Динамическое рентгенологическое наблюдение осуществлялось с интервалом в 3 месяца и включало выполнение прямых и боковых рентгенограмм, томографическое исследование легких, при необходимости - боковые томограммы и компьютерную томографию.

✓ Всем участникам исследования, независимо от предшествующих результатов туберкулинодиагностики, проводилась внутрикожная проба Манту с использованием 2 ТЕ ППД-Л в объеме 0,1 мл стандартного разведения туберкулина.

Диагностика туберкулеза осуществлялась в соответствии с утвержденным алгоритмом, включающим многоступенчатый процесс лабораторного исследования. На первом этапе проводилось исследование мокроты с использованием молекулярно-генетических методов (GeneXpert MTB-RIF, Hain-test) и микроскопии.

Параллельно выполнялось культуральное исследование с использованием как плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена, так и жидких питательных сред. Заключительным этапом диагностического алгоритма являлось определение лекарственной чувствительности выделенных культур к ПТП первого и второго ряда с использованием системы ВАСТЕС MGIT 960.

Методы микроскопической диагностики микобактерий включают классическое окрашивание по Цилю-Нильсену, при котором кислотоустойчивые микобактерии приобретают красную окраску на синем фоне некислотоустойчивых микроорганизмов, и люминесцентную микроскопию с применением аурамина или аурамин-родаминового комплекса, где при ультрафиолетовом освещении микобактерии демонстрируют характерное ярко-желтое свечение на темном фоне.

Диагностическая чувствительность этих методов существенно различается: при использовании окраски по Цилю-Нильсену минимальный порог обнаружения составляет 5 000-10 000 микобактерий в 1 мл материала, тогда как люминесцентная микроскопия позволяет выявить около **1 000 микробных клеток в 1 мл**. Несмотря на относительно низкую чувствительность, метод Циля-Нильсена имеет важное эпидемиологическое значение, позволяя выявлять наиболее контагиозных пациентов.

Основными ограничениями микроскопических методов являются невозможность обнаружения микобактерий на ранних стадиях заболевания и отсутствие видовой дифференциации между *Mycobacterium tuberculosis* и другими микобактериями. Эти недостатки компенсируются применением культурального метода, обладающего значительно более высокой

чувствительностью (**20-100 микробных клеток в 1 мл**).

Mycobacterium tuberculosis характеризуется облигатным аэрибиозом, в то время как *Mycobacterium bovis* и *Mycobacterium africanum* являются аэрофилами. Оптимальная температура культивирования составляет 37-38°C. Медленный рост обусловлен особенностями клеточной стенки, богатой липидами, которые затрудняют метаболический обмен с окружающей средой.

Микроскопическое исследование, проводимое после получения положительных результатов молекулярно-генетического тестирования, служит двум основным целям: количественной оценке бактериовыделения и мониторингу эффективности проводимой терапии.

Методика прямой бактериоскопии включает последовательное окрашивание препарата по методу Циля-Нильсена с использованием следующих реагентов:

- карболовый раствор фуксина (первичное окрашивание),
- 5% раствор серной кислоты или 3% раствор солянокислого спирта (этап обесцвечивания),
- 0,25% раствор метиленового синего (заключительное окрашивание).

Микроскопический анализ окрашенных препаратов осуществляется с применением иммерсионной системы, что обеспечивает максимальное разрешение и достоверность результатов исследования (Рисунок 2.1.).

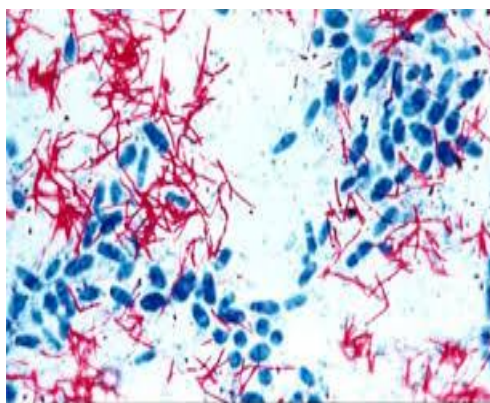


Рисунок 2.1. - Микобактерии под микроскопом (окраска по Цилю-Нильсену)

В современной диагностике туберкулеза применяются следующие

молекулярно-генетические методы:

Система Xpert MTB/RIF представляет собой автоматизированную платформу молекулярной диагностики, основанную на принципе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Данная технология позволяет в течение 2 часов провести детекцию ДНК микобактерий туберкулеза и выявить мутации, обуславливающие устойчивость к рифампицину, непосредственно в образцах мокроты (Рисунок 2.2.).

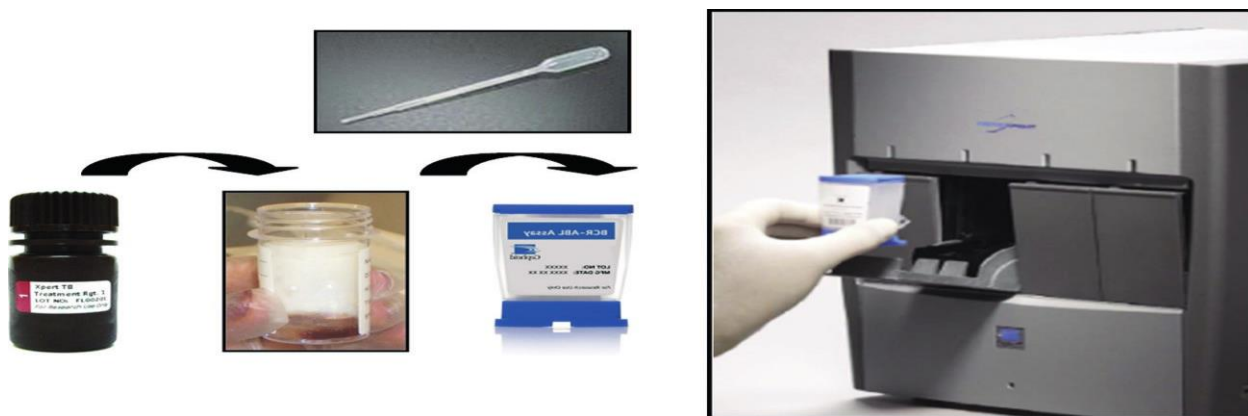


Рисунок 2.2. -Тестирование с использованием машины GeneXpert MTB/RIF LPA DR plus (Хайн тест к ППР) и LPA SL (Хайн тест к ПВР):

GenoType®MTBDR (Hain-тест, Life-science, Nehren, Germany) позволяет идентифицировать комплекс МБТ [26].

В настоящее время в Таджикистане внедрены усовершенствованные картриджи, способные определять устойчивость микобактерий к пяти противотуберкулезным препаратам.

GenoType®MTBDR (Hain-тест, Life-science, Nehren, Germany), включающий модификации LPA DR plus (для препаратов первого ряда) и LPA SL (для препаратов второго ряда), обеспечивает возможность идентификации комплекса МБТ [26].

Метод LPA DR plus представляет собой молекулярно-генетическую технологию, в основе которой лежит принцип гибридизации с типоспецифическими зондами. Данная методика обеспечивает экспресс-диагностику (в течение 48-72 часов) присутствия *M. tuberculosis* и

определение её устойчивости к ключевым противотуберкулезным препаратам - рифампицину и изониазиду. Исследование может проводиться двумя способами: путем непосредственного анализа образцов мокроты (прямой метод) или с использованием культуры микобактерий, полученной фенотипическим методом (непрямой метод).

LPA SL представляет собой высокоточный молекулярно-генетический метод диагностики, обеспечивающий быструю идентификацию МБТ и определение её резистентности к фторхинолонам и инъекционным препаратам второго ряда. Анализ может проводиться как с использованием образцов мокроты, так и культуральным методом. Особенно высокую диагностическую эффективность метод демонстрирует при исследовании образцов с положительным результатом микроскопии мазка (Рисунок 2.3.).

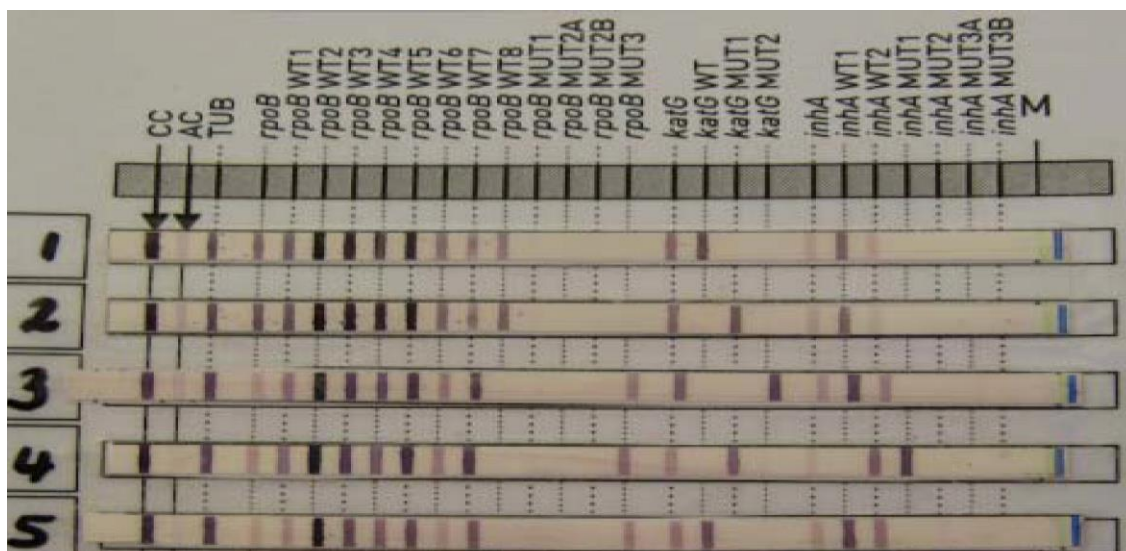


Рисунок 2.3.- Распечатка на принтере результата анализа Хайн-тест на идентификацию микобактерий

В диагностике туберкулеза важную роль играет культуральный метод исследования мокроты. В качестве основной питательной среды для культивирования МБТ используется твердая яичная среда Левенштейна-Йенсена, где первичный рост колоний наблюдается в интервале 4-8 недель.

Выделение чистой культуры микобактерий имеет ряд диагностических преимуществ. С помощью биохимических методов можно провести дифференциацию между МБТ и НМБТ, оценить их жизнеспособность,

вирулентность и определить чувствительность к противотуберкулезным препаратам. Метод также позволяет количественно оценить бактериовыделение по следующей шкале: скудное (до 10 колоний), умеренное (10-50 колоний), обильное (более 50 колоний).

Несмотря на существенный недостаток в виде длительности исследования (1-2 месяца), культуральный метод является обязательным для всех пациентов с подозрением на туберкулез, особенно при повторных отрицательных результатах микроскопии. Кроме того, он необходим для контроля качества микроскопического исследования и проведения тестов на лекарственную чувствительность и определения прекращения бактериовыделения.

В исследовании использовался автоматизированный микробиологический анализатор ВАСТЕС MGIT 960 - современная система для детекции МБТ и определения их лекарственной чувствительности. Методика основана на инновационном принципе флюоресцентной детекции: в процессе роста микробная популяция потребляет кислород из среды, что приводит к высвобождению флюоресцентного компонента, детектируемого при ультрафиолетовом облучении.

Культуральный метод (бакпосев) представляет собой фундаментальный диагностический подход, основанный на выращивании МБТ на специализированных питательных средах (Рисунок 2.4.).



Рисунок 2.4. - Технология ВАСТЕС MGIT 960

Данная методика служит ключевым инструментом в комплексной диагностике туберкулёза, позволяя не только подтвердить наличие возбудителя, но и осуществить его типирование, а также определить спектр лекарственной чувствительности выделенного штамма к противотуберкулёзным препаратам.

Диагностическая ценность метода заключается в возможности визуализации роста микобактериальных колоний на плотных питательных средах, который становится заметным после 3-4 недельного периода инкубации. При этом особое значение придается морфологической характеристике выросших колоний и их окраске, что позволяет провести количественную оценку интенсивности бактериального роста.

В случае обнаружения роста микобактерий проводится углубленное исследование полученного изолята с целью его точной видовой идентификации. Данный этап имеет принципиальное значение для дифференциации между микобактериями туберкулёзного комплекса (*M. tuberculosis*) и нетуберкулёзными микобактериями, что существенно влияет на дальнейшую тактику ведения пациента и выбор терапевтической стратегии при установлении диагноза микобактериоза.

В современной лабораторной диагностике определение профиля лекарственной чувствительности МБТ осуществляется двумя основными методологическими подходами. Первый подход базируется на использовании классического метода пропорций с применением плотной среды Левенштейна-Йенсена для выявления устойчивости к препаратам первого и второго ряда (ППР и ПВР).

Второй, более современный подход, реализуется с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT-960, представляющей собой комплексное решение для культуральной диагностики туберкулеза на жидких питательных средах. Данная система позволяет не только выявлять наличие микобактерий, но и определять их чувствительность к ПТП обеих линий. Процесс диагностики осуществляется путем помещения специальных

пробирок MGIT, содержащих исследуемый патологический материал, в инкубационную камеру прибора.

Особенностью системы ВАСТЕС MGIT-960 является непрерывный автоматический мониторинг флюоресценции с часовым интервалом. При достижении концентрации МБТ уровня 10⁵-10⁶ КОЕ/мл среды система автоматически регистрирует положительный результат, сопровождая его световой и акустической сигнализацией. В случае отсутствия роста микобактериальной культуры на протяжении 42 суток (шести недель) система классифицирует образец как отрицательный.

2.3. Метод секвенирования для идентификации неизвестных патогенов

Возможности: 1) можно тотально секвенировать все имеющиеся в материале нуклеиновые кислоты ДНК микобактерии туберкулеза (*WGS- whole genome sequencing*) (Рисунок 2.5.); 2) можно прицельно (таргетное секвенирование) прочитать только геном патогена, но перед этим нужно обогатить образец одним из известных способов; 3) можно провести фрагментное секвенирование, чтобы определить ключевые мутации и установить, относится ли наш патоген к эпидемически значимым или нет.

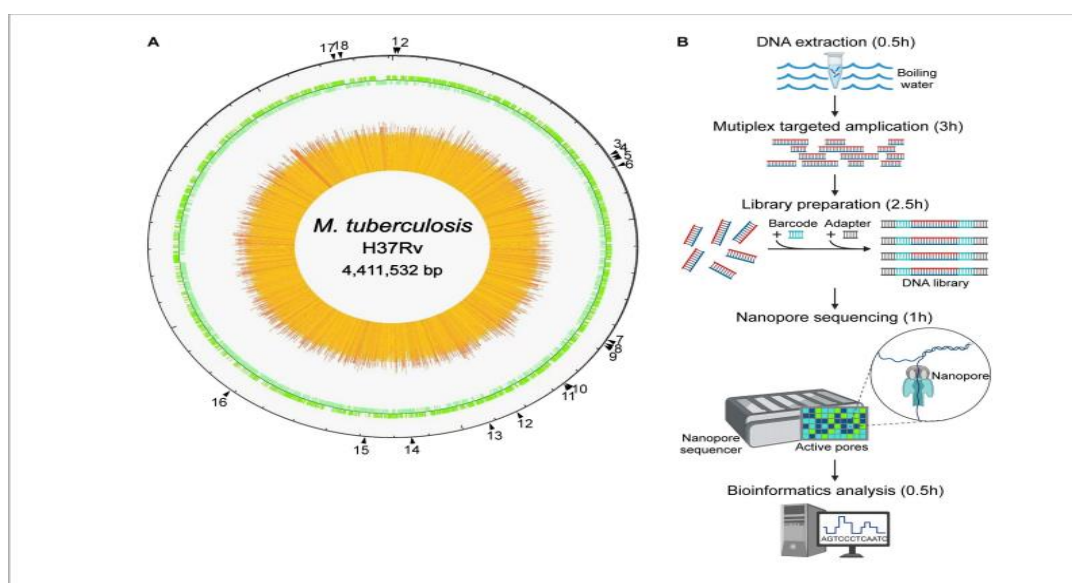


Рисунок 2.5. – Расшифровка ДНК микобактерии туберкулеза

Таргетный метагеномный анализ производится на основе ДНК-штрихкодов, например, 16S рРНК — для бактерий. Их можно секвенировать по отдельности короткими участками, а можно – длинную молекулу целиком. При этом, чем длиннее молекулу мы получим, тем точнее сможем определить таксономическое положение патогена. Технологии NGS (*next generation sequencing*) позволяют проводить массовое параллельное секвенирование миллионов фрагментов ДНК с высокой пропускной способностью (Рисунок 2.6.).

Платформа Oxford Nanopore Technologies
 Высокодифференцированные продукты как стимул для более широкого внедрения

Электронная сенсорная платформа обладает следующими возможностями:

- Доступность:**
MiniON от 1000 долл. США
Цена за Go от 2 до 3 долл. США
- Получение данных в режиме реального времени:**
Быстрая подготовка образца
Потоки данных в режиме реального времени
- Масштабируемость:**
Одна платформа, масштабируемая от Flongle до PromethION



Нативная ДНК/РНК, предоставляющая обширные данные:

- Из любой длины считываемого фрагмента:
От 20 оснований до 4 мегаоснований
- с высокой производительностью по следующим показателям:
Обнаружение однонуклеотидного полиморфизма (ОНП)
Обнаружение структурных вариантов (СВ)
Сборка
Фазирование
Полное метилирование

← Flongle MiniON GridION PromethION →

Рисунок 2.6. Возможности геномного секвенирования компании Oxford Nanopore Technologies (Великобритания)

Этапность метода секвенирования клинического материала на нанопоровом секвенаторе PromethION - приборе компании Oxford Nanopore Technologies (Великобритания) – ONT (Рисунок 2.6.):

1. Очистка геномной ДНК из лизированных клеток (после лизиса с GenoLyse VER 1.0) с помощью магнитных шариков AMPure XP на микроцентрифуге с роторами для 1,5 мл пробирок и ПЦР-стрипов/пробирок.

2. Приготовление ДНК библиотек для секвенирования и добавление баркодов путём центрифугирования в центрифуге на магнитном штативе для ПЦР-стрипов (на 8 пробирок) / 96-и луночных плашек с применением 8-и канальных дозаторов.

3. Измерение концентрации ДНК в библиотеке с использованием флуорометра Quantus.

4. Загрузка библиотеки в картридж одноканальными дозаторами.
5. Заполнение записи концентрации ДНК библиотек.
6. Запуск секвенирования на приборе MinION с картриджем через порт USB3.0 по программе MinKNOW
7. Промывка картриджа после секвенирования и его подготовка для хранения.
8. Запуск компьютерного анализа данных с применением программы Docker и EPI2ME

В основу диагностического процесса микобактериоза (МБ) положены официальные критерии, разработанные совместно Американским торакальным обществом и Американским обществом инфекционных болезней. Верификация диагноза базируется на двух ключевых компонентах: клинических проявлениях и микробиологическом подтверждении.

2.4. Клинические критерии диагностики

Для постановки диагноза необходимо одновременное присутствие следующих признаков:

- Визуализационные изменения (А, I): характерные узловые или полостные поражения на рентгенограммах грудной клетки, либо мультифокальные бронхоэктазы с множественными узловыми изменениями при компьютерной томографии высокого разрешения
- Клиническая динамика (А, I): прогрессирование респираторной симптоматики при исключении альтернативных легочных патологий.

2.5. Микробиологическая верификация

Ключевым диагностическим критерием служит выделение культуры возбудителя минимум из двух независимых образцов мокроты. При получении неоднозначных результатов проводится повторное микробиологическое исследование. В случаях выявления редких видов НТМБ или при подозрении на контаминацию образцов проводятся дополнительные консультации специалистов. Пациенты с подозрением на МБ легких, не соответствующие всем диагностическим критериям, остаются

под наблюдением до окончательного подтверждения или исключения диагноза. При верификации диагноза МБ легких разрабатывается персонализированная терапевтическая стратегия, учитывающая индивидуальные особенности течения заболевания и направленная на минимизацию потенциальных рисков.

Согласно усовершенствованной диагностической методологии, ключевым диагностическим маркером микобактериоза считается повторное выявление идентичного вида нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале пациента (минимум двукратное). Верификация диагноза дополнительно основывается на комплексной оценке следующих параметров: 1) присутствие характерной клинической картины заболевания; 2) визуализация патологических изменений при рентгенологическом исследовании, включая формирование полостных структур в легочной ткани; 3) клиническое прогрессирование заболевания на фоне противотуберкулезной терапии; 4) сохраняющееся на фоне противотуберкулезной терапии бактериовыделение; 5) наличие факторов, предрасполагающих к заболеванию микобактериозом: ВИЧ-инфекция и др. заболевания, сопровождающиеся выраженной иммуносупрессией, проведение терапии иммунодепрессантами, ТБ, ХОБЛ, бронхоэктатическая болезнь, сахарный диабет [4, 224].

В практику исследований были внедрены современные протоколы тестирования лекарственной восприимчивости МБТ, разработанные совместно Американским торакальным обществом и Американским обществом инфекционных болезней.

В рамках комплексного анализа чувствительности проводилось тестирование следующих групп препаратов:

- ПТП первого ряда: изониазид, рифампицин, пипразинамид и этамбутол
- представители группы фторхинолонов: левофлоксацин и моксифлоксацин;
- аминогликозидные антибиотики: амикацин и канамицин;

- антибиотики макролидного ряда: кларитромицин и азитромицин.

Важно отметить, что определение спектра тестируемых препаратов осуществлялось дифференцированно, с учетом видовой принадлежности нетуберкулезных микобактерий, в строгом соответствии с актуальными рекомендациями профильных американских медицинских сообществ. Также проводилась оценка эффективности комбинированных режимов антибактериальной терапии.

В терапии пациентов с ЛУ-ТБ ключевым аспектом является разработка персонализированной схемы лечения, включающей комбинацию как минимум четырех ПТП, к которым сохранена чувствительность МБТ. Общая продолжительность терапевтического курса составляет 18 месяцев и подразделяется на две последовательные фазы: интенсивную и поддерживающую. По завершении интенсивной фазы, на основании решения Центральной врачебной консультативной комиссии (ЦВКК), осуществляется переход на поддерживающую фазу с исключением инъекционного компонента и продолжением терапии оставшимися лекарственными средствами.

В рамках терапевтического подхода к лечению микобактериоза лёгких нами были имплементированы стандартизированные протоколы антибиотикотерапии, разработанные совместно Американским торакальным обществом и Американским обществом инфекционных болезней [307]. Терапевтическая стратегия основывалась на комплексном применении ПТП в комбинации с макролидами, в частности кларитромицином, при этом выбор конкретных медикаментов определялся индивидуальным профилем лекарственной чувствительности возбудителя, установленным в процессе лабораторной диагностики. Схема лечения включала не менее 3 препаратов, к которым выявлялась чувствительность НТМБ, длительность лечения до 6 мес. Больные МБ легких получали лечение в течение 12 мес культуральной негативации котримоксазолом (бактрим-форте), дополнительно амикацином 5-15 мг/кг внутривенно три раза в неделю и дополнительно азитромицин по

250 мг ежедневно внутрь или в случае устойчивости кларитромицин по 500 мг дважды в день или в случае устойчивости моксифлоксацин по 400 мг внутрь ежедневно (Таблица 2.1).

Таблица 2.1. – Применяемые режимы лечения больных

Режим лечения ЛЧ ТБ	Индивидуальный режим лечения больных с ЛУ-ТБ (не менее 5 препаратов в зависимости от сохраненной чувствительности) – 18 мес.	Режим лечения больных с микобактериозом легких – 6 мес.
ПТП первого ряда: 2HRZE/4HR (все возрасты по весовой категории)	левофлоксацин, бедаквилин, линезолид, клофазимин, циклосерин или деломанид-Lfx + Bdq + Lzd + Cfz + Cs (Dlm)	Амикацин 5-15 мг/кг в/в три раза в неделю + Азитромицин по 250 мг ежедневно внутрь или Кларитромицин по 500мг дважды в день или Моксифлоксацин по 400 мг внутрь ежедневно

Для анализа данных была использована программа “Software Rstudio, version 4.3.2”.

Учитывая отсутствие неравномерного распределения данных были использованы соответствующие статистические методы для обеспечения достоверных и надежных результатов. Распределение переменных оценивалось с использованием визуальных методов функции skim(df) R studio, а также статистических тестов Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Определялись следующие статистические параметры:

Чувствительность (Sensitivity) теста определялась как её способность выявлять положительные случаи (МТВ), правильно идентифицируя истинно положительных и определяется при использовании таблицы 2.1. по формуле $\text{Чувствительность} = a/(a+c)$. **Специфичность** (Specificity) же оценивалась её способностью правильно исключать отрицательные случаи, правильно идентифицируя истинно отрицательные, определяется в таблице 2.1. по формуле: $\text{специфичность} = d/(b+d)$. **Положительная прогностическая ценность (ППЦ)** — это вероятность того, что у пациента действительно есть заболевание (или состояние), если результат теста оказался положительным $\text{ППЦ} = a/(a+b)$.

Таблица 2.2. - Таблица для определения чувствительности, специфичности и положительной прогностической ценности (ППЦ)

		Наличие состояния		
		Да	Нет	
Выявленные ЭН	Да	Истинно положительный (a)	Ложно положительный (b)	a+b
	Нет	Ложно отрицательный (c)	Истинно отрицательный (d)	c+d
		a+c	b+d	

Источник: German RR, Lee LM, Horan JM, Milstein RL, Pertowski CA, Waller MN, et al. Updated guidelines for evaluating public health surveillance systems: Recommendations from the Guidelines Working Group. MMWR Recomm Rep. 2001;50(RR-13):1-35.

В анализе данных использованы непараметрические методы: U-тест Манна-Уитни для сравнения двух независимых групп; тест Краскела-Уоллиса для сравнения более чем двух групп, а коэффициент ранговой корреляции Спирмена для оценки взаимосвязей между переменными. Для контроля риска 1-го типа ошибок применялась корректировка при помощи поправки Бонферрони.

Точный метод Фишера применялся в случаях, когда какое-либо значение признака встречалось очень редко. Для качественных переменных использованы абсолютные числа и процентные доли (%).

Нулевая гипотеза считалась отклоненной, а различия между группами статистически значимыми при p (p -значение двухсторонний) $<0,05$. Для измерения диапазона значений был измерен 95% доверительного интервала (95% ДИ). Вариация 95% ДИ не включающая 1, при $p < 0,05$ расценена как статистически значимое различие между сравниваемыми переменными. Отношение шансов (ОШ) совместно с 95% ДИ и p -значением использовались для оценки степени связи между двумя категориальными переменными (воздействия и исхода).

ГЛАВА 3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВНЕДРЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО МЕТОДА СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА МИКОБАКТЕРИЙ

3.1. Результаты идентификации микобактерий и спектра их лекарственной устойчивости с применением секвенатора

Нами проанализированы результаты секвенирования образцов культуры 340 больных ТБ. Среди этих больных мужчин было 187 (55%, 95% ДИ 49,8-60,2) и женщин – 153 (45%, 95% ДИ 39,8-50,2). Медиана возраста составила 39 лет, минимальный возраст -2 года, максимальный – 85, межквартильный размах (IQR) = 30 лет (1st Q=27, 2nd Q=57).

Отобранные образцы во временной шкале главным образом выпадают на весенний и осенний периоды (Рисунок 3.1).

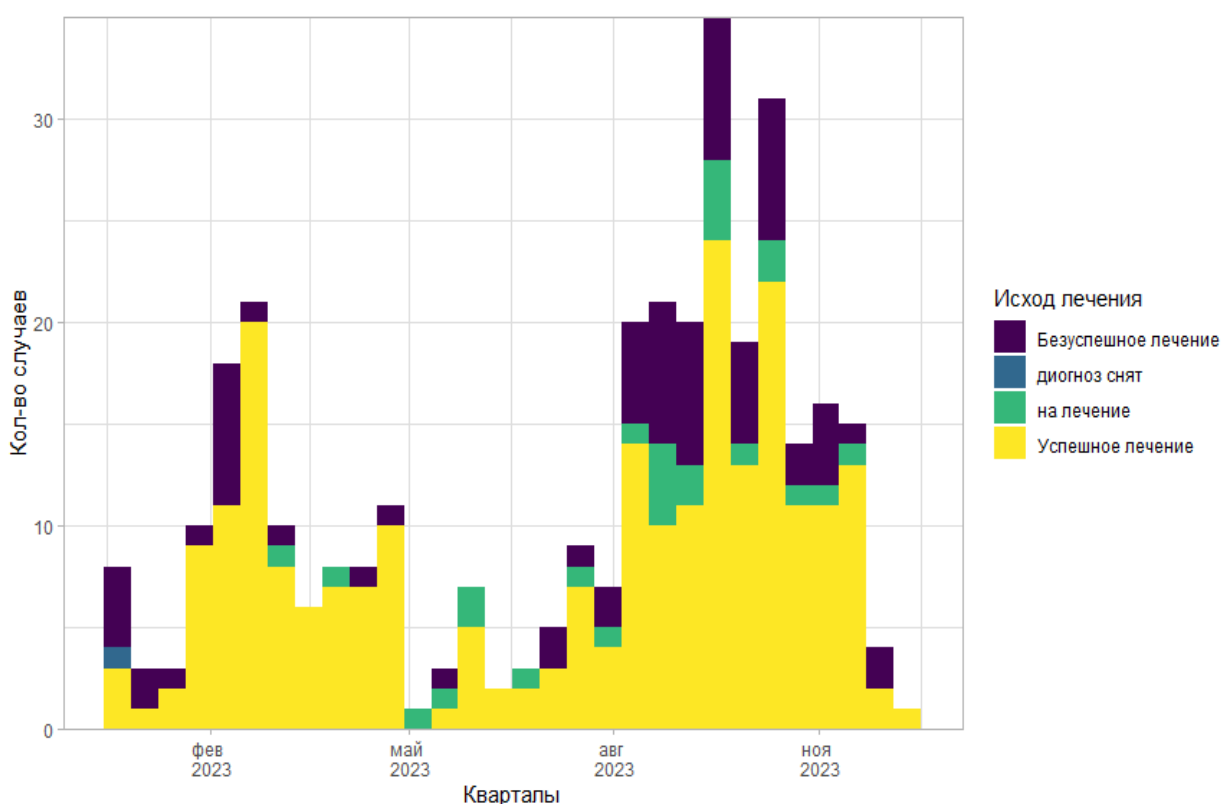


Рисунок 3.1. Распределение отобранных образцов во временном отрезке.

Возрастное распределение больных было следующим: 0-14 лет -6 чел. (2%), 15-17 лет – 6 чел. (2 %), 18-19 лет – 9 чел. (3%), 20-24 лет – 45 чел. (13%), 25-34 лет – 81 чел. (24%), 35-44 лет – 50 чел. (15%), 45-54 лет – 47 чел. (14%), 55-64 лет – 46 чел. (14%) и старше 65 лет – 50 чел. (15%) (Рисунок 3.2).

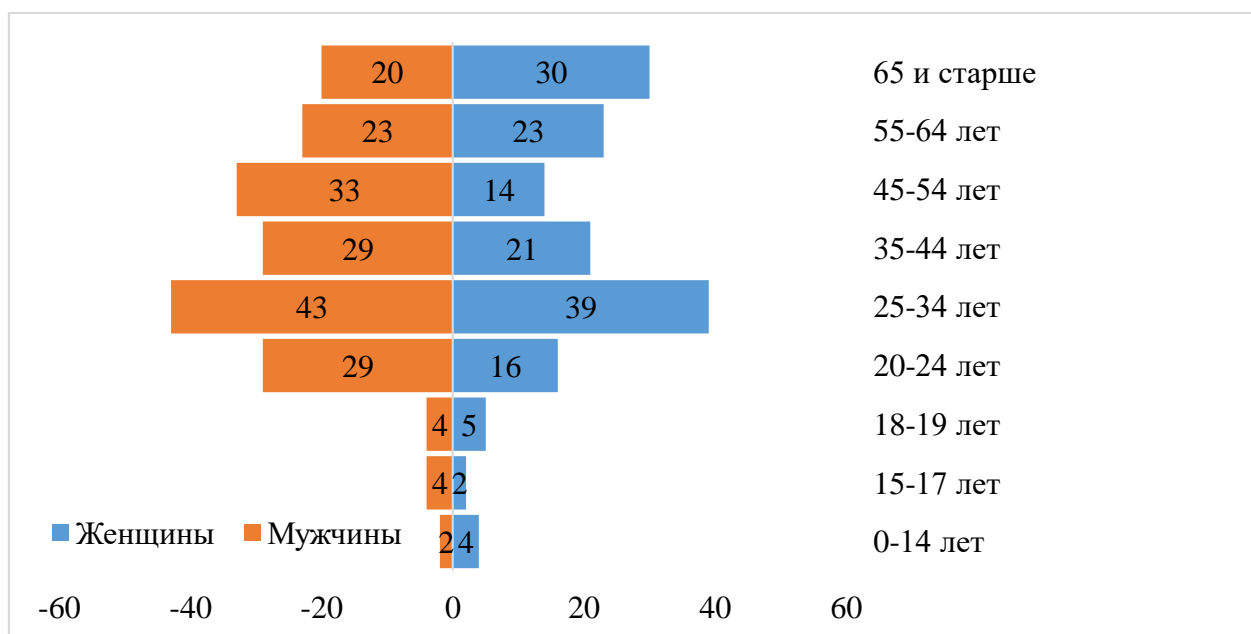


Рисунок 3.2. Половозрастное распределение отобранных для исследования больных (n=340)

Наибольшее число случаев (79% или 269 из 340) выпало на возрастную группу 20–64 лет, из них на первом месте 25-34 лет (24%), за которым следуют лица 35-44 лет и 65 и старше (14,7%), далее группы 45-54 лет и 55-64 лет (13,8% и 13,6%) (Таблица 3.1).

Таблица 3.1. – Распределение по возрасту исследуемых больных по возрастным группам (n=340)

Возрастная группа	0-14 лет	15-17 лет	18-19 лет	20-24 лет	25-34 лет	35-44 лет	45-54 лет	55-64 лет	65 и старше
Абс.	6	6	9	45	81	50	47	46	50
%	1,7	1,7	2,6	13,3	23,9	14,7	13,8	13,6	14,7

Источник: автор

В отобранной когорте по профессиональной занятости преобладающее число выпадает на домохозяйек- 20,6%, безработные -28,8% и пенсионеров 12,9%.

Перед проведением секвенирования образцов культуры больных ТБ, мы согласно задачам нашего научного исследования, разделили их на 3 этапа анализа:

Первый этап – при котором мы перед собой поставили задачу верификации вида микобактерии и спектра их лекарственной чувствительности.

Второй этап – при котором мы поставили задачу идентифицировать *M.tuberculosis*, нетуберкулезные микобактерии и другие легочные заболевания.

Третий этап – на котором мы провели лечение больных с ТБ и МБ легких.

Таким образом, на первом этапе анализа всего нами было отобрано и исследовано 340 образцов мокроты тремя молекулярно-генетическими методами исследования: экспресс-методом GeneXpert, методом посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена (L-J)/посева на жидких питательных средах (MGIT) и методом секвенирования.

При сравнении методов GeneXpert с методом L-J/MGIT обнаружено, что культуральный метод в - 88,9% образцах (298 из 335) выявила положительные на МТБК результаты, 8 штаммов НТМ, отрицательные на МТБК 23 образцы, в 6 образцах посев не проведен из малого объема диагностического материала. В 3 из 5 образцов, отрицательных на наличие возбудителя ТБ методом GeneXpert, метод посева на питательные среды L-J/MGIT обнаружил возбудителя ТБ. Результаты теста Фишера ($p=0,08$ по Фишеру) также указывает на отсутствие статистической значимости между этими тестами (отрицательный результат методом GeneXpert может быть положительный методом L-J/MGIT и наоборот), что требует полноценного обследования больных, учитывая историю болезни, эпидемиологический анамнез и клинико-диагностические данные.

При сравнении теста GeneXpert с секвенированием как "истинным стандартом" (reference standard), можно сказать, что чувствительность GeneXpert высокая = $(231+94+10)/337 \times 100=99\%$. Из общего числа положительных ТБ, определенных методом GeneXpert (335), в 12 образцах выявлены НТМБ методом секвенирования (3,5%), что говорит о более

высокой чувствительности метода секвенирования для выявления НТМБ. Пропущено 1,5% случаев (5 из 299), где GeneXpert дал отрицательный результат, а секвенирование подтвердило МБТ. Данные указывают на то, что даже в случае отрицательного результата теста на МТБК методом GeneXpert возбудитель был всё же идентифицирован: так при 3 образцах, отрицательных методом GeneXpert, методом секвенирования выявлены МТБК, в 2-х образцах микобактерии неизвестной линии из-за низкой концентрации ДНК.

Таким образом, из таблицы 3.2 видно, что всего из общего контингента пациентов, диагностированных методом GeneXpert - из 340 лиц у 335 из них (98,5%) результаты теста на *Mycobacterium tuberculosis* оказались положительными, в том числе: 231 - положительный результат с чувствительностью к рифампицину, 94 - положительных результата с резистентностью к рифампицину и 10 - положительных случаев с неопределенной чувствительностью к рифампицину.

Об этом свидетельствуют результаты посева микобактерий туберкулеза методом L-J/MGIT, которые в целом из 340 обследованных лиц дали положительный результат у 301 образцов, подтверждающий диагноз туберкулеза (88,5%) и у 8 человек диагностированы нетуберкулезные микобактерии.

Общие результаты секвенирования таковы: из 340 протестированных лиц 299 дали положительный результат на *Mycobacterium tuberculosis* (87,9%), из них: 208 дали положительный результат на чувствительность к рифампицину, 79 - положительный результат на устойчивость к рифампицину, 9 - положительный результат на чувствительность к рифампицину, 29 - положительный результат на микобактерии и 12 - положительный результат на нетуберкулезные микобактерии, при этом из-за низкой концентрации генов не были определены семейства микобактерий и восприимчивость их к ПТП (Таблица 3.2.).

Таблица 3.2. - Результаты исследования спектра чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам разными методами исследования образцов (абсолютное число случаев и %)

GeneXpert	Посев методом L-J/MGIT					Посев методом секвенирования									
	Всего	MTBK	НТМ	Отр	не прове дён	Всего	MTBK	M. fluo- ranthe- nivorans	Fortu itum	M.lentif lavum	M.sete nse	Myco licibacter enqbaekii	Myco Licibac terium	UND	
MTB+/Rif – чувствительный	231 100% 67.9%	205 88.7% 68.1%	5 2.2% 62.5%	19 8.2% 76.0%	2 0.9% 33.3%	231 100% 67.9%	208 90% 69.6%	0 0% 0%	4 1.7% 66.7%	0 0% 0%	1 0.4% 100.0%	0 0% 0%	0 0% 0%	18 7.8% 62.1%	
MTB+/Rif- устойчивый	94 100% 27.7%	84 89.4% 27.9%	3 3.2% 37.5%	4 4.3% 16%	3 3.2% 50%	94 100% 27.7%	79 84% 26.4%	1 1.1% 50.0%	2 2.1% 33.3%	1 1.1% 100%	0 0% 0%	1 1.1% 100%	1 1.1% 100%	9 9.6% 31%	
MTB+/Rif- неопределённый	10 100% 2.9%	9 90% 3%	0 0% 0%	0 0% 0%	1 10% 16.7%	10 100% 2.9%	9 90% 3%	1 10% 50%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	
Отрицательный	5 100% 1.5%	3 60% 1%	0 0% 0%	2 40% 8%	0 0% 0%	5 100% 1.5%	3 60% 1%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	0 0% 0%	2 40% 6.9%	
Итого	340 100% 100%	301 88.5% 100%	8 2.4% 100%	25 7.4% 100%	6 1.8% 100%	340 100% 100%	299 87.9% 100%	2 0.6% 100%	6 1.8% 100%	1 0.3% 100%	1 0.3% 100%	1 0.3% 100%	1 0.3% 100%	29 8.5% 100%	

Источник: автор.

Примечание: UND - микобактерии ТБ выявлены, но из-за низкой концентрации ДНК определить его принадлежность не возможна.

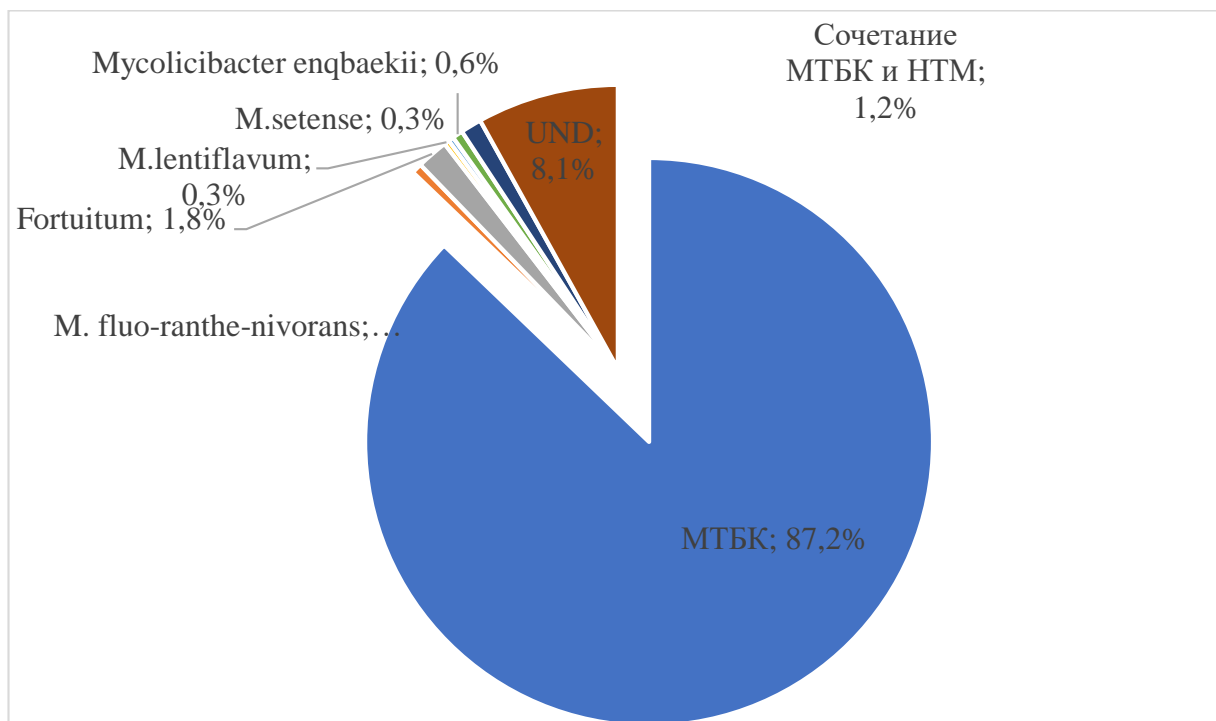
Исследование показало, что NGS определяет принадлежность к семейству микобактерий. При сравнении результатов тестирования на МТБК методами L-J/MGIT и секвенирования было отмечено, что из 301 положительных результатов, полученных методом L-J/MGIT во всех - 100% образцах подтверждено наличие возбудителя туберкулеза (МТБК и микобактерии неизвестной линии) методом секвенирования. Все 8 НТМБ, выявленные методом L-J/MGIT подтвердились методом секвенирования. Из 25 образцов, отрицательных на МТБК методом L-J/MGIT секвенирование в 13 (52%) обнаружило МТБК, в 10 микобактерии неизвестны (40%), 2 (8%) НТМБ, что также подчеркивает более высокую чувствительность метода секвенирования. Кроме того, среди непроведенных тестов методом L-J/MGIT было выявлено 2 образца НТМБ методом секвенирования. В дополнение к выявленным МТБК среди положительных (301) образцов методом секвенирования были выявлены 4 сочетанных инфекций МТБК и НТМБ. Результаты расчета р-значения методом Фишера $p < 0,0001$, указывает на сильную статистическую связь между полученными результатами.

Среди 12 положительных на НТМБ у двоих определен *Mycolicibacterium fluoranthenorans*, что не является типичным патогеном для человека и может вызывать инфекции у людей с ослабленной иммунной системой. Эти микобактерии могут быть обнаружены в дыхательных путях или других участках организма как часть микрофлоры, возможно, в связи с загрязнением окружающей среды. Выявление *M. Fortuitum* у 6 больных, тоже является свидетельством ослабления иммунной системы больных. *M. Lentiflavum*, *M. Setense*, *Mycolicibacter enqbaekii*, *Mycolicibacterium* выявлены по одному случаю (Таблица 3.3, рисунок 3.3).

Таблица 3.3. Сравнение результатов тестирования на наличие возбудителя туберкулёза методами Левенштейна-Йенсена и секвенированием

МТБК	MTB	M.fluoran- thenivorans	M.fortuitum	M.lentiflavum	M.setense	Mycolicibacter enqbaekii	Mycolicibacterium	UND	Всего
	282	0	0	0	0	0	0	19	301
	93.7%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	6.3%	100%
МТБК	94.3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	65.5%	88.5%
	0	1	5	0	1	0	1	0	8
	0%	12.5%	62.5%	0%	12.5%	0%	12.5%	0%	100%
НТМ	0%	50.0%	83.3%	0%	100.0%	0%	100.0%	0%	2.4%
	13	0	1	1	0	0	0	10	25
	52.0%	0%	4.0%	4.0%	0%	0%	0%	40.0%	100%
отрицательный	4.4%	0%	16.7%	100.0%	0%	0%	0%	34.5%	7.35%
	4	1	0	0	0	1	0	0	6
	66.7%	16.7%	0%	0%	0%	16.7%	0%	0%	100%
не проведен	1.3%	50.0%	0%	0%	0%	100.0%	0%	0%	1.8%
	299	2	6	1	1	1	1	29	340
	87.9%	0.6%	1.8%	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	8.5%	100%
Итого	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Источник: архив автора



Источник: автор

Рисунок 3.3. – Сравнение положительных результатов МТБК методом GeneXpert и секвенирования

Мы также провели анализ совпадений и расхождений спектра чувствительности к ПТП между методами посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена (L-J/MGIT) и секвенирования. Сравнение результатов лекарственной чувствительности методами фенотипического ТЛЧ (L-J / MGIT) и секвенирования нового поколения показало, что доля образцов с полной чувствительностью выявлена в 129 из 131 случаев, что соответствует - 98,5% из всех анализируемых данных, при этом - 1,5% или 2 из 131 случаев показали монорезистентность ($p < 0,001$). Полирезистентность и множественная лекарственная устойчивость не обнаружены. При сравнении тестов на лекарственную чувствительность полногеномного секвенирования с фенотипическими методами совпадения составило 78% (129 из 165 случаев).

Соответствие монорезистентности совпало на - 31,4% (16 из 51), из 51 образцов 25 показали полную чувствительность методом секвенирования, которая составляет -49%, 1 полирезистентную форму (2%), 9 множественно-лекарственная устойчивость (18%). Таким образом полное совпадение результатов по монорезистентности между тестами на лекарственную

чувствительность фенотипическими методами и полногеномное секвенированием совпало на 31%. При сравнении тестов на лекарственную чувствительность полногеномного секвенирования с фенотипическими методами совпадения составило 64% (16 из 25 случаев).

Полирезистентность, определенная методом L-J / MGIT совпала с данными секвенирования на - 18% (3/17), из 17 образцов 6 показали полную чувствительность (35%), 4 монорезистентную форму (24%), 4 множественно-лекарственно устойчивую (24%). Метод геномного секвенирования выявлено 5 образцов (2%) с полирезистентностью из которых методом фенотипического теста на лекарственную чувствительность совпала 60% (3 из 5 случаев).

Множественная лекарственная устойчивость, определенная методом LJ/MGIT, совпала с данными секвенирования на - 85% (49/58), из 58 образцов 5 показали полную чувствительность (9%), 3 монорезистентную форму (5%), 1 полирезистентность (2%). Всего методом секвенирования выявлено 62 образцов (24%) с множественно-лекарственной устойчивостью, из которых методом фенотипического теста на лекарственную чувствительность подтвердилось 79 % (49 из 62 случаев).

Совпадения между сравниваемыми методами как по полной лекарственной чувствительностью ($p < 0,001$), монорезистентностью ($p < 0,001$), полирезистентностью ($p < 0,001$), так и множественно-лекарственной устойчивостью статистически значимо ($p < 0,001$) (таблица 3.4.).

Таблица 3.4. - Сравнение результатов исследования лекарственной чувствительности фенотипическими методами L-J / MGIT и секвенированием

Исследование лекарственной устойчивости методом секвенирования	Исследование лекарственной устойчивости фенотипическими методами L-J / MGIT					p-value
	Полная чувствительность	Монорезистентность	Полирезистентность	Множественная устойчивость	Всего	
Полная чувствительность	129 78.2% 98.5%	25 15.2% 49.0%	6 3.6% 35.3%	5 3% 8.6%	165 100% 64.2%	<0.001
Монорезистентность	2 8% 1.5%	16 64% 31.4%	4 16% 23.5%	3 12% 5.2%	25 100% 9.7%	<0.001
Полирезистентность	0 0% 0%	1 20% 2%	3 60% 17.7%	1 20% 1.7%	5 100% 2%	<0.001
Множественная устойчивость	0 0% 0%	9 14.5% 17.7%	4 6.5% 23.5%	49 79% 84.5%	62 100% 24.1%	<0.001
ИТОГО	131 51% 100%	51 19.8% 100%	17 6.6% 100%	58 22.6% 100%	257 100% 100%	

Источник: архив автора

Учитывая, что метод GeneXpert определяет чувствительность только к рифампицину нами было проведено сравнение чувствительности всех трех методов по отношению к этому ПТП. Сравнение показало, что результаты всех тестов по отношению к выявлению чувствительности и устойчивости штаммов возбудителя ТБ к рифампицину имеют статистически достоверную и сильную зависимость от результатов подтверждающего теста ($p < 0.0001$), что подтверждена практически во многих исследованиях. Фенотипические методы подтвердили - 94,6% (176 из 186 образцов) чувствительность штаммов к рифампицину, а секвенирование подтвердило чувствительность к рифампицину - 86,5% (180 из 208 образцов) выявленных методом GeneXpert ($p < 0,0001$). Устойчивость к рифампицину методом L-J/MGIT среди рифампицин - чувствительных образцов методом GeneXpert показали - 5,4% (10 из 186 образцов).

Сравнение методов GeneXpert с геномным секвенированием подтвердило чувствительность к рифампицину - 86,5% (180 из 208 образцов) ($p < 0,0001$), в то время как метод секвенирования обнаруживает - 11,1% (23 из 208 образцов) устойчивость к рифампицину, а также в - 2,4% (5 из 208 образцов) чувствительность возбудителя к рифампицину обнаружить не удалось.

Устойчивость к рифампицину, выявленная GeneXpert, подтвердилась в - 71% (44/62) фенотипическим методом, но - 29% (18/62) образцов методом L-J/MGIT выявил чувствительность к рифампицину.

Сравнение методов GeneXpert с геномным секвенированием по отношению устойчивости к рифампицину показал - 77,8% (63/81) совпадение, - 22% (18 из 81) образцов обнаружил чувствительные штаммы к рифампицину ($p < 0,0001$).

Проведение ТЛЧ к рифампицину в неопределенных методом GeneXpert результатах, показало устойчивость к рифампицину в - 37,5% (3/8) фенотипическим методом и - 33,3% (3/9) методом секвенирования. В то же время метод L-J/MGIT выявил рифампицин - чувствительность среди - 63%

(5/8) рифампицин-неопределенных образцов, обнаруженных методом GeneXpert, а секвенирование - 55,6% (5/9) и у 11% (1/9) чувствительность неопределенная методом секвенирования.

Также 3 отрицательных результата, выявленных методом GeneXpert, - 66,7% (2/3) определены фенотипическим методом как рифампицин-устойчивые образцы, - 100% (1/1) методом секвенирования. - 33% (1/3) показали чувствительность к рифампицину среди GeneXpert отрицательных результатов.

Результаты показали, что сравнение всех трех тестов имеют сильную зависимость от результатов определения чувствительности и устойчивости между молекулярным и фенотипическим ТЛЧ ($p < 0,0001$).

Другими словами, анализируемые три метода молекулярно-генетического исследования мокроты больных ТБ (экспресс-методом GeneXpert, методом посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена и методом секвенирования) имеют разные уровни специфичности и чувствительности и для повышения точности определения спектра чувствительности МБТ к ПТП, необходимо применять все указанные методы.

Таким образом, из 259 образцов, обследованных двумя методами GeneXpert и Левенштейна-Йенсена, выявили культуральным методом в твердой среде 59 устойчивых (22,8%) и 200 (77,2%) чувствительных штаммов к рифампицину.

Из 299 образцов, обследованных на GeneXpert и секвенированием, метод NGS обнаружил 81 устойчивых (27,1%) и 212 (71%) чувствительных штаммов к рифампицину. У 6 (2%) образцов чувствительность к рифампицину не определена из-за низкой концентрации ДНК в обследуемых материалах (Таблица 3.5.).

Таблица 3.5. - Сравнение результатов определения устойчивости\чувствительности к рифампицину методами GenExpert, LJ/MGIT и секвенированием

Метод GenExpert MTB/Rif	Методы LJ/MGIT				Метод секвенирования				
	Всего	Устойчивость к рифампицину	Чувствительность к рифампицину	Отношение шансов (ОШ), 95% ДИ, р-значение	Всего	Устойчивость к рифампицину	Чувствительность к рифампицину	Не определена чувствительность	Отношение шансов (ОШ), 95% ДИ, р-значение
MTB+/Rif чувствительный	186 100% 71.8%	10 5.4% 17.0%	176 94.6% 88.0%	0.0073; (0.0024-0.0224); <0.0001	208 100% 69.6%	23 11.1% 28.4%	180 86.5% 86.1%	5 2.4% 83.3%	0,0107; (0,0043-0.027); <0.0001
MTB+/Rif устойчивый	62 100.0% 23.9%	44 71.0% 74.6%	18 29.0% 9.0%	137.6; (44.7-423.9); <0.0001	81 100% 27.0%	63 77.8% 77.8%	18 22.2% 8.6%	0 0.0% 0.0%	93,4; (37,5-232,9); <0.0001
MTB+/Rif неопределённый	8 100.0% 3.1%	3 37.5% 5.1%	5 62.5% 2.5%	0.0729; (0.0144-0.368); 0.006	9 100% 3.0%	3 33.3% 3.7%	5 55.6% 2.4%	1 11.1% 16.7%	0,0472
MTB-отрицательный	3 100.0% 1.2%	2 66.7% 3.4%	1 33.3% 0.5%	0,03	1 100% 0.3%	0 0.0% 0.0%	1 100.0% 0.5%	0 0.0% 0.0%	1,0
ИТОГО	259 100% 100%	59 22.8% 100%	200 77.2% 100%		299 100% 100%	81 27.1% 100%	212 70.9% 100%	6 2.0% 100%	

Источник: автор

Выявленные особенности имеют огромное клиническое значение, так как от точности определения спектра чувствительности МБТ к ПТП зависит правильный подбор ПТП в схеме химиотерапии больных с ТБ и соответственно эффективность их лечения.

Спектр устойчивости штаммов *M.tuberculosis* при фенотипическом ТЛЧ с использованием LJ/MGIT была следующей: к рифампицину составила - 23% (58/258), изониазиду - 39% (101/258), деламаниду - 34% (27/79), пиразинамиду - 29% (71/249), моксифлоксацину - 27% (27/102), этамбутол - 21% (53/255), левофлоксацину – 12% (32/258), бедаквилину - 9% (9/96), клофазимину - 9% (9/96), линезолиду - 5% (5/98).

Доля чувствительных штаммов *M.tuberculosis* при фенотипическом ТЛЧ с использованием LJ/MGIT составила: к рифампицину - 77% (200/258), изониазиду - 61% (157/258), деламаниду - 66% (52/79), пиразинамиду - 71% (178/249), моксифлоксацину - 73% (75/102), этамбутолу - 79% (202/255), левофлоксацину - 88% (226/258), бедаквилину - 91% (87/96), клофазимину - 91% (87/96), линезолиду - 95% (93/98) (Таблица 3.6, рисунок 3.4).

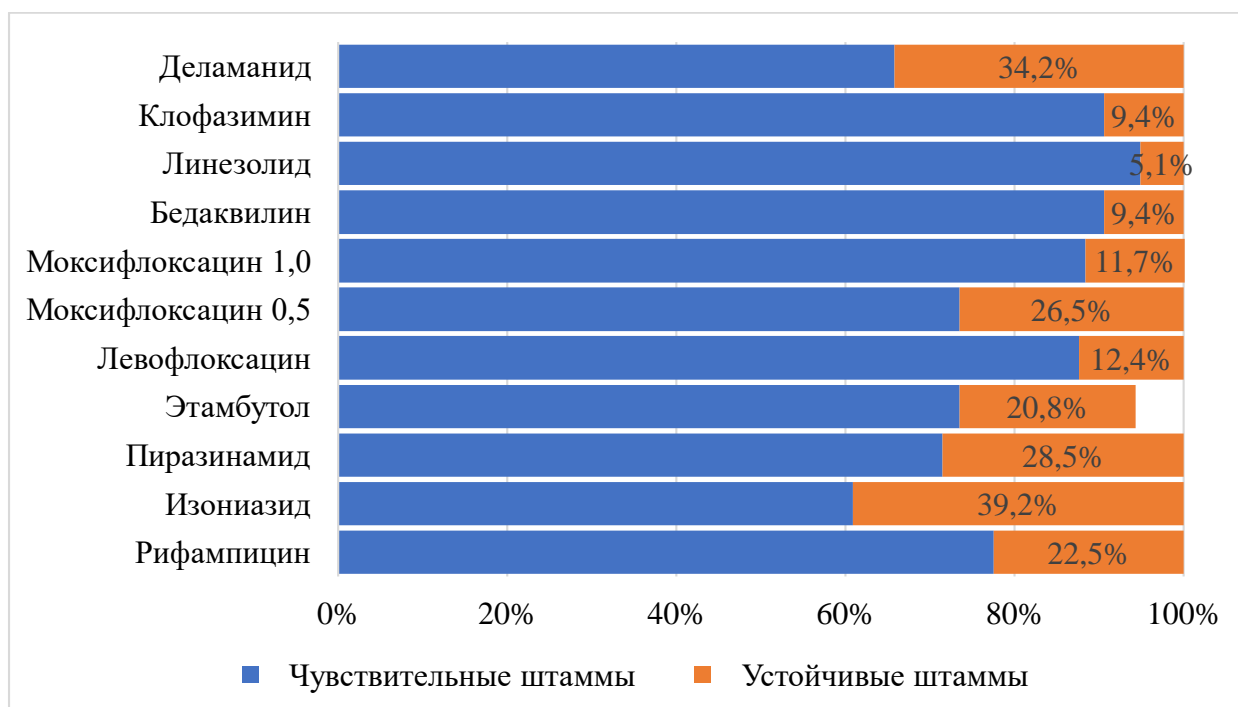
Таблица 3.6.- Результаты теста на лекарственную устойчивость методом LJ/MGIT

Чувствительность к ПТП	Количество	Процент	Нижняя граница 95; ДИ	Верхняя граница 95; ДИ
R (рифампицин)	258	100%		
Устойчивые штаммы	58	22.5%	17.5%	28.1%
Чувствительные штаммы	200	77.5%	71.9%	82.5%
H (изониазид)	258	100%		
Устойчивые штаммы	101	39.2%	33.2%	45.4%
Чувствительные штаммы	157	60.9%	54.6%	66.9%
Z (пиразинамид)	249	100%		
Устойчивые штаммы	71	28.5%	23.0%	34.6%
Чувствительные штаммы	178	71.5%	65.4%	77.0%
E (этамбутол)	255	100%		
Устойчивые штаммы	53	20.8%	16.0%	26.3%
Чувствительные штаммы	202	79.2%	73.7%	84.0%
Lfx (левофлоксацин)	258	100%		
Устойчивые штаммы	32	12.4%	8.6%	17.1%
Чувствительные штаммы	226	87.6%	82.9%	91.4%

Продолжение таблицы 3.6

Mfx (моксифлоксацин)	102	100%		
Устойчивые штаммы	27	26.5%	18.2%	36.1%
Чувствительные штаммы	75	73.5%	63.9%	81.8%
Mfx_1 (моксифлоксацин)	103	100%		
Устойчивые штаммы	12	11.7%	6.2%	19.5%
Чувствительные штаммы	91	88.4%	80.5%	93.8%
Bdq (бедаквилин)	96	100%		
Устойчивые штаммы	9	9.4%	4.4%	17.1%
Чувствительные штаммы	87	90.6%	83.0%	95.6%
Lzd (линезолид)	98	100%		
Устойчивые штаммы	5	5.1%	1.7%	11.5%
Чувствительные штаммы	93	94.9%	88.5%	98.3%
Cfz (клоfazимин)	96	100%		
Устойчивые штаммы	9	9.4%	4.4%	17.1%
Чувствительные штаммы	87	90.6%	83.0%	95.6%
Dlm (деламанид)	79	100%		
Устойчивые штаммы	27	34.2%	23.9%	45.7%
Чувствительные штаммы	52	65.8%	54.3%	76.1%

Источник: автор



Источник: автор

Рисунок 3.4 - Результаты теста на лекарственную устойчивость методом LJ/MGIT

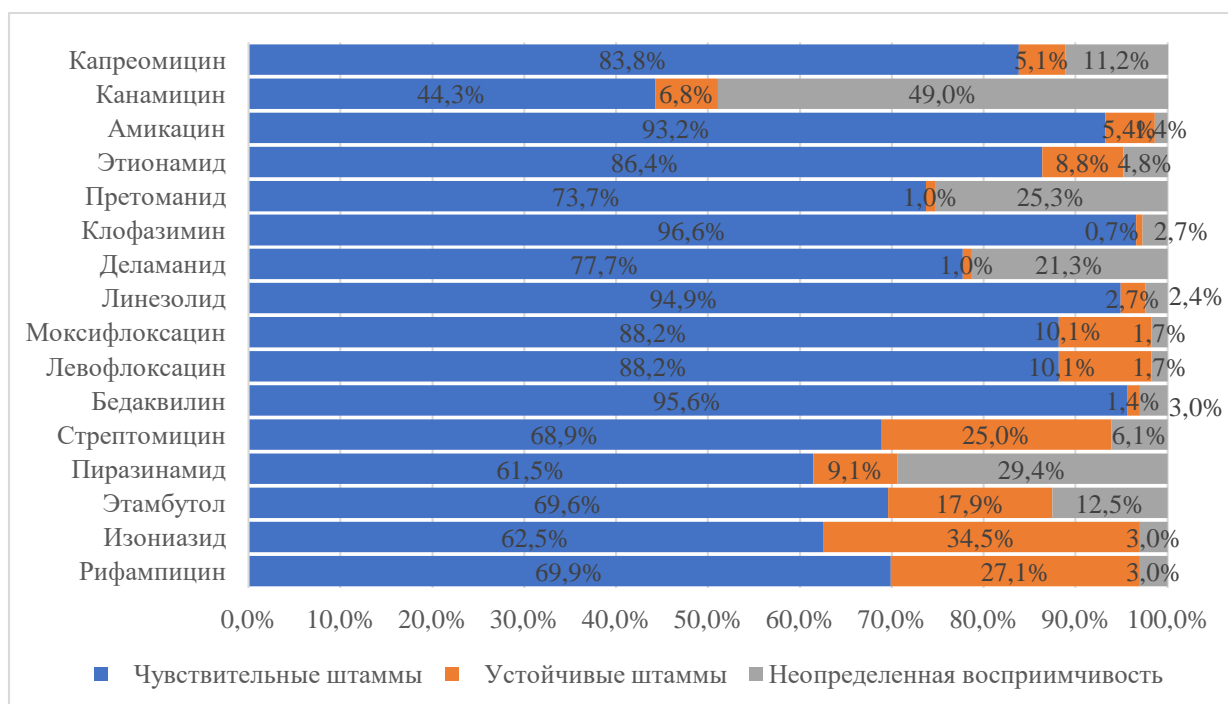
Доля штаммов устойчивых к рифампицину с методом GeneXpert был - 26,1% (77/294), чувствительных – 69,7% (205/294), неопределенных - 3,7% (11/294).

Результаты тестирования на лекарственную чувствительность методом секвенирования показали, что среди протестированных доля устойчивых штаммов была наибольшей к изониазиду - 35% (102/296), за которым следует рифампицин - 27% (81/296), стрептомицин - 25% (74/296), этамбутол - 18% (53/296), левофлоксацин - 10% (30/296), моксифлоксацин - 10% (30/296), пипразинамид - 9% (27/296), этионамид - 9% (26/295), канамицин - 7% (20/296), амикацин - 5% (16/296), капреомицин - 5% (15/296), линезолид - 3% (8/296), бедаквилин - 1,4% (4/296). Список замыкают деламамид - 1% (3/296), клофазимин - 1% (2/296), претоманид - 1% (3/296).

Одновременно, доля чувствительных штаммов была: к клофазимину - 97% (286/296), бедаквилину - 96% (283/296), линезолиду - 95% (281/296), амикацину - 93% (276/296), левофлоксацину - 88% (261/296), моксифлоксацину - 88% (261/296), этионамиду - 86% (255/295), претоманиду - 74% (218/296), изониазиду - 63% (185/296), рифампицину - 70% (209/296), стрептомицину - 69% (204/296), этамбутол - 70% (206/296), пипразинамиду - 62% (182/296), канамицину - 44% (131/296), капреомицину - 84% (248/296), деламамиду - 77% (230/296).

Доля штаммов с неопределенной чувствительностью высока у канамицина - 49% (145/296), пипразинамида - 29% (87/296), претоманида - 25% (75/296).

Следует отметить, что секвенирование нового поколения определяет спектр лекарственной чувствительности ко всем существующим ПТП и выделяет линию штаммов микобактерий в течение 5 часов. В то же время L-J/MGIT в среднем определяет спектр чувствительности не менее чем через 2 - 4 месяца в зависимости от роста культуры МТБК и не ко всему спектру ПТП. Другие методы ТЛЧ таким преимуществом не обладают (Рисунок 3.5., таблица 3.7.).



Источник: автор

Рисунок 3.5. - Результаты теста на лекарственную чувствительность, определенная методом секвенирования

Таблица 3.7. - Результаты теста на лекарственную чувствительность, определенная методом секвенирования

Чувствительность к ПТП	Количество	Процент	Нижняя граница 95; ДИ	Верхняя граница 95; ДИ
R (рифампицин)	299	100%		
Устойчивые штаммы	81	27.1%	22.4%	32.8%
Чувствительные штаммы	209	69.9%	65.1%	75.7%
Штаммы с неопределенной устойчивостью	9	3.0%	0.8%	4.4%
H (изониазид)	296	100%		
Устойчивые штаммы	102	34.5%	29.1%	40.2%
Чувствительные штаммы	185	62.5%	56.7%	68.0%
Штаммы с неопределенной устойчивостью	9	3.0%	1.4%	5.7%
E (этамбутол)	296	100%		
Устойчивые штаммы	53	17.9%	13.7%	22.8%
Чувствительные штаммы	206	69.6%	64.0%	74.8%
Неопределенная устойчивость	37	12.5%	9.0%	16.8%
Z (пиразинамид)	296	100%		
Устойчивые штаммы	27	9.1%	6.1%	13.0%
Чувствительные штаммы	182	61.5%	55.7%	67.1%
Штаммы с неопределенной устойчивостью	87	29.4%	24.3%	34.9%
S (стрептомицин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	74	25.0%	20.2%	30.3%

Продолжение таблицы 3.7.				
Чувствительные штаммы	204	68.9%	63.3%	74.2%
Штаммы с неопределенной устойчивостью	18	6.1%	3.6%	9.4%
Bdq (бедаквилин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	4	1.4%	0.4%	3.4%
Чувствительные штаммы	283	95.6%	92.6%	97.6%
Штаммы с неопределенной устойчивостью	9	3.0%	1.4%	5.7%
Lfx (левофлоксацин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	30	10.1%	6.9%	14.2%
Чувствительные штаммы	261	88.2%	83.9%	91.6%
Штаммы с неопределенной устойчивостью	5	1.7%	0.6%	3.9%
Mfx (моксифлоксацин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	30	10.1%	6.9%	14.2%
Чувствительные штаммы	261	88.2%	83.9%	91.6%
Неопределенная восприимчивость	5	1.7%	0.6%	3.9%
Lzd (линезолид)	296	100%		
Устойчивые штаммы	8	2.7%	1.2%	5.3%
Чувствительные штаммы	281	94.9%	91.8%	97.1%
Неопределенная восприимчивость	7	2.4%	1.0%	4.8%
Dmd (деламанид)	296	100%		
Устойчивые штаммы	3	1.0%	0.2%	2.9%
Чувствительные штаммы	230	77.7%	72.5%	82.3%
Неопределенная восприимчивость	63	21.3%	16.8%	26.4%
Cfz (клоfazимин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	2	0.7%	0.1%	2.4%
Чувствительные штаммы	286	96.6%	93.9%	98.4%
Неопределенная восприимчивость	8	2.7%	1.2%	5.3%
Pa (прегоманид)	296	100%		
Устойчивые штаммы	3	1.0%	0.2%	2.9%
Чувствительные штаммы	218	73.7%	68.2%	78.6%
Неопределенная восприимчивость	75	25.3%	20.5%	30.7%
Eto (этионамид)	295	100%		
Устойчивые штаммы	26	8.8%	5.8%	12.7%
Чувствительные штаммы	255	86.4%	82.0%	90.1%
Неопределенная восприимчивость	14	4.8%	2.6%	7.8%
Am (амикацин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	16	5.4%	3.1%	8.6%
Чувствительные штаммы	276	93.2%	89.8%	95.8%
Неопределенная восприимчивость	4	1.4%	0.4%	3.4%
Km (канамицин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	20	6.8%	4.2%	10.2%
Чувствительные штаммы	131	44.3%	38.5%	50.1%

Продолжение таблицы 3.7.

Неопределенная восприимчивость	145	49.0%	43.2%	54.8%
Ст (капреомицин)	296	100%		
Устойчивые штаммы	15	5.1%	2.9%	8.2%
Чувствительные штаммы	248	83.8%	79.1%	87.8%
Неопределенная восприимчивость	33	11.2%	7.8%	15.3%

Источник: архив автора

Спектр устойчивости по отношению к главному противотуберкулезному препарату рифампицину и множественная лекарственная устойчивость статистически значимо различается у новых и повторных больных для всех трех видов ТЛЧ (GeneXpert: $p < 0.001$, LJ/MGIT: $p = 0.0027$, секвенирование: $p < 0.0001$).

Таким образом, метод геномного секвенирования является наиболее чувствительным (98,4%) и специфичным (99,9%) методом идентификации разновидностей микобактерий и их спектра лекарственной устойчивости к противотуберкулезным препаратам по сравнению с молекулярно-генетическими методами, такими как картриджный экспресс-метод GeneXpert и MGIT, а также фенотипическим методами в твердой среде Левенштейна-Йенсена.

3.2. Результаты идентификации штаммов микобактерий с применением секвенатора

На следующем этапе исследований мы провели сполиготипирование 340 штаммов МБТ, которое выявило, что наиболее распространённой линией является – Beijing (50.8%), за которой следует нераспознанная линия (28.4%), затем следуют линии Ural-2 (4.6%), линии T1 (3.7%), H1 и Ural-1 (2,1%), линии CAS1-Delhi (1,8%), LAM-RUS (1.7%), CAS (1,2%), LAM-9, T и T3-OSA (0,6% каждая), сочетания Beijing-CAS1-Delhi, а также LAM-9, Mani2, Unknown и другие линии (по 0,3% каждая) (Таблица 3.8.).

Таблица 3.8. - Результаты сполиготипирования штаммов МБТ

Наименование штаммов	Количество	Процент	Нижняя граница 95; ДИ	Верхняя граница 95; ДИ
Beijing	166	50.8%	45.4%	56.1%
Unknown	93	28.4%	23.8%	33.6%

Продолжение таблицы 3.8.

Ural-2	15	4.6%	2.8%	7.4%
T1	12	3.7%	2.1%	6.3%
H1	7	2.1%	1.0%	4.4%
Ural-1	7	2.1%	1.0%	4.4%
CAS1-Delhi	6	1.8%	0.8%	3.9%
LAM-RUS	5	1.5%	0.7%	3.5%
CAS	4	1.2%	0.5%	3.1%
LAM-9	2	0.6%	0.2%	2.2%
T	2	0.6%	0.2%	2.2%
T3-OSA	2	0.6%	0.2%	2.2%
Beijing CAS1-Delhi	1	0.3%	0.1%	1.7%
H3	1	0.3%	0.1%	1.7%
LAM-9 Mani2 Unknown	1	0.3%	0.1%	1.7%
T 5	1	0.3%	0.1%	1.7%
T2	1	0.3%	0.1%	1.7%
X1	1	0.3%	0.1%	1.7%
Всего	327	100%		

Источник: автор

По данным Василенко Н.В., Будрицкий А.М. (2014), Вязовая А.А. и соавт. (2020), и многим другим исследованиям на территории регионов Российской Федерации циркулируют такие же штаммы МБТ. В связи с этим, выявленные сполиготипы штаммов не позволяют от дифференцировать штаммы у больных, которые были в трудовой миграции и которые не были в трудовой миграции ($p=0,8738$).

Тем не менее полученные нами данные впервые за последние 5 лет раскрывают спектр сполиготипов штаммов МБТ в Таджикистане, что имеет важное научно-теоретическое значение, в связи с тем, что сполиготипирование штаммов МБТ впервые в РТ выявило их принадлежность к семействам Beijing, Ural, CAS, LAM, H, T и X.

В странах Центральной Азии (Таджикистан, Узбекистан, Казахстан) наиболее распространены линии Beijing, Ural и CAS, при этом линии Beijing ассоциированы с высокой лекарственной устойчивостью.

В России доминируют Beijing и Ural, тогда как в Европе чаще встречаются H, T, LAM и X, а в Латинской Америке и Средиземноморье преобладает LAM. Южная Азия (Индия, Пакистан, Афганистан)

характеризуется высокой частотой CAS, тогда как линия T встречается по всему миру без чёткой региональной привязки.

Изучение штаммов в зависимости от спектра устойчивости показывает, что среди всех устойчивых штаммов (81), на линию Beijing приходится - 69,8% для всего спектра устойчивости и - 80.2% для рифампицин-устойчивости (65 из 81).

Уровень лекарственной устойчивости к любому ПТП линии Beijing составила около - 49% (81/165), устойчивость штаммов линии LAM – RUS выявлена в - 80% (4/5) образцах, среди неопределенных линий (Unknown) устойчивость составила - 37% (21/57).

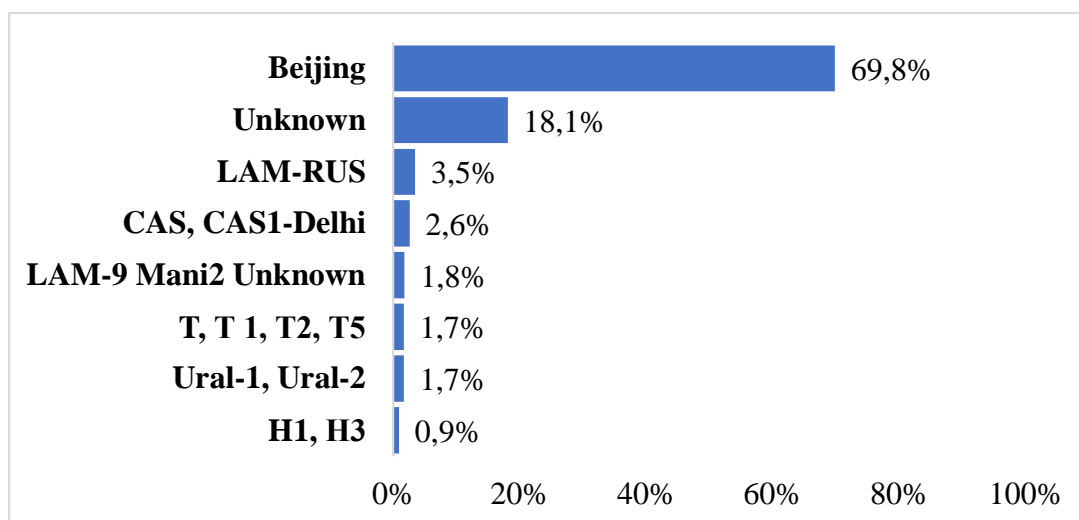
Доля лекарственной чувствительности к любому ПТП линии Beijing составила около - 51% (84/165), чувствительность штаммов линии LAM – RUS выявлена в - 20% (1/5) образцах, среди неопределенных линий (Unknown) чувствительность составила - 63% (36/57), CAS1-Delhi - 67% (4/6), линий H - 88% (7/8) (Таблица 3.9., рисунок 3.6., рисунок 3.7.).

Таблица 3.9. - Результаты сполиготипирования штаммов МБТ в зависимости от спектра устойчивости

Вид штамма	Всего	ТЛЧ ко всем ПТП		ТЛЧ к рифампицину	
		Любая лекарственная устойчивость	Полная чувствительность	Рифампицин-устойчивость	Рифампицин чувствительность
Beijing	165	81	84	65	100
	100%	49.1%	50.9%	39.4%	60.6%
	56.9%	69.8%	48.3%	80.3%	48.1%
Unknown	57	21	36	10	47
	100%	36.8%	63.2%	17.5%	82.5%
	19.7%	18.1%	20.7%	12.4%	22.6%
Beijing CAS1- Delhi	1	0	1	0	1
	100%		100%		100%
	0.3%		0.6%		0.5%
CAS1- Delhi	6	2	4	0	5
	100%	33.3%	66.7%		100%
	2.1%	1.7%	2.3%		2.4%
CAS	4	1	3	0	4
	100%	25.0%	75.0%		100%
				Продолжение таблицы 3.9.	

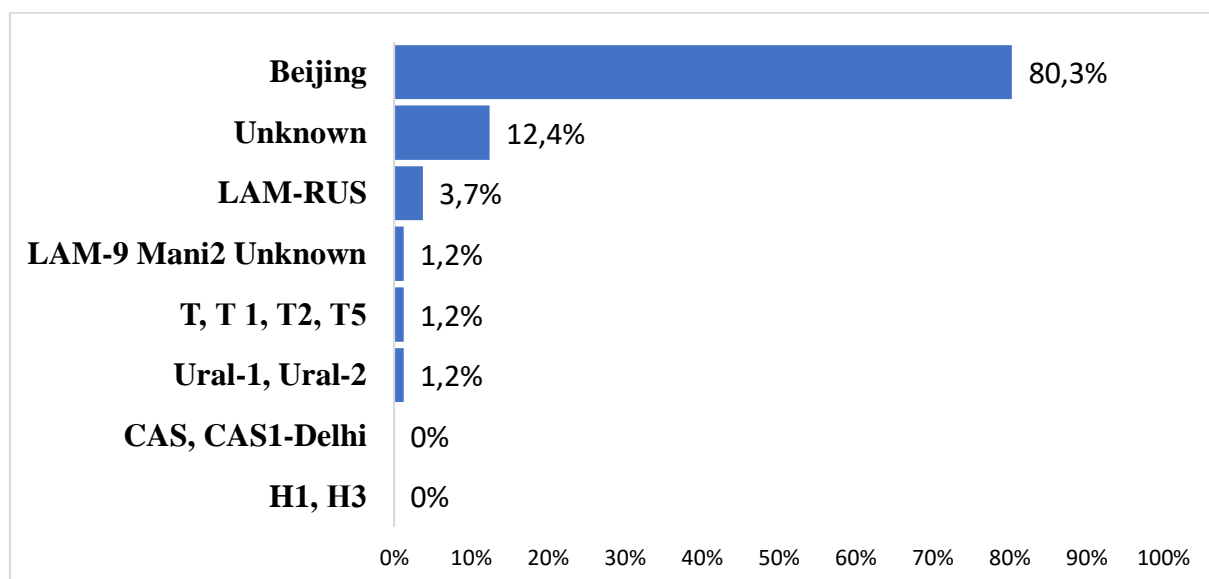
	1.4%	0.9%	1.7%		1.9%
H1	7	1	6	0	7
	100%	14.3%	85.7%		100%
	2.4%	0.9%	3.5%		3.4%
H3	1	0	1	0	1
	100%		100%		100%
	0.3%		0.6%		0.5%
LAM-9	2	1	1	0	2
	100%	50.0%	50.0%		100%
	0.7%	0.9%	0.6%		1.0%
LAM-RUS	5	4	1	3	2
	100%	80.0%	20.0%	60.0%	40.0%
	1.7%	3.5%	0.6%	3.7%	1.0%
LAM-9 Mani2 Unknown	1	1	0	1	0
	100%	100%		100%	
	0.3%	0.9%		1.2%	
T 5	1	0	1	0	1
	100%		100%		100%
	0.3%		0.6%		0.5%
T	2	0	2	0	2
	100%	0.0%	100%		100%
	0.7%	0.0%	1.2%		1.0%
T1	12	2	10	1	11
	100%	16.7%	83.3%	8.3%	91.7%
	4.1%	1.7%	5.8%	1.2%	5.3%
T3-OSA	2	0	2	0	2
	100%		100%		100%
	0.7%		1.2%		1.0%
T2	1	0	1	0	1
	100%		100%		100%
	0.3%		0.6%		0.5%
Ural-2	15	0	15	0	15
	100%		100%		100%
	5.2%		8.6%		7.2%
Ural-1	7	2	5	1	6
	100%	28.6%	71.4%	14.3%	85.7%
	2.4%	1.7%	2.9%	1.2%	2.9%
X1	1	0	1	0	1
	100%		100%		100%
	0.3%		0.6%		0.5%
Всего	290	116	174	81	208

Источник: автор



Источник: автор

Рисунок 3.6. -Любая устойчивость сполитотипированных штаммов МБТ.



Источник: автор

Рисунок 3.7-Устойчивость к рифампицину в сполитотипированных штаммах МБТ

В ходе следующего этапа проведённой работы мы применили секвенирование для анализа частоты одновременной устойчивости к рифампицину — ключевому противотуберкулёзному препарату — и ещё 11 ПТП, которые наиболее часто используются в терапии пациентов с лекарственно устойчивым туберкулёзом (ЛУ-ТБ). При этом следует подчеркнуть, что из общего числа 340 исследованных нами образцов мокроты в 81 случае (24%) была зарегистрирована резистентность к рифампицину, как в изолированной форме, так и в сочетании с устойчивостью к другим

препаратам указанной группы. Такой результат подчёркивает значимость мониторинга лекарственной устойчивости не только к рифампицину, но и к прочим соответствующим ПТП, что имеет непосредственное влияние на оптимизацию выбора схем лечения пациентов с ЛУ-ТБ. В остальных 259 образцах (76%) лекарственная устойчивость МБТ к ПТП была также разнообразной, но без сочетания с устойчивостью к рифампицину.

Из 81 устойчивых к рифампицину сочетание устойчивости рифампицина с изониазидом составила в 75 случаев, 47 с этионамидом, 25 с пиразинамидом, 24 с фторхинолонами, 21 с этионамидом, 16 с инъекционными препаратами, 8 линезолидом, 4 бедаквилином, 2 с клофазимину и по 1 с деламаниду и пиразинамиду.

В таблице 3.10. показано, что резистентность к изониазиду была выявлена в 102 случаях. Из этих 102 случаев резистентность к изониазиду была выявлена в 75 случаях одновременно с резистентностью к рифампицину, в 51 случаях – одновременно к этамбутолу, в 26 случаях – к этионамиду, в 24 случаях – к фторхинолонам, в 13–14 случаях – к инъекционным препаратам, в 8 случаях – к линезолиду и по одному случаю – к клофазимину и претоманиду.

В 27 случаях выявлена резистентность к пиразинамиду. Из 27 случаев в 25 случаях наблюдалась сочетанная резистентность к рифампицину, к другим препаратам сочетанная резистентность не выявлена.

Резистентность к этамбутолу выявлена в 53 случаях. Из 53 случаев резистентность к этамбутолу и рифампицину отмечена в 24 случаях, одновременно с изониазидом – в 51 случаях, с пиразинамидом – в 17 случаях, с фторхинолонами – в 16 случаях, с этионамидом – в 13 случаях, с инъекционными препаратами – в 11–12 случаях, резистентности к другим препаратам не выявлено (Таблица 3.10).

Таблица 3.10. - Сочетанная устойчивость к противотуберкулезным препаратам методом секвенирования, абс.

	Наименование лекарств	Рифампицин	Изониазид	Пиразинамид	Этамбутол	Левифлоксацин	Моксифлоксацин	Линезолид	Бедаквиллин	Клофазимин	Деламаид	Претоманид	Этионамид	Амикацин	Капреомицин
1	Рифампицин	81	75	25	47	24	24	8	4	2	1	1	21	16	15
2	Изониазид	75	102	25	51	24	24	8	0	1	0	1	26	14	13
3	Пиразинамид	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Этамбутол	24	51	17	53	16	16	7	0	0	0	1	13	12	11
5	Левифлоксацин	24	24	10	16	30	30	8	0	2	1	0	7	7	7
6	Моксифлоксацин		24	10	16	30	30	8	4	2	1	1	7	7	7
7	Линезолид	8	8	5	7	8	8	8	3	1	1	0	1	1	1
8	Бедаквиллин	4	3	0	3	4	4	3	0	2	0	0	0	2	2
9	Клофазимин	2	1	0	2	2	2	1	0	2	0	0	0	1	1
10	Деламаид	1	1	1	0	1	1	0	0	0	3	1	1	1	1
11	Претоманид	16	1	1	1	1	1		1	0	0	3	19	11	1
12	Этионамид	47	26	10	13	7	7	1	0	2	1	0	26	5	4
13	Амикацин	16	14	6	12	7	7	1	0	1	1	0	5	16	14
14	Канамицин	19	18	11	13	8	8	2	0	0	1	0	6	13	12
15	Капреомицин	15	13	7	11	7	7	1	0	1	1	1	4	14	15

Источник: автор

Высокий уровень сочетанной устойчивости требует усиления мер противоэпидемического контроля над применением ПТП. Случаев пре-ШЛУ при данном анализе выявлено – 38; случаев ШЛУ-ТБ – 16. Из числа 81 устойчивых к рифампицину пре-ШЛУ составила 15 (18,5%), ШЛУ - 9 (11%) (таблица 3.11.).

Таблица 3.11. – Число больных с пре-ШЛУ и ШЛУ по результату секвенирования 81 больных с рифампицин устойчивостью

№	ПТП	Устойчивость	
		пре- ШЛУ (n=15)	ШЛУ (n=9)
1	Рифампицин	81	
2	Изониазид	15	8
3	Пиразинамид	5	5
4	Этамбутол	8	8
5	Левифлоксацин	15	9
6	Моксифлоксацин	15	9
7	Линезолид	0	8
	р-значение	0.4231	0.4290

Источник: автор

Следует отметить, что тотальная устойчивость ко всем ПТП, при которой лечение больного невозможно и показана лишь паллиативная помощь, была выявлена в 3-х случаях и статистической связи между числом устойчивых препаратов ни для пре-ШЛУ ни для ШЛУ не найдено.

Таким образом, применение метода секвенирования позволяет также наиболее точно определить одновременное сочетание лекарственной устойчивости к разным ПТП, что даёт возможность подобрать максимально эффективный режим лечения больных с ЛУ-ТБ, путем исключения из режима химиотерапии ПТП, к которым у МБТ развилась устойчивость.

3.3. Результаты идентификации нетуберкулезных микобактерий и спектра их лекарственной устойчивости с применением метода секвенирования.

В 2023 году были собраны, консервационно обработаны и подвергнуты лабораторному исследованию 340 культурных образцов. Из этого количества в 12 случаях удалось обнаружить принадлежность к разным семействам НТМБ. При этом у четырёх пациентов выявлено одновременное присутствие микобактерий, относящихся как к НТМБ, так и к комплексу МТБК.

Клиническая симптоматика при микобактериозе и туберкулёзе лёгких демонстрировала сходство, что затрудняет дифференциальную диагностику этих патологий. Анализ показал, что более чем у - 90% обследованных пациентов независимо от нозологической формы наблюдались такие признаки, как упорный кашель, эпизоды фебрильной лихорадки, выраженная слабость, ночная потливость и значительная потеря массы тела.

В качестве группы сравнения мы исследовали те же параметры у 12 больных с ТБ лёгких, подтверждённым молекулярно-генетическими методами. При отборе учитывали:

1. Бактериологически подтвержденное наличие МБТ методами GeneXpert MTB Rif, LPA MTB;
2. Лёгочная форма ТБ;
3. Новые случаи ТБ (впервые выявленные);
4. Независимо от ВИЧ статуса и сопутствующих заболеваний;

Основные клинические проявления МБ и ТБ лёгких не отличались друг от друга. Так, одинаково по частоте у большинства пациентов (более 90%, $p < 0,05$) отмечали кашель, фебрильную лихорадку, снижение веса, ночную потливость, слабость.

Среди пациентов, проходивших исследование с целью подтверждения диагноза МБ лёгких, все демонстрировали бактериовыделение, тогда как аналогичный показатель у лиц с туберкулёзом лёгких составил - 83,3%. То есть наличие кислотоустойчивых микобактерий было подтверждено

микроскопически у абсолютного большинства обеих групп, однако полный бактериовыделительный статус достоверно чаще встречался при МБ лёгких. Статистически значимая разница между двумя нозологическими формами наблюдалась и при сравнении патоморфологических изменений. Так, бактериовыделение выявлено в -75,0% при МБ и -62,5% при ТБ, очаговые изменения лёгочной ткани были характерны для – 6,25% случаев МБ, тогда как среди больных ТБ такая патология зафиксирована только у – 25,0%. Аналогичная тенденция выявлена для бронхоэктазов: их присутствие установлено у – 25,0% заболевших микобактериозом и отсутствовало у пациентов с туберкулёзом. В противоположность этим данным, инфильтративные изменения лёгочной ткани преобладали в группе больных с МБ лёгких: инфильтраты встречались у – 50% больных с ТБ (по сравнению с – 56,3% при МБ), а кавернозные изменения встречались в -56,3% случаев при ТБ и 43,8% - при МБ, также и фиброзно-кавернозные изменения в -18,8% случаев при ТБ и -6,25% -при МБ. Также при МБ выявлен один случай туберкулёза костей (6,25%) (Таблица 3.12.).

Таблица 3.12. - Клинико-рентгенологические характеристики наблюдаемых больных МБ и ТБ лёгких

Параметры	Частота встречаемости				Р-значение
	МБ, n=16		ТБ, n=16		
	Абс.	%	Абс.	%	
Наличие бактериовыделения (МБТ+)	12	75,0	10	62,5	p > 0,05
Очаговые изменения в лёгочной ткани	1	6,25	4	25,0	p < 0,05
Инфильтративные изменения в лёгочной ткани	9	56,3	8	50,0	p > 0,05
Кавернозные изменения в лёгочной ткани	7	43,8	9	56,3	p > 0,05
Фиброзно-кавернозные изменения в лёгочной ткани	1	6,25	3	18,8	p < 0,05
Бронхоэктазы в лёгком	4	25,0	0	0	-
Туберкулёз костей	1	6,25	0	0	-

Значком * - обозначены итоговые данные, статистически отличающиеся от соответствующих параметров в том же столбце (p < 0,05)

Источник: автор

Сопутствующие заболевания были выявлены у 8 пациентов с МБ (66,7%) и 6 – с ТБ лёгких (50,0%). Из сопутствующих заболеваний у больных МБ лёгких у 3-х больных была выявлена ВИЧ-инфицированность, у 3-х – ХОБЛ и у 2-х – сахарный диабет. У 6 больных ТБ лёгких соответственно - по два случая.

Таким образом, в 2023 гг. в НРЛ НЦТБЛиГХ было 12 культур положительных к НТМБ, что составило -3,53% от общего числа выделенных культур микобактерий. Также в 4-х случаях было выявлено сочетание ТБ и НТМБ, таким образом в целом выявлено 16 случаев НТМБ, что составляет -4,71% от общего числа исследованных образцов (Таблица 3.13).

Таблица 3.13. - Частота выделения различных видов нетуберкулезных микобактерий

Вид НТМБ	Абс.	%
M. fortuitum	6	37,5
M. fortuitum+МТБК	2	12,5
M.fluoranthenvorans	2	12,5
M.fluoranthenvorans+МТБК	2	12,5
M.lentiflavum	1	6
Mycolicibacter enqbaekii	1	6
M.setense	1	6
Mycolicibacterium	1	6
Всего	16	100

Источник: автор

Результаты видовой идентификации рекультивированных штаммов НТМБ показали следующую картину: чаще обнаруживались M. fortuitum - 50,0% из них M. fortuitum в чистом виде - 37,5% и сочетания M. fortuitum+МТБК -12,5%, M. fluoranthenvorans -25,0%, из них M. fluoranthenvorans в чистом виде -12,5% и сочетания M.fluoranthenvorans+МТБК -12,5%, и по одному случаю - M. lentiflavum,

Mycolicibacterium enqbaekii, *M. setense* и *Mycolicibacterium* которые составляют по – 6%.

При обнаружении НТМБ в двух клинических образцах и более и/или наличии характерных клинико-рентгенологических признаков пациентам ставили диагноз микобактериоза легких и назначали лечение. Выявление НТМБ только в одном образце материала и/или отсутствие клинико-рентгенологических признаков микобактериоза, обнаружение возбудителя расценивали как спорадическое из-за колонизации или контаминации его НТМБ. Лечение в данном случае не назначали.

Комплексное сравнение пациентов с МБ и туберкулёзом лёгких, включающее анализ клинико-рентгенологических данных, социальные характеристики и молекулярно-генетические параметры, выявило, что сочетанное течение этих заболеваний встречается примерно у - 2% случаев. Примечательно, что среди лиц с микобактериозом лёгких преобладали женщины в возрасте 55–69 лет, тогда как для туберкулёза лёгких была характерна обратная демографическая тенденция — большинство заболевших составляли мужчины в возрасте 25–34 лет. Кроме того, выяснено, что и микобактериоз, и туберкулёз лёгких чаще диагностируются у работников бытовой сферы, что, вероятно, обусловлено их более высокой подверженностью неблагоприятным экологическим условиям. Проблема своевременной верификации диагноза у трудовых мигрантов с подозрением на ТБ лёгких связана с риском попасть в список нежелательных для дальнейшего пребывания в Российской Федерации в связи со схожестью клинико-рентгенологических изменений при МБ и ТБ лёгких. У пациентов с МБ лёгких при сравнении с больными ТБ лёгких рентгенологически значительно чаще выявляются бронхоэктазы и фиброзно-кавернозные изменения в лёгочной ткани. У пациентов с МБ лёгких в два раза чаще, чем у больных с ТБ лёгких выявлялись такие сопутствующие заболевания, как ХОБЛ, сахарный диабет и ВИЧ-инфицированность. Все выявленные НТМБ были протестированы на лекарственную устойчивость. Спектр тестируемых

препаратов избирательно включал ПТП первого ряда (изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол), фторхинолоны (левофлоксацин, моксифлоксацин), аминогликозиды (амикацин, канамицин), макролиды (кларитромицин, азитромицин) и комбинированный режим антибиотикотерапии.

При этом, спектр тестирования на лекарственную чувствительность имел зависимость от вида НТМБ согласно рекомендациям Американского торакального общества и американского общества инфекционных болезней для тестирования лекарственной восприимчивости. Следует отметить, что все выявленные НТМБ оказались устойчивыми к некоторым ПТП первого и второго ряда.

Таким образом, новый метод идентификации возбудителей с применением метода секвенирования позволяет верифицировать редкие для Таджикистана новые разновидности НТМБ, что даёт основание более точно выставлять клинический диагноз МБ легких, которые несмотря на клинико-рентгенологические сходства с ТБ легких, имеют разные терапевтические подходы.

ГЛАВА 4. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ЛЕКАРСТВЕННО УСТОЙЧИВЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ И НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИОЗОВ ЛЁГКИХ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО МЕТОДА СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМА МИКОБАКТЕРИЙ

4.1. Лечение больных с лекарственно устойчивыми формами туберкулёза лёгких и микобактериоза лёгких

Как мы указывали выше, из 340 исследуемых нами образцов биологических материалов в 299 образцах методом секвенирования верифицированы МБТК (87,9%), в 81 (24%) была выявлена устойчивость к основному ПТП первого ряда – рифампицину в сочетании к другим ПТП, в остальных 259 образцах лекарственная восприимчивость МБТ к ПТП показала лекарственную устойчивость к другим ПТП, в сочетаниях кроме рифампицина. С целью лечения мы подбирали индивидуальную схему лечения из не менее 4 ПТП, к которым чувствительность МБТ была сохранена. Принцип сортировки пациентов на соответствующий режим лечения основывается на результатах геномолекулярных тестов на лекарственную чувствительность. Факторы, определяющие выбор схемы лечения, включают профиль лекарственной устойчивости, возраст, распространенность туберкулезного процесса в легких и локализацию внелегочных очагов туберкулеза.

В стране в соответствии с новым обновленным руководством внедрены несколько краткосрочных схем лечения ЛУ ТБ: 6-месячный полностью пероральный режим лечения – БПАЛМ; в случаях подтверждения дополнительной устойчивости к фторхинолонам (пре-ШЛУ/ТБ) - режим без моксифлоксацина (БПаЛ), применяемый в течение 6-9 месяцев; модифицированный краткосрочный режим лечения (мКРЛ) в течение 9-месяцев полностью пероральный режим для пациентов с МЛУ/РУ-ТБ, у которых исключена устойчивость к фторхинолонам. Курс лечения включает следующие противотуберкулезные препараты: бедаквилин (в течение 6

месяцев), левофлоксацин/моксифлоксацин, этионамид, этамбутол, изониазид (высокая доза), пиразинамид и клофазимин (в течение 4 мес, с возможностью продления до 6 мес, если мазок остается положительным в конце 4-го месяца); после чего лечение продолжается левофлоксацином/моксифлоксацином, клофазимином, этамбутолом и пиразинамидом (в течение 5 месяцев). Более длительные индивидуальные режимы лечения (ИРЛ): режим назначается пациентам с МЛУ/РУ-ТБ, которые: а) по критериям выбора не подходят для вышеуказанных коротких режимов лечения; б) имеют неблагоприятный исход после употребления 6-месячных или 9-месячных схем, в) имеют поставленный диагноз ШЛУ-ТБ, или г) имеют непереносимость основных компонентов вышеупомянутых схем лечения. Более длительный индивидуальный режим лечения продолжается не менее 18 месяцев и разрабатывается индивидуально на основе профиля лекарственной чувствительности пациента и иерархической группировки ПТП второго ряда.

Критерием исхода «вылечен» для пациентов с ЛУ-ТБ, подтверждённым бактериологически, являлось наличие не менее двух последовательных негативных результатов микроскопии мазков, а также по крайней мере 2-х отрицательных культур посева мокроты, выполненных с интервалом не менее 30 суток в период поддерживающей стадии химиотерапии. По завершении всего курса антимикробного лечения, мы проводили комплексную оценку эффективности, учитывая как клинические и рентгенологические проявления, так и результаты бактериоскопических и бактериологических исследований.

В первой группе 81 больных получали режим лечения МЛУ-ТБ, во второй - 259 больных получали режим лечения в зависимости от спектра их лекарственной чувствительности, которые были разделены на две подгруппы: 247 больных с ЛЧ-ТБ и 12 больных с НТМБ.

Успешное лечение, у пациентов с МЛУ-ТБ выявлено в - 86,4%, у пациентов с ЛЧ-ТБ в - 89,2% у пациентов НТМБ в - 91,7%, что свидетельствует о высокой эффективности лечения.

Из когорты пациентов получивших полный лечения стало известно, что из 340 пациентов 272 (80%) завершили лечение с результатом «Излечение», 29 (9%) – с результатом «Лечение завершено», всего 301 (89%) пациентов успешно завершили лечение. В 30 (8,8%) случаях наступил летальный исход, в 6 (1,8%) случаях пациенты были исключены из дальнейшего медицинского наблюдения, в 3 (0,9%) случаях лечение признано неэффективным, что в общей сложности составило 39 (11%) случая (отношение рисков -1,3; 95% ДИ 0,61-2,74; $p=0,495$).

Разница в эффективности лечения между когортами с МЛУ-ТБ и ЛЧ-ТБ составила 2,8%, но статистической разницы между эффективностью лечения не отмечено.

Полученные нами данные свидетельствует о том нам удалось повысить эффективность лечения МЛУ-ТБ до уровня эффективности лечения ЛЧ-ТБ.

Таким образом, эффективность лечения МЛУ-ТБ повысилась за счет точного определения спектра лекарственной чувствительности возбудителя ТБ к противотуберкулезным препаратам и корректировке в схеме лечения больных.

В ходе динамического наблюдения за 340 пациентами, удалось достичь высокой эффективности терапии во всех трёх выделенных исследуемых группах. Применение технологий геномного секвенирования микобактерий позволило увеличить точность диагностики и индивидуализацию тактики лечения, что способствовало оптимизации результатов лечения за рассматриваемый период (Таблица 4.1).

Таблица 4.1. - Динамика исходов лечения наблюдаемых пациентов

Режимы лечения	Всего	Излечение	Лечение завершено	Успешное лечение = Излечение + Лечение завершено	Смерть	Потеря для последующего наблюдения	Неудача лечения
МЛУ-ТБ	81 100%	64 79%	6 7%	70 86%	9 11%	1 1%	1 1%
ЛЧ-ТБ	259 100%	208 80%	23 9%	231 89%	21 8%	5 2%	2 1%
ЛУ-НТМБ	12* 100%	9 75%	2 17%	11 92%	0 0%	1 8%	0 0%
Итого	340 100%	272 80.0%	29 8.5%	301 88.5%	30 8.8%	6 1.8%	3 0.9%

Источник: автор

*Все эти больные входят в список больных с ЛЧ-ТБ.

4.2. Излечение случая туберкулёза с ошибочно установленной тотальной лекарственной устойчивостью после установления диагноза ШЛУ-ТБ по результатам секвенирования

Больной 20 лет, мужского пола, проживающий в городе Душанбе Республики Таджикистан, трудовой мигрант во время пребывания на заработках в городе Ростов – на- Дону в сентябре 2021 года почувствовал себя больным. Симптомы заболевания включали: кашель с выделением мокроты, снижение аппетита, снижение массы тела, боль в грудной клетке, общую слабость. Никуда не обращаясь начал самолечение. Через месяц отмечает кровохарканье, в связи с чем обращается к врачам по месту пребывания. Больному назначается противовоспалительная и общеукрепляющая терапия, что прекращает кровохарканье, но кашель с выделением мокроты сохраняется. Через год в ноябре 2022 в связи с ухудшением состояния здоровья возвращается на родину, но в течение месяца за медицинской помощью не обращается. 19-го декабря 2022 обращается в поликлинику по месту постоянного жительства с жалобами на кашель с выделением мокроты, потерю аппетита и снижение массы тела, выраженной слабостью. Учитывая анамнез заболевания и клинические проявления, семейный врач направляет больного на рентгенологическое обследование грудной клетки, анализ мокроты на МБТ и консультацию врача фтизиатра - кабинет НКЛ поликлиники. Результат МТВ/Rif-теста положительный, устойчивый на рифампицин от 20.12.2022. Результат рентгенографии органов грудной клетки выявил инфильтрат в верхней доле левого лёгкого с распадом, дорожкой к корню лёгкого.

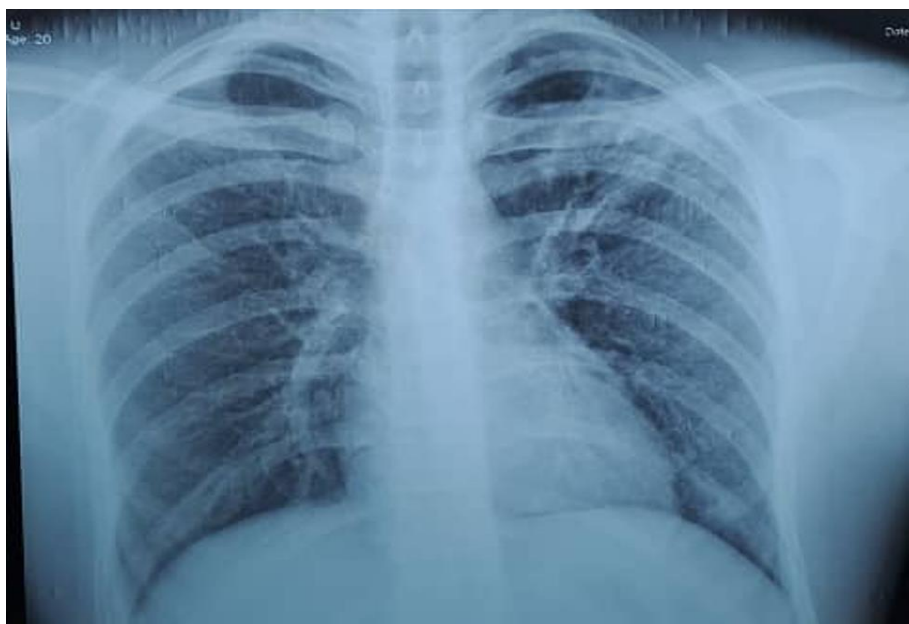


Рисунок 4.1. Обзорная рентгенограмма больного в начале лечения.
Разъяснения в тексте.

Клинические анализы крови больного были без изменений (таблица 4.2).

Таблица 4.2. - Клинические анализы крови больного при обращении

Наименование переменных	Показатели	Нормальные показатели
Гемоглобин, г\л	139	130 - 160
Эритроциты, $10^{12}/л$	4,7	4-5
Лейкоциты, $10^9/л$	8,7	4-9
Эозинофилы, %	2	1-4
Нейтрофилы, палочкоядерные %	3	2-4
Сегментоядерные, %	60	45-70
Лимфоциты, %	29	18-40
Скорость оседания эритроцитов, мм\час	20	0-15
Креатинин, ммоль/л	90	63-115
Аланинаминотрансфераза, ед/л	10,4	До 44
Аспартатаминотрансфераза, ед/л	8,4	10-40
Билирубин прямой, мкмоль/л	24,4	5-20
Общий белок, г/л	84,3	64-83
Глюкоза, ммоль/л	4,5	3,8-5,82

Источник: автор

Результаты тестирования на HIV, HBsAg, AntiHCV отрицательны.

Решением врачебной консультативной комиссии ГЦЗНТ от 20.12.2022 и решением ЦВКК РЦЗНТ за №3 от 22.12.2022 на основании положительного результата GenExpert, рифампицин устойчивости, положительного мазка мокроты (1+), результатов клинико-рентгенологического обследования,

отрицательного результата ВИЧ-теста, установлен диагноз «Инфильтративный туберкулёз верхней доли левого лёгкого в фазе распада, осложненный меж - долевым плевритом справа. Рифампицин устойчивость возбудителя туберкулёза». По истории предшествующего лечения больной зарегистрирован «новый случай туберкулёза». Больному назначен индивидуальный режим лечения противотуберкулёзными препаратами второго ряда: бедаквилин, левофлоксацин, клоfazимин, линезолид и циклосерин. По решению ЦВКК больной госпитализирован в ГУ «Национальный центр болезней легких, туберкулёза и торакальной хирургии», расположенный в поселке «Шифо», Вахдатского района (Мачитон). От 28 декабря 2022 под расписку матери больной выписывается для получения амбулаторного лечения. В январе и в апреле 2023 был представлен на ЦВКК, в связи с положительной динамикой было рекомендовано продолжить лечение, после получения результатов ТЛЧ представить на повторное рассмотрение. Больной неоднократно нарушал режим лечения с мая 2023. Результаты ТЛЧ от 09.02.2023 обнаружил тотальную лекарственную устойчивость к следующим ПТП: рифампицин, изониазид, пиразинамид, левофлоксацин, моксифлоксацин, линезолид, бедаквилин, клоfazимин, деламанид. Результаты ТЛЧ показал чувствительность на офлоксацин и этамбутол.

Семейный врач не мог найти больного в связи с тем, что, больной, будучи единственным кормильцем и мужчиной в семье, плохих социально-экономических условий жизни, был вынужден подрабатывать в Согдийском регионе страны. В июне 2023 года администрация ГЦЗНТ неоднократно связываясь по телефону с больным приглашает его для продолжения лечения, но пациент категорически отказывается от лечения ссылаясь на отсутствие эффективности лечения.

В процессе лечения 5- го июля 2023 больной обращается в ГЦЗНТ, с жалобами на боли в животе и потерю веса. Больному выданы ПТП. От 08.07.2023 в связи с тем, что больной не пришел для получения ПТП, врач

фтизиатр связывается с матерью больного, которая категорически отказывается от лечения переводя сына на религиозное лечение (чтение аятов из Корана) из-за появления судорог и потери сознания. Врач -фтизиатр рекомендует прекратить прием циклосерина, предложив посещение больного на дому. Мать запрещает медицинским работникам посещать их дом, ссылаясь на необходимость поддержания 3-дневного режима воздержания после чтения аятов. От 10.07.2023 по вызову семью посетили врач-невролог, врач-кардиолог, врач-фтизиатр и семейный врач и устанавливают, что причиной потери сознания и появления краткосрочных судорог явился циклосерин, в связи с чем больной представлен на рассмотрение ЦВКК от 11.07.2023, решением ЦВКК из режима снят этот препарат. Телефонная связь с больным от 26.07.2023 выявляет, что больным выехал в Шахристанской район, последующие дни на телефонную связь ни больным, ни его мать и сестра не отвечают. От 12.08.2023 руководитель ГЦЗНТ приглашает больного на встречу в ГЦЗНТ, 22.08.2023 больным посещает ГЦЗНТ с матерью, и старшей сестрой, где проведена беседа со стороны членов ЦВКК. После подтверждения согласия семьи на продолжение лечения, по решению ЦВКК лечение было продолжено.

От 30.12.2023 образец культуры МТБК больного отбирается для тестирования при помощи секвенирования. Результат ТЛЧ при помощи секвенирования выявляет МТБК, семейство Beijing, резистентность на ПТП: рифампицин, этамбутол, пиперазид, левофлоксацин, моксифлоксацин, линезолид, стрептомицин, этионамид. Чувствительность выявлена к препаратам: бедаквлин, клофазимин, деламамид, амикацин, каприомицин, претоманид. Больным представлен на ЦВКК от 09.01.2024 года, решено изменить схему лечения на бедаквлин, клофазимин, деламамид, претоманид.

От 02.09.2024 обзорная рентгенограмма грудной клетки инфильтративный туберкулёз в фазе рассасывания и уплотнения (рисунок 4.2). От 08.09.2024 установлен исход лечения «Излечен».

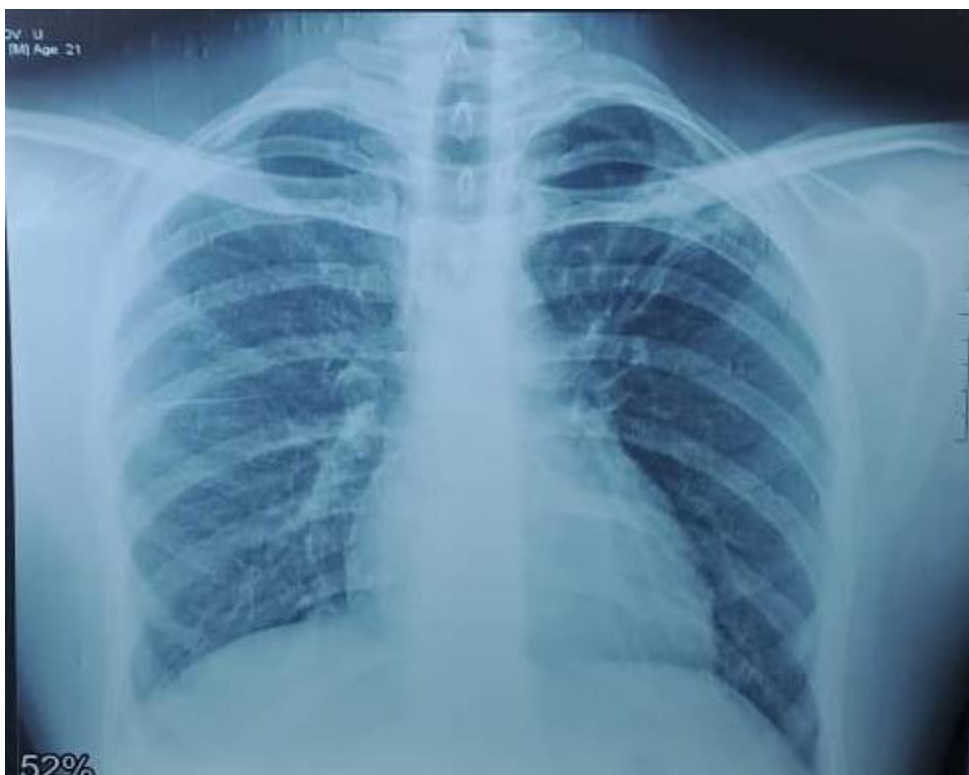


Рисунок 4.2. Обзорная рентгенограмма грудной клетки больного после лечения. Разъяснения в тексте.

В семье проживают 4 человека: мать, двое сестер. Старшая сестра больного (28 лет) обращается от 05.02.2024 с жалобами на симптомы респираторной инфекции к семейному врачу, результат GeneXpert MTB/Rif положительный, рифампицин устойчивый от 05.02.2024, на рентгенологическом снимке грудной клетки обнаружены признаки инфильтративного ТБ в фазе распада. Учитывая историю контакта, результаты секвенирования образцов брата, больная вовлечена к лечению по режиму лечения бедаквилин, деламаанид, клофазимин, претоманид. Результат ТЛЧ от 18.03.2024 определяет резистентность на рифампицин, изониазид, пиразинамид, левофлоксацин, линезолид, клофазимин, бедаквилин. Её лечение продолжается.

Таким образом, описанный в данном разделе случай ТБ, при котором не было фактической тотальной ЛУ, была лабораторная ошибка, что свидетельствует о преимуществе метода секвенирования и установления диагноза ШЛУ-ТБ.

ГЛАВА 5. ОБЗОР РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В клинической практике врачи фтизиатры зачастую встречаются с фактами несоответствия данных лабораторной идентификации спектра лекарственной устойчивости микобактерий ТБ и клинической динамикой лечения больных с ЛУ-ТБ подобранными в соответствии с чувствительностью микобактерий ТБ (МБТ) противотуберкулезными препаратами (ПТП). Другими словами, встречаются случаи отсутствия эффекта от лечения, схема которого, подобрана основываясь на данных лабораторных исследований, и наоборот, факт наличия клинического эффекта от применения устойчивых к микобактериям ПТП. Указанные казуистические наблюдения, в основном, связаны с неточной идентификацией спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП.

Таким образом, возникает необходимость во внедрении новых эффективных высокоспецифичных методов идентификации спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП, каковым является геномное секвенирование МБТ. Это особенно важно для улучшения исходов лечения больных с ЛУ-ТБ.

Для обоснования актуальности данной проблемы автор проанализировал 211 литературных источников, из них на русском – 74, на английском – 137. Проведенный аналитический обзор литературы, охватывающий публикации исследователей из ближнего и дальнего зарубежья позволяет раскрыть важное клиническое значение геномного секвенирования микобактерий ТБ, которое сводится к определению причин возникновения мутаций и влияния противотуберкулезных препаратов на развитие лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза; идентификации туберкулёзных и нетуберкулёзных микобактерий; идентификации природы происхождения туберкулёза среди трудовых мигрантов; и идентификации вида реактиваций легочного процесса после перенесенного туберкулёза лёгких, чему и посвящены наши научные исследования.

В течение 2019-2023 гг. автор диссертационной работы лично систематически связывался с представителями производителей секвенатора Nanopore NGS в Великобритании, вёл с ними переговоры, добился его доставки вместе с расходным материалом в Таджикистан, организовал первоначально обучающий тренинг (online) и затем пригласив их в Таджикистан организовал обучающий тренинг на рабочем месте (on job training). В течение 2023-2024 и по настоящее время данный метод выполняется в Национальной референс-лаборатории ГУ «Национальный центр туберкулеза, пульмонологии и торакальной хирургии». Для устойчивости внедрения данного метода, он был прописан в новом учебно-методическом руководстве для врачей «Национальное руководство по управлению за туберкулезом в Республике Таджикистан». Данное учебно-методическое руководство обязательно для исполнения во всех противотуберкулезных учреждениях РТ (распоряжение МЗиСЗН РТ от 17.10.2024, №704).

Объектом исследования на первом этапе исследования стали 340 образцов культуры мокроты от больных с подозрением на ЛУ-ТБ лёгких, которые были отобраны для верификации спектра лекарственной чувствительности и идентификации НТМБ. Критериями включения больных был установленный в соответствии с диагностическим алгоритмом диагноз ЛУ-ТБ. На следующем этапе исследований нами была изучена эффективность лечения больных ТБ и МБ легких.

Технология секвенирования предоставляет три основных стратегических подхода к идентификации неизвестных патогенов. Полногеномное секвенирование (WGS - whole genome sequencing) позволяет осуществить комплексный анализ всех нуклеиновых кислот, присутствующих в исследуемом материале за короткий промежуток времени. Альтернативой служит таргетное секвенирование, направленное на избирательное исследование генома патогена после предварительного обогащения образца. Третий подход базируется на фрагментном секвенировании, обеспечивающем

выявление ключевых мутаций для определения эпидемиологической значимости патогена.

В основе таргетного метагеномного анализа лежит исследование специфических ДНК-штрихкодов, в частности, для бактериальных патогенов используется анализ гена 16S рРНК. Методология секвенирования допускает как фрагментарный анализ коротких участков, так и полное прочтение протяжённой молекулы. Точность таксономической идентификации патогена находится в прямой зависимости от длины секвенированного фрагмента. Технологии NGS (*next generation sequencing*) позволяют проводить массовое параллельное секвенирование миллионов фрагментов ДНК с высокой пропускной способностью.

Этапность метода секвенирования клинического материала на нанопоровом секвенаторе PromethION - приборе компании Oxford Nanopore Technologies (Великобритания) - ONT:

1. Очистка геномной ДНК из лизированных клеток (после лизиса с GenoLyse VER 1.0) с помощью магнитных шариков AMPure XP на микроцентрифуге с роторами для 1,5 мл пробирок и ПЦР-стрипов/пробирок.

2. Приготовление ДНК библиотек для секвенирования и добавление баркодов путём центрифугирования в центрифуге на магнитном штативе для ПЦР-стрипов (на 8 пробирок) / 96-и луночных плашек с применением 8-и канальных дозаторов.

3. Измерение концентрации ДНК в библиотеке с использованием флуорометра Quantus

4. Загрузка библиотеки в картридж одноканальными дозаторами

5. Заполнение записи концентрации ДНК библиотек

6. Запуск секвенирования на приборе MinION с картриджем через порт USB3.0 по программе MinKNOW

7. Промывка картриджа после секвенирования и его подготовка для хранения

8. Запуск компьютерного анализа данных с применением программы Docker и EPI2ME.

В данном исследовании в 33 из 44 образцах без результата GeneXpert (75%) выявлены МТБК методом секвенирования, что говорит о высокой информативности данного теста.

В терапии пациентов с ЛУ-ТБ ключевым аспектом является разработка персонализированной схемы лечения, включающей комбинацию как минимум пяти ПТП, к которым сохранена чувствительность МБТ. Общая продолжительность терапевтического курса составляет 6-18 месяца и подразделяется на две последовательные фазы: интенсивную (4-6 месяцев) и поддерживающую (12 месяцев).

Комплексная фармакотерапия включает два последовательных этапа лечения. На начальном этапе интенсивной терапии применяется шестикомпонентная схема, сочетающая парентеральное введение аминогликозидного антибиотика (с последовательной заменой амикацина на капреомицин) и пероральный приём пяти препаратов: левофлоксацина, пипразинамида, протионамида, циклосерина и ПАСК. При переходе к поддерживающей фазе, который осуществляется по решению Центральной врачебной консультативной комиссии (ЦВКК), схема лечения модифицируется путём отмены инъекционного препарата при сохранении пяти пероральных компонентов терапии.

В рамках терапевтического подхода к лечению микобактериоза лёгких нами были имплементированы стандартизированные протоколы антибиотикотерапии, разработанные совместно Американским торакальным обществом и Американским обществом инфекционных болезней [307]. Терапевтическая стратегия основывалась на комплексном применении ПТП в комбинации с макролидами, в частности кларитромицином, при этом выбор конкретных медикаментов определялся индивидуальным профилем лекарственной чувствительности возбудителя, установленным в процессе лабораторной диагностики. Схема лечения включала не менее 3 препаратов, к

которым выявлялась чувствительность НТМБ. Больные МБ легких получали лечение в течение 12 мес культуральной негитивации котримоксазолом (бактрим-форте), дополнительно амикацином 5-15 мг/кг внутривенно три раза в неделю и дополнительно азитромицин по 250 мг ежедневно внутрь или кларитромицин по 500 мг дважды в день или моксифлоксацин по 400 мг внутрь ежедневно.

Нами проанализированы результаты секвенирования образцов культуры 340 больных ТБ лёгких. Среди этих больных мужчин было 219 (56,0%) и женщин – 172 (44,0%). Возраст больных был следующий: 15-17 лет – 11 чел. (2,81%), 18-19 лет – 9 чел. (2,3%), 20-24 лет – 45 чел. (11,5%), 25-34 лет – 88 чел. (22,5%), 35-44 лет – 70 чел. (17,9%), 45-54 лет – 53 чел. (13,6%), 55-64 лет – 54 чел. (13,8%) и старше 65 лет – 59 чел. (15,1%).

Перед проведением секвенирования образцов культуры больных ТБ мы согласно задачам нашего научного исследования, разделили их на 3 этапа анализа:

Первый этап – при котором мы перед собой поставили задачу верификации спектра лекарственной чувствительности *M.tuberculosis*.

Второй этап – при котором мы поставили задачу идентифицировать *M.tuberculosis* и нетуберкулезные микобактерии.

Третий этап – на котором мы провели лечение больных с ЛУ-ТБ и МБ легких.

Таким образом, на первом этапе анализа всего нами было исследовано 340 образцов мокроты тремя молекулярно-генетическими методами исследования: экспресс-методом GeneXpert, методом посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена (L-J / MGIT) и методом секвенирования.

Исследование экспресс-методом GeneXpert дала результативность в - 88,0%, при этом выявило сохраненную чувствительность МБТ к рифампицину – основному ПТП первого ряда в - 59,3% случаев и наличие лекарственной устойчивости в - 25,6% случаев. Исследование методом L-J / MGIT дала результативность в - 79,3%, при этом выявило сохраненную чувствительность

МБТ в - 54,7% случаев и наличие лекарственной устойчивости в - 15,9% случаев. Исследование методом секвенирования дало результативность в - 92,8%, при этом выявило сохраненную чувствительность МБТ в - 58,3% случаев и наличие лекарственной устойчивости в - 27,1% случаев.

В частности, L-J / MGIT при сравнении с секвенированием по отношению к выявлению МЛУ штаммов показал - 77,6% чувствительность, что указывает на способность теста правильно выявить заболевание у действительно больных людей.

Из общего числа обследованных методом секвенирования в - 3% были обнаружены микобактериозы, что указывает на долю заболевания нетуберкулезной этиологии среди всех больных ТБ. В 8 из 12 (66,6%) образцах принадлежность к нетуберкулезным микобактериозам была также выявлена методом L-J / MGIT. В 9% идентификация возбудителя была не определена методом секвенирования,

Мы также провели анализ совпадений и расхождений спектра чувствительности к противотуберкулезным препаратам отрицательных результатов исследований образцов мокроты тремя молекулярно-генетическими методами исследования: экспресс-методом GeneXpert, методом посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена (L-J / MGIT) и методом секвенирования.

Проведенный анализ выявил, что из 47 случаев отрицательных результатов исследования мокроты методом GeneXpert, методом L-J / MGIT было выявлено 23 случаев сохраненной чувствительности МБТ или - 48,9% случаев и наличие лекарственной устойчивости в 6 образцах или - 12,8% случаев; методом секвенирования было выявлено 14 случаев сохраненной чувствительности МБТ или - 29,8% случаев и наличие лекарственной устойчивости в 8 образцах или - 17,0% случаев. Из 81 случаев отрицательных результатов исследования мокроты методом L-J / MGIT, GeneXpert выявлено 42 случая с сохраненной чувствительностью МБТ или - 51,6% случаев. Наличие лекарственной устойчивости в 23 образцах или - 28,4% случаев;

методом секвенирования был выявлен 21 случай сохраненной чувствительностью МБТ или - 25,9% случаев и наличие лекарственной устойчивости в 22 образцах или - 27,2% случаев. Из 28 случаев отрицательных результатов исследования мокроты методом секвенирования, методом GeneXpert было выявлено 17 случаев сохраненной чувствительности МБТ или - 60,7% случаев и наличие лекарственной устойчивости в 3 образцах или - 10,7% случаев; методом L-J / MGIT было выявлено 8 случаев сохраненной чувствительности МБТ или - 28,6% случаев и наличие лекарственной устойчивости в 3 образцах или - 10,7% случаев.

Анализируемые три метода молекулярно-генетического исследования мокроты больных ТБ (экспресс-методом GeneXpert, методом посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена и методом секвенирования) имеют разные уровни специфичности и чувствительности и для повышения точности определения спектра чувствительности МБТ к ПТП, необходимо применять все указанные методы. При этом, самое минимальное число отрицательных результатов, которые при применении других методов дают результативность выявлено при применении метода секвенирования (7,16%), нежели при применении метода GeneXpert (12,0%) или же метод посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена (20,7%).

Выявленные особенности имеют огромное клиническое значение, так как от точности определения спектра чувствительности МБТ к ПТП зависит спектр подбора ПТП в схеме химиотерапии больных с ЛУ-ТБ и соответственно эффективность их лечения.

Следующим этапом наших исследований, было определение методом секвенирования частоты сочетанной устойчивости к основному ПТП – рифампицину и ещё 11 ПТП наиболее часто применяемым при лечении больных с ЛУ-ТБ. Следует отметить, что из 340 исследуемых нами образцов мокроты в 81 (24,0%) была выявлена устойчивость к основному ПТП первого ряда – рифампицину и к ещё другим ПТП. В остальных 259 образцах (76,0%)

лекарственная устойчивость МБТ к ПТП была также разнообразной, но без сочетания с устойчивостью к рифампицину.

Данный анализ выявил, что из 81 случаев МЛУ-ТБ, при которой выявляется устойчивость к рифампицину, к изониазиду и ещё какому либо ПТП первого ряда (пиразинамид и этамбутол) встречается наиболее часто, при этом разброс МЛУ-ТБ случаев составляет от 5 до всех 81 случаев. Случаев пре-ШЛУ при данном анализе выявлено 38; случаев ШЛУ-ТБ - 16. Следует отметить, что тотальная устойчивость ко всем ПТП, при которой лечение больного невозможно и показана лишь паллиативная помощь не была выявлено ни в одном случае.

Таким образом, применение метода секвенирования позволяет также наиболее точно определить одновременное сочетание лекарственной устойчивости к разным ПТП, что даёт возможность подобрать максимально эффективный режим лечения больных с ЛУ-ТБ, путем исключения из режима химиотерапии ПТП, к которым у МБТ развилась устойчивость.

На втором этапе анализа мы применили метод геномного секвенирования и выявили всего 12 образцов (3,5% из общего числа 340 образцов), у которых вместо *M.tuberculosis* были выявлены нетуберкулезные микобактерии. Среди секвенированных нетуберкулезных микобактерий в 8 образцах были выявлены *M.fortuitum*, в 4-х образцах - *M.fluoranthenorans* и по одному образцу выявлены - *M.lentiflavum*, *Mycobacter enqbaekii*, *M.setense* и *Mycobacterium*. Все выявленные НТМБ были протестированы на лекарственную устойчивость. Спектр тестируемых препаратов избирательно включал ПТП первого ряда (изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол), фторхинолоны (левофлоксацин, моксифлоксацин), аминогликозиды (амикацин, канамицин), макролиды (кларитромицин, азитромицин) и комбинированный режим антибиотикотерапии. При этом спектр тестирования на лекарственную чувствительность имел зависимость от вида НТМБ согласно рекомендациям Американского торакального общества и американского общества инфекционных болезней для тестирования

лекарственной восприимчивости [264]. Следует отметить, что все выявленные НТМБ оказались устойчивыми к некоторым ПТП первого и второго ряда.

Анализ одного случая корректировки лечения больного с использованием ТЛЧ методом секвенирования показал успешное излечение больного с ранее определенной тотальной лекарственной устойчивостью, появление надежды на продолжение жизни у больного. Этот опыт указывает на усиления раннего выявления ТБ среди ключевых групп населения, таких как трудовых мигрантов, обеспечение лечения больного в стране выявления до абацилирования на примере существующего контракта с Казахстаном. Учитывая основной поток мигрантов в Российскую Федерацию рекомендовано применить существующий подход для обеспечения своевременной диагностики и лечения больных ТБ.

Таким образом, новый метод идентификации возбудителей позволяет не только откорректировать лечение и добиться успешных результатов лечения, но и позволяет верифицировать редкие для Таджикистана новые разновидности НТМБ, что даёт основание выставлять клинический диагноз МБ легких, которые несмотря на клинико-рентгенологические сходства с ТБ легких, имеют разные терапевтические подходы.

Подобный опыт описан также и в других публикациях исследователей из разных стран [17, 21, 34, 36, 161].

На третьем этапе исследований мы провели сполиготипирование 340 штаммов МБТ, которое выявило их принадлежность к семействам Beijing (50.8%), за которой следует нераспознанная линия (28.4%), затем следуют линии Ural-2 (4.6%), линии T1 (3.7%), H1 и Ural-1 (2,1%), линии CAS1-Delhi (1,8%), LAM-RUS (1.7%), CAS (1,2%), LAM-9, T и T3-OSA (0,6% каждая), сочетания Beijing- CAS1-Delhi, а также LAM-9 Mani2 Unknown и другие линии (по 0,3% каждая). Обнаружено, что среди всех устойчивых штаммов (81), на линию Beijing приходится 69,8% для всего спектра устойчивости и 80.2% для рифампицин-устойчивости (65 из 81).

По данным Вязовой А.А. и соавт. (2020), У.А. Кожамкулова и соавт. (2019), А.А. Токтоговой и соавт. (2018) и многим другим исследованиям на территории регионов Российской Федерации, Казахстана и Кыргызстана циркулируют такие же штаммы МБТ [46, 61, 69]. В связи с этим, выявленные сполиготипы штаммов не позволяют дифференцировать штаммы у больных, которые были в трудовой миграции и которые не были в трудовой миграции. Тем не менее полученные нами данные впервые раскрывают спектр сполиготипов штаммов МБТ в Таджикистане, что имеет важное научно-теоретическое значение, в связи с тем, что сполиготипирование штаммов МБТ впервые в РТ выявило их принадлежность к семействам Beijing, Ural, CAS, LAM, H, T и X.

Предыдущее исследование, включающее штаммы, собранные в ходе национального исследования лекарственной устойчивости 2016–2017 показало, что в Республике Таджикистан среди устойчивых форм *M. tuberculosis* на первом месте стоят изоляты линии Beijing (75%), за которым следуют Haarlem (6.3%), H37Rv-like (5,8%), URAL (5,3%), NEW-1 (4,9%), LAM (2,4%), TUR (0,5%) [169]. Изменение доли устойчивости изолята от линии Beijing с 2016–2017 по 2023 гг. по мнению специалистов связано с воздействием пандемии Ковид-19 (закрытие границ) и от улучшения диагностики и своевременного лечения всех форм ТБ, в том числе ЛУ-ТБ.

Полученные нами данные, подчеркивают воздействие миграции на изменение линии штаммов возбудителя ТБ в Республике Таджикистан из других стран и регионов, появление линий CAS1, Delhi, Mani2, T и OSA.

Как мы указывали выше, из 340 исследуемых нами образцов в 81 (24%) случаи был выявлен устойчивость к основному ПТП первого ряда – рифампицину и к ещё другим ПТП. В остальных 259 образцах (76%) лекарственная устойчивость МБТ к ПТП была также разнообразной, но без сочетания с устойчивостью к рифампицину. Выявлено, что среди всех устойчивых штаммов (81), на линию Beijing приходится 69,8% для всего спектра устойчивости и 80.2% для рифампицин-устойчивости (65 из 81).

С целью лечения, мы подбирали индивидуальные схемы лечения из не менее 5 ПТП, к которым чувствительность МБТ была сохранена.

Исход лечения «вылечен» согласно национальным руководствам ставился, когда у больного с ЛУ-ТБ с бактериологическим подтверждением ТБ лёгких, в процессе лечения суммарно имелось 5 и более подряд отрицательных результатов микроскопии мазка и не менее 3 отрицательных полученных подряд (с разницей в 30 дней от предыдущего) результатов посева мокроты в поддерживающей фазе лечения.

По окончании полного курса химиотерапии, с учётом клинико-рентгенологических, бактериоскопических и бактериологических данных, нами произведен анализ исходов лечения.

Сравнительный анализ результатов терапии продемонстрировал более высокие показатели эффективности лечения у пациентов второй группы, достигающие - 86,0%, по сравнению с первой группой, где успех терапии составил - 83% случаев. Данное различие может быть обусловлено сохранением чувствительности к рифампицину во второй группе пациентов. Примечательно, что частота неэффективного лечения была существенно ниже во второй группе наблюдения. При этом показатели летальности и прерывания лечения демонстрировали сопоставимые значения в обеих исследуемых группах.

Продемонстрированная эффективность лечения больных с ЛУ-ТБ, в сравнении с данными других исследователей, является высокой и наилучшей [4, 13, 38, 73, 85, 107].

Проведенное комплексное исследование, включавшее 340 пациента с ЛУ-ТБ, базировалось на принципах своевременной диагностики, оперативной верификации диагноза и прецизионного определения профиля резистентности МБТ к ПТП с использованием методов геномного секвенирования. Результаты наблюдения продемонстрировали значительную терапевтическую эффективность в обеих исследуемых группах.

Идентификация НТМБ микробиологическим методом выявила НТБМ в 12 образцах мокроты. Если ранжировать НТМБ по убыванию, то картина выглядит следующим образом: основном выявлялись *M. fortuitum* (7 культур) и *M. xenopi* (4 культуры), затем *M. chelonae* (3 культуры) и *M. abscessus* (3 культуры), остальные НТМБ выявлены в единичных культурах - *M. fluoranthenvorans*, *M. lentiflavum*, *Mycolicibacter enqbaekii*, *M. setense* и *Mycolicibacterium*. Всем больным, у которых был выставлен диагноз МБ легких было проведено комплексное лечение.

Для определения режима химиотерапии мы использовали рекомендации Американского торакального общества и американского общества инфекционных болезней по стандартизированным подходам к антибиотикотерапии МБ [307].

После верификации диагноза МБ лёгких мы назначали всем больным МБ антимикробную терапию с учетом лекарственной устойчивости возбудителя. Комплекс препаратов был выбран, основываясь на их чувствительности к ПТП в сочетании с макролидами (кларитромицин).

Все НТМБ, выделенные от 12 больных, были устойчивы к некоторым ППР и ПВР, поэтому лечение проводили ПТП, к которым сохранялась чувствительность, и макролидами. Схема лечения включала не менее 3 препаратов, к которым выявлялась чувствительность НТМБ. Больные МБ легких получали лечение в течение 12 мес культуральной негативации котримоксазолом (бактрим-форте), дополнительно амикацином 5-15 мг/кг внутривенно три раза в неделю и дополнительно азитромицин по 250 мг ежедневно внутрь или кларитромицин по 500 мг дважды в день или моксифлоксацин по 400 мг внутрь ежедневно.

Реализация полноценного курса терапии микобактериоза лёгких осложнялась высокой частотой нежелательных явлений, среди которых преобладали гепатотоксические реакции (3 пациента) и диспептические расстройства (1 пациент). Коррекция симптомов непереносимости осуществлялась посредством комплексной терапии, включающей

дезинтоксикационные, гепатотропные, десенсибилизирующие, ноотропные и метаболические препараты. В случаях развития выраженных побочных эффектов проводилась временная приостановка химиотерапии до купирования симптомов непереносимости с последующим возобновлением лечения. Продолжительность стационарного этапа терапии варьировала от 3 до 6 месяцев.

Анализ рентгенологической динамики продемонстрировал закрытие полостей распада лёгочной ткани у 87,5% пациентов в течение первых трёх месяцев терапии, тогда как у оставшихся больных положительные изменения рентгенологической картины наблюдались на более поздних этапах лечения. Терапия микобактериоза лёгких сопряжена со значительными клиническими трудностями, обусловленными природной резистентностью нетуберкулёзных микобактерий к большинству ПТП и высокой частотой развития побочных эффектов. При оценке результатов стационарного этапа лечения установлено достижение положительной клинической динамики у 75% пациентов, улучшение рентгенологической картины у 87,5% больных и полная элиминация возбудителя из мокроты у всех пациентов (100%). После завершения стационарного этапа пациентам рекомендовано продолжение амбулаторной химиотерапии под наблюдением семейного врача в течение 12 месяцев.

Результаты проведенного исследования демонстрируют значительную терапевтическую эффективность в лечении пациентов с микобактериозом легких, что было достигнуто благодаря комплексному подходу, включающему точную и своевременную диагностику, корректную верификацию диагноза, а также эффективное управление нежелательными реакциями на противомикробные препараты.

Таким образом, в повседневной клинической практике врачи фтизиатры зачастую встречаются с фактами несоответствия данных лабораторной идентификации спектра лекарственной устойчивости микобактерий ТБ и клинической динамикой лечения больных с ЛУ-ТБ, подобранными в

соответствии с чувствительностью микобактерий ТБ (МБТ) противотуберкулезными препаратами (ПТП). Другими словами, встречаются случаи отсутствия эффекта от лечения, схема которого, подобрана основываясь на данных лабораторных исследований, и наоборот, факт наличия клинического эффекта от применения устойчивых к микобактериям ПТП. Указанные казуистические наблюдения, в основном, связаны с неточной идентификацией спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП. В связи с этим, возникает необходимость во внедрении новых более эффективных высокоспецифичных методов идентификации спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП, каковым является геномное секвенирование МБТ. Это особенно важно для улучшения исходов лечения больных с ЛУ-ТБ.

Проведенные исследования позволили улучшить уточнение диагноза ТБ и МБ лёгких и их лекарственной устойчивости, провести дифференциальную диагностику между туберкулёзом и микобактериозом лёгких.

Внедренный в практику здравоохранения новый метод геномной идентификации микобактерий повышает эффективность лечения больных ТБ и МБ легких: идентификация разновидностей микобактерий даёт возможность отделить больных ТБ легких от больных с нетуберкулезными МБ легких, что позволяет повысить эффективность их лечения.

ВЫВОДЫ

1. Внедрение метода геномного секвенирования в практику фтизиатрической службы имеет важное клиническое значение, из-за своевременности определения штаммов микобактерий и спектра их лекарственной чувствительности (в течении 5 часов по сравнению с 2–4 месяцев методом L-J/MGIT), от которого зависит подбор препаратов в схеме химиотерапии больных с ТБ с соблюдением принципа доказательной медицины и соответственно эффективностью их лечения [5-А, 6-А, 7-А, 9-А, 10-А, 11-А, 12-А, 14-А].

2. Метод геномного секвенирования по сравнению с молекулярно-генетическими методами, такими как GeneXpert, MGIT и культуральным является высоко чувствительным (98,4%) и высоко специфичным (99,9%). Максимальная статистически достоверная разница спектра лекарственной устойчивости выявлена при проведении секвенирования (27,0%) (GeneXpert: $p < 0.001$, LJ/MGIT: $p = 0.0027$, секвенирование: $p < 0.0001$), затем следует GeneXpert (26,1%) и посев в твердой среде Левенштейна-Йенсена (23,0%), при этом минимальное число отрицательных результатов выявлено при применении метода секвенирования (7,2%), нежели при применении метода GeneXpert (12%) и метода посева в твердой среде Левенштейна-Йенсена (20,7%) [5-А, 6-А, 7-А, 9-А, 10-А, 11-А, 12-А, 14-А, 18-А].

3. Расшифрованы сполиготипы штаммов МБТ в Таджикистане: выявлена их принадлежность к семействам Beijing (50,8%), за которой следует нераспознанная линия (28,4%), затем следуют линии Ural-2 (6,7%), линии T и T₁₋₅ (4,9%), H1 (2,1%), линии CAS1-Delhi (1,8%), LAM-RUS (1,7%), CAS (1,2%), LAM-9, OSA (0,6%), сочетания Beijing- CAS1-Delhi, а также LAM-9 Mani2- нераспознанная линии (по 0,3% каждая). Полученные нами данные, указывают на воздействие миграции на распространение различных линий штаммов возбудителя ТБ в Республике Таджикистан из других стран и регионов. Обнаружено, что среди всех устойчивых штаммов (81), на линию Beijing приходится 69,8% (в предыдущих исследованиях 2017 г. этот

показатель составлял 75,0%) для всего спектра устойчивости и 80,2% для рифампицин-устойчивости [5-А].

4. В образцах мокроты больных с подозрением на ТБ в 12 (3,53%) случаях выявлены чистые культуры НТМБ и в 4-х случаях - сочетание ТБ и НТМБ, таким образом в целом обнаружено 16 случаев НТМБ, что составляет 4,71%, остальные 95,3% составляют МБТ [6-А, 7-А].

5. Благодаря своевременной диагностике и правильной верификации диагноза с применением нового геномного метода секвенирования, эффективность лечения во всех группах наблюдения достигла максимума у больных с МЛУ-ТБ составила 86,4%, у больных с ЛЧ-ТБ – 89,2% и у больных с МБ лёгких - 91,7% [1-А, 2-А, 3-А, 4-А, 7-А, 8-А, 9-А, 13-А, 14-А, 15-А, 16-А, 17-А].

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРАКТИЧЕСКОМУ ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Для того, чтобы добиться эффективного лечения больных ТБ, важно своевременно определить принадлежность возбудителя заболевания к семейству микобактерий, определить спектр лекарственной чувствительности и на их основании правильно подобрать режим химиотерапии. В связи с этим, внедрение секвенирования нового поколения решает важную проблему фтизиопульмонологии относительно определения принадлежности к семейству микобактерий и правильной идентификация спектра лекарственной устойчивости МБТ к ПТП. Другой важной проблемой фтизиопульмонологии является правильная идентификация вида микобактерии, для которого метод секвенирования обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

2. Вышеуказанные проблемы правильной идентификации вида и спектра устойчивости микобактерий можно решить путем применения нового геномного секвенирования, который налажен на базе Национальной референс-лаборатории ГУ «Национальный центр туберкулеза, пульмонологии и торакальной хирургии».

3. Подробная информация о применении данного метода указана в учебно-методическом руководстве для врачей «Национальное руководство по управлению за туберкулезом в Республике Таджикистан», утвержденном распоряжением МЗиСЗН РТ от 17.10.2024., №704.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУР

1. Анализ мутаций микобактерий туберкулеза, определяющих их лекарственную устойчивость у больных с не леченным туберкулезом легких при разном ВИЧ-статусе в свердловской области [Текст] / Г.В. Панов, [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2017. - №95(2). – С. 27-32.
2. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий у больных микобактериозом на территориях Северо-Западного федерального округа России [Текст] / Д. А. Старкова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2019. – Т. 97. - № 6. – С. 16-22.
3. Вклад трудовой миграции в эпидемическую ситуацию по туберкулезу в Калужской области [Текст] / И.С. Лапшина [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96. - № 11. – С. 45-51.
4. Влияние активного выявления случаев туберкулеза на результаты лечения взрослых пациентов с туберкулезом легких [Текст] / С.А. Стерликов [и др.] // Туберкулез и болезни легких. - 2021. - №99(7). - С.33-40.
5. Выделение ДНК для анализа с помощью диагностических наборов ХАЙН Genotype: Стандартная Операционная Процедура. – НРЛ. - 2021. - 6 с.
6. Выявление нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в разных регионах Сибири, и анализ их лекарственной устойчивости [Текст] / О.И. Альховик [и др.] // Туберкулёз и болезни лёгких. - 2019. – Т. 97. - № 10. – С. 5-11.
7. Генетические детерминанты вирулентности и лекарственной устойчивости *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* — возбудителя микобактериоза человека [Текст] / Д. А. Старкова, О.В. Нарвская // Инфекция и иммунитет. - 2020. - Т. 10. - №1. - С. 26-34.
8. Генетическое разнообразие лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Омской области [Текст] / О.А. Пасечник [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2017. - №95(7). – С. 33-39.

9. Геномный анализ клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства LAM [Текст] / П.В. Тарлыков, С.Ш. Атавлиева // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2021. - №4. – С. 46-64.
10. Генотипирование изолятов *M. tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью, циркулирующих в южных регионах Казахстана [Текст] / П.В. Тарлыков [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2015. - №9. – С. 41-46.
11. Динамика изменений числа рецидивов по отношению к общему числу зарегистрированных случаев туберкулеза за 2011-2020 годы [Текст] / О.И. Бобоходжаев [и др.] // Здравоохранение Таджикистана. – 2023. - №1(356). - С. 13-18.
12. Заболеваемость туберкулезом среди трудовых мигрантов в России [Текст] / Э.Б. Цыбикова, М.Э. Гадирова, Д.А. Мидоренко // Туберкулез и болезни легких. – 2021. – Т. 99. - № 11. – С. 35-41.
13. Закономерности эпидемического процесса и эффективность лечения больных туберкулезом с разными спектрами лекарственной устойчивости в Республике Таджикистан [Текст] / О.И. Бобоходжаев [и др.] // Туберкулез и болезни лёгких. – 2023. – Т. 101. - № 2. – С. 73–79.
14. Закономерности эпидемического процесса по туберкулезу с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в Республике Таджикистан [Текст] / О.И. Бобоходжаев [и др.] / Научно-медицинский журнал «Симург». – 2019. - №2. - С. 110-115.
15. Здоровье населения и деятельность учреждений здравоохранения в 2019 году / Ежегодный стат. сборник МЗ и СЗН РТ. Душанбе. - 2022. - С.100-148.
16. Изучение спектра и частоты встречаемости мутаций гена *EMBВ* микобактерий туберкулезного комплекса, ассоциируемых с устойчивостью к этамбутолу, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени [Текст] / Ю.С. Аляпкина [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2017. - №95(11). – С. 27-35.

17. Идентификация микобактерий нетуберкулезного типа, изолированных от крупного рогатого скота в Республике Татарстан [Текст] / Ю.Р. Камалиева, Д.Н. Мингалеев, Р.Х. Равилов // Аграрная наука. - 2021. - №354(11-12). - С. 32-35.

18. Исследование перспективной чувствительности МБТ к некоторым противотуберкулезным препаратам у больных туберкулезом в Томской области [Текст] / Н.И. Голубчиков, Е.А. Крук, С.П. Мишустин // Туберкулез и болезни лёгких. - 2019. - №12. – С. 7-11.

19. К вопросу о реактивации туберкулезного процесса [Текст] / О.И. Бобоходжаев [и др.] // Вестник Авиценны. - 2018. – №2-3(20). - С. 320-324.

20. Нетуберкулезные микобактерии и их клиническое значение [Текст] Бобоходжаев О.И., Шарипов Ф.Р. // Душанбе: Типография «Бебок». - 2021. - 190 с.

21. Клинические и эпидемиологические аспекты микобактериоза у пациентов с ВИЧ-инфекцией [Текст] / Савченко М. А. // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2019. – Т. 11. - № 2. – С. 27–33.

22. Клинические проявления рецидивов туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией [Текст] / Зоркальцева Е.Ю., Егорова Ю.О. // Туберкулез и болезни легких. - 2020. - №98(6) - С. 32-35.

23. Лекарственная чувствительность клинических изолятов *Mycobacterium avium complex* [Текст] / Д.А. Старкова, В.Ю. Журавлев, Н.С. Соловьева // Туберкулез и болезни легких. – 2022. - №100(11). -С. 39-47.

24. Машинное обучение в прогнозировании рецидивов у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью [Текст] / А. С. Аллилуев [и др.] // Туберкулез и болезни легких. - 2021. - №99(11). - С.27-34.

25. Медико-социальные аспекты туберкулеза трудовых мигрантов [Текст] / А.О. Ланкин [и др.] // Научное обозрение: Медицинские науки. – 2022. – № 3. – С. 86-90.

26. Медико-социальные факторы возникновения туберкулеза у мигрантов по Республике Саха (Якутия) в период с 2018–2020 год [Текст] / Н.А. Гуляева [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал.- 2022. - №7 (121). - URL: <https://research-journal.org/archive/7-121-2022-july/medical-and-social-factors-of-tuberculosis-among-migrants-in-the-republic-of-sakha-yakutia-in-the-period-of-2018-2020>.

27. Микобактериоз легких у пациентки с нормальным иммунным статусом [Текст] / О. П. Фролова, О. В. Бутыльченко, Стаханов В. А. // Туберкулёз и болезни лёгких. - 2019. – Т.97. - №4. – С. 52-55.

28. Микробиологические и эпидемиологические особенности микобактериозов [Текст] / И.В. Петров [и др.] // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. - 2020. - №19(3). - С. 89-94.

29. Моделирование эпидемического распространения генотипа Beijing *Mycobacterium tuberculosis* в Республике Саха (Якутия) [Текст] / С.Н. Жданова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2017. - №95(7). – С. 40-47.

30. Мутации генов и лекарственная устойчивость микобактерии туберкулёза у пациентов, находящихся под наблюдением в городе Москве [Текст] / М.А. Краснов, Е.М. Белиловский, С.Е. Борисов // Туберкулез и болезни лёгких. - 2019. – Т.97. - №12. – С. 34-42.

31. Национальная стратегия Российской Федерации по предупреждению распространения устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам: трудности и перспективы сдерживания одной из глобальных биологических угроз XXI Века [Текст] / Н.С. Давыдов // БИО препараты: Профилактика, диагностика, лечение. – 2018. - №18(1). - С. 50-56.

32. Нетуберкулезный микобактериоз легких – возможности диагностики в практике пульмонолога [Текст] / Е.Б. Владимирова [и др.] // Терапевтический архив. - 2019. – Т. 91. - № 11. – С. 31-36.

33. Нетуберкулезные микобактерии. БИОпрепараты [Текст] / М.В. Макарова, Л.Д. Гунтупова // Профилактика, диагностика, лечение. - 2020. - №20(2). - С. 97-102.
34. Нетуберкулезные микобактерии во фтизиопульмонологической практике в Республике Узбекистан [Текст] / Н.Н. Парпиева [и др.] // Туберкулез и болезни легких. - 2021. - №99(4). - С. 52-56.
35. Новый аттенуированный штамм *Mycobacterium tuberculosis* VN. Характеристика, вакцинные свойства [Текст] / Б.В. Никоненко, [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2021. - №99(10). – С. 60-65.
36. Нетуберкулезные микобактерии и их клиническое значение [Текст] Бобоходжаев О.И., Шарипов Ф.Р. // Душанбе: Типография «Бебок». - 2021. - 190 с.
37. Общая характеристика, особенности культивирования и антибиотикорезистентности представителей *mycobacterium fortuitum* group (обзор литературы) [Текст] / Е. Н. Герасимова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. - 2021. - Т. 66. - №4. - С. 223-228.
38. Опыт применения новых режимов лечения туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя в Республике Беларусь [Текст] / Е.М. Скрягина [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2018. - №96(8). – С. 5-14.
39. Опыт работы с больными нетуберкулезными микобактериозами [Текст] / Е.И. Шмелев [и др.] // Пульмонология. - 2022. - №32(1). - С. 95-102.
40. Определение чувствительности *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам второго ряда с использованием XDR-теста в клинических исследованиях и в международных циклах профессионального тестирования [Текст] / Л.В. Домотенко [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2021. - №99(8). – С. 13-20.
41. Отчётные данные ГУ «Республиканский центр по защите населения от туберкулеза» Министерства здравоохранения и социальной защиты населения Республики Таджикистан, Душанбе. – 2022. -122 с.

42. Очаг туберкулёзной инфекции как риск развития у детей туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью [Текст] / В.А. Аксенова, Н.И. Клевно, С.М. Кавтарашвили // Туберкулез и болезни лёгких. - 2018. – Т. 96. - №1. – С. 11-17.

43. Оценка эффективности экспериментальной тест-платформы на основе антигенспецифической IL-2-продуцирующей способности лимфоцитов в диагностике туберкулеза [Текст] / А. А. Абильбаева [и др.] // Наука о жизни и здоровье. - 2019. – № 4. – С. 29-35.

44. Оценка эффективности нового набора реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду, методом ПЦР по данным клинических испытаний [Текст] / Ю.Л. Микулович [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2023. - №101(4). – С. 46-55.

45. Перспектива использования сывороточных микроРНК в качестве маркеров распада у больных туберкулезом с диагнозом туберкулемы легкого [Текст] / А.М. Гуськов, Г.С. Шепелькова, Эргешова А.Э. // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2019. -№ (Прил. 1). – С. 13.

46. Полногеномное секвенирование лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Казахстане [Текст] / У.А. Кожамкулов [и др.] // Фтизиопульмонология. – 2018. - №1. – С. 59-63.

47. Положение трудовых мигрантов в регионах мира: вызовы пандемии COVID-19 и реакция правительств [Текст] / С.В. Рязанцев, А.Д. Брагин., Н.С. Рязанцев // Научное обозрение. - 2020. - №3. - С. 7-21.

48. Представители *Mycobacterium abscessus* complex у пациентов с бронхолёгочной патологией: распространённость, особенности культивирования и идентификации [Текст] / К.Р. Калимулина [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. - 2020. - Т. 65. - №5. - С. 316-320.

49. Представления об эволюции туберкулезных микобактерий [Текст] / Добин В. Л. // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2018. – Т. 96. - № 8. – С. 59-65.

50. Проблемные вопросы терапии микобактериозов у пациентов с ВИЧ-инфекцией [Текст] / М.А. Савченко, А.М. Пантелеев // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. - 2020. - №12(3). - С. 35-45.

51. Программный комплекс для практической обработки геномных данных микобактерий туберкулеза [Текст] / М.В. Спринджук [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика. - 2019. - URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/programmnyu-kompleks-dlya-prakticheskoy-obrabotki-genomnyh-dannyh-mikobakteriy-tuberkuleza>.

52. Программное обеспечение для обработки данных полногеномного секвенирования микроорганизмов [Текст] / М.В. [и др.] // Туберкулёз и болезни легких. – 2016. - №94(2). – С. 47-54.

53. Развитие, диагностика и лечения туберкулёза с лекарственно-устойчивыми формами в Республике Таджикистан [Текст] / П.У. Махмудова // Симург. - 2021. - №11(3). - С.76-82.

54. Ранние рецидивы туберкулеза легких – эпидемиологические и экономические проблемы [Текст] / Алексеенко С.Н., Дробот Н.Н. // Современные проблемы науки и образования. - 2019. – № 2. – Р. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28739>.

55. Распространение возбудителя с устойчивостью к препаратам первого ряда среди больных туберкулезом в г. Астане [Текст] / Ж.К. Ракишева [и др.] // Туберкулёз и болезни легких. – 2018. -№ 96(8). – С. 50-54.

56. Рецидив туберкулеза легких у больных с изониазид-резистентным туберкулезом [Текст] / И.А. Бурмистрова [и др.] // Туберкулёз и болезни легких. – 2023. - №101(3). – С. 37-43.

57. Риск заболевания туберкулезом и эффективность его химиопрофилактики у трудящихся мигрантов, жителей Республики

Таджикистан [Текст] / О.И. Бобоходжаев [и др.] / Туберкулёз и болезни лёгких. - 2020. – Т.98. - №1. – С.16-21.

58. Риски заболевания туберкулёзом и эффективность химиопрофилактики у трудящихся мигрантов, жителей Республики Таджикистан [Текст] / О.И. Бобоходжаев [и др.] // Туберкулёз и болезни лёгких. - 2020. - №1. – Т.98. – С.16-21.

59. Секвенирование геномов шести клинических штаммов нетуберкулезных микобактерий [Текст] / В.В. Устинова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2018. - №96(12). – С. 70-71.

60. Состав бактериального микробиома мокроты у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких [Текст] / В.Г. Дружинин [и др.] // Пульмонология. – 2023. - №33 (5). – С. 645–656.

61. Структура популяции генетического семейства *Beijing* *Mycobacterium tuberculosis* на территории Западной Сибири [Текст] / А.А. Вязовая [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2020. - №98(5). – С. 32-36.

62. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей посевной серии вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG-1 (Russia) и дочерних изолятов, полученных от детей с БЦЖ-оститами [Текст] / О.В. Нарвская // Туберкулез и болезни легких. – 2021. - № 99 (4). – С. 6-12.

63. Тактика врача при выявлении, диагностике и профилактике сочетанной инфекции ВИЧ и туберкулез [Текст] / Г.Д. Каминский [и др.] Практическое руководство / под ред. И.А. Васильевой. – М., - 2020. – 152 с.

64. Типичные и нетипичные бактериальные возбудители заболеваний дыхательной системы [Текст] / М.Ф. Вечерковская, [и др.] // Практическая пульмонология. - 2021. - №1. - С. 87-94.

65. Туберкулез и микобактериоз легких у больных на поздних стадиях ВИЧ-инфекции [Текст] / А.В. Мишина, В.Ю. Мишин, А.Л. Собкин // Туберкулез и болезни легких. - 2019. - №97 (12). - С. 58-59.

66. Туберкулёз и нетуберкулёзные микобактериозы, возможности их дифференциальной диагностики в Республике Таджикистан [Текст] / Шарипов Ф.Р. // Симург. - 2023. - №18(2). - С. 159-168.

67. Факторы, ассоциированные с развитием рецидива туберкулеза [Текст] / А. А. Абилябаева [и др.] // Туберкулёз и болезни лёгких. - 2022. – №10 (100). - С.30-36.

68. Факторы риска рецидива туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью [Текст] / А.С. Аллилуев [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2020. - №98 (11). – С. 21-26.

69. Частота штаммов *M. tuberculosis* с разной степенью лекарственной устойчивости среди контингентов больных легочным туберкулезом в Кыргызской Республике в 2016 году [Текст] / А.А. Токтогонова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2018. - №96(9). – С. 31-37.

70. Эпидемиологический надзор за туберкулезом: от молекулярных методов к геномным исследованиям [Текст] / О.Б. Огарков, У.Д. Савилов, С.Н. Жданова // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2023; 22(6):155-161. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-6-155-161>

71. Эффективность и безопасность основанных на использовании бедаквилина режимов химиотерапии у больных туберкулезом органов дыхания: непосредственные и окончательные результаты [Текст] / С.Е. Борисов, А.В. Филлипов, Д.А. Иванова // Туберкулез и болезни легких. - 2019. - Т. 97. - №5. - С. 28-42.

72. Эффективность лечения и рецидивы туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией с глубокой иммуносупрессией, начавших антиретровирусную терапию [Текст] / Е.В. Корж [и др.] // Туберкулез и болезни легких. - 2020. - №98(10). - С. 11-18.

73. Эффективность лечения туберкулёза с широкой лекарственной устойчивостью у пациентов с разным генотипом по генам ферментов биотрансформации *CYP2B6* и *NAT2* [Текст] / М.М. Юнусбекова, Л.Я.

Бородина, Ф.С. Билалов // Туберкулез и болезни лёгких. - 2020. - №6. – С. 40-42.

74. A comprehensive evaluation of GeneLEAD VIII DNA platform combined to Deeplex Myc-TB® assay to detect in 8 days drug resistance to 13 Antituberculous drugs and transmission of Mycobacterium tuberculosis complex directly from clinical samples [Text] / I. Bonnet [et al.] // Front. Cell Infect. Microbiol. – 2021. - №11. – P. 707244. doi: 10.3389/FCIMB.2021.707244/FULL.

75. A rapid drug resistance genotyping workflow for Mycobacterium tuberculosis, using targeted isothermal amplification and nanopore sequencing [Text] / H.D. Gliddon [et al.] // Microbiol Spectr. – 2021. - №9. – P. e0061021. doi: 10.1128/SPECTRUM.00610-21.

76. Additional drug resistance for Mycobacterium tuberculosis during turnaround time for drug-susceptibility testing in China: a multicenter observational cohort study [Text] / J. Zhu // Int. J. Infect. Dis. – 2021. - № 108. – P. 81–8. doi: 10.1016/J.IJID.2021.04.027.

77. Adjunctive host-directed therapies for pulmonary tuberculosis: a prospective, open-label, phase 2, randomised controlled trial [Text] / R. S. Wallis [et al.] // Lancet Respir. Med. - 2021. - № 9 (8). – P. 897–908. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30448-3.

78. Advancing host-directed therapy for tuberculosis [Text] / R. S. Wallis and R. Hafner // Nat. Rev. Immunol. - 2015. - № 15 (4). – P. 255–263. doi: 10.1038/nri3813.

79. Antigen-specific b cells direct T follicular-like helper cells into lymphoid follicles to mediate mycobacterium tuberculosis control [Text] / R. V. Swanson [et al.] // Nat. Immunol. - 2023. – P. 1–14. doi: 10.1038/s41590-023-01476-3.

80. Antibiotic susceptibility and genotyping of Mycobacterium avium strains that cause pulmonary and disseminated infection [Text] / K. I. Uchiya // Antimicrob. Agents Chemother. – 2018. – Vol. 64. - № 4. – P. e02035-17. doi: 10.1128/AAC.02035-17.

81. Antimicrobial susceptibility and MIC distribution of 41 drugs against clinical isolates from China and reference strains of nontuberculous mycobacteria [Text] / G. Li [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents.* - 2017. – Vol. 49, № 3. – P. 364–374. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.10.024.

82. Antituberculous effects of statin therapy: a review of literature [Text] / F. Tahir [et al.] // *Cureus.* - 2020. - № 12 (3). – P. e7404. doi: 10.7759/cureus.7404.

83. Anton Ghon and his colleagues and their studies of the primary focus and complex of tuberculosis infection and their relevance for the twenty-first century [Text] / P. R. Donald, A. H. Diacon and S. Thee // *Respiration.* - 2021. - № 100 (7). – P. 557–567. doi: 10.1159/000509522.

84. Application of targeted next-generation sequencing assay on a portable sequencing platform for culture-free detection of drug-resistant tuberculosis from clinical samples [Text] / A.M. Cabibbe [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2020. - №58. – P. e00632. doi: 10.1128/JCM.00632-20.

85. Attrition and delays before treatment initiation among patients with MDR-TB in China (2006–13): magnitude and risk factors [Text] / C. Xu [et al.] // *PLoS One.* – 2019. - № 14. – P. e0214943. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0214943.

86. B cells as mediators of clinically relevant immune responses in tuberculosis [Text] / M. Rao [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* - 2015. - № 61 (suppl_3). – P. S225–S234. doi: 10.1093/cid/civ614.

87. B cells and their regulatory functions during tuberculosis: latency and active disease [Text] / A. G. Loxton // *Mol. Immunol.* - 2019. - № 111. – P. 145–151. doi: 10.1016/j.molimm.2019.04.012.

88. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. – 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240028173>.

89. Characteristics of alveolar macrophages in bronchioalveolar lavage fluids from active tuberculosis patients identified by single-cell RNA sequencing

[Text] / Q. Chen [et al.]// J. Biomed. Res. - 2022. - № 36 (3). – P. 167. doi: 10.7555/JBR.36.20220007.

90. Chronic lung disease in adult recurrent tuberculosis survivors in Zimbabwe: a cohort study [Text] / A. Chin [et al.] // Int. J. Tuberculosis. Lung Dis. - 2019. - №23 (2). – P. 203–211. doi: 10.5588/ijtld.18.0313.

91. Chronic obstructive pulmonary disease in HIV [Text] / K. Byanova [et al.] // Expert Rev. Respir. Med. - 2021. - №15 (1). – P. 71–87. doi: 10.1080/17476348.2021.1848556.

92. Clinical use of whole genome sequencing for Mycobacterium tuberculosis [Text] / A.A. Witney [et al.] // BMC Med. – 2016. - № 14. – P. 46. doi: 10.1186/S12916-016-0598-2.

93. Clinical utility of target amplicon sequencing test for rapid diagnosis of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis from respiratory specimens [Text] / K.S.S. Leung // Front Microbiol. – 2022. -№13. – P. 974428. doi: 10.3389/FMICB.2022.974428.

94. Consequences of rpoB mutations missed by the GenoType MTBDRplus assay in a programmatic setting in South Africa [Text] / N.R. Mvelase [et al.] // Afr. J. Lab. Med. – 2023. - № 12. – P. 1975. doi: 10.4102/AJLM.V12I1.1975.

95. Comparative analysis of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility patterns in Mycobacterium avium complex [Text] / N. Wetzstein [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2020. – № 93. – P. 320-328. doi: 10.1016/j.ijid.2020.02.059.

96. Comparative genomic analysis of Mycobacterium intracellulare: implications for clinical taxonomic classification in pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare complex disease [Text] / Y. Tateishi [et al.] // BMC Microbiol. – 2021. – Vol. 21. - № 1. – P. 103. doi: 10.1186/s12866-021-02163-9.

97. Comparison of R9.4.1/Kit10 and R10/Kit12 Oxford Nanopore flowcells and chemistries in bacterial genome reconstruction [Text] / N.D.

Sanderson // *Microb Genom.* – 2023. - № 9. – P. mgen000910. doi: 10.1099/mgen.0.000910.

98. Compensatory evolution drives multidrug-resistant tuberculosis in Central Asia [Text] / M. Merker // *eLife.* – 2018. – Vol.7. – P. 10.7554/eLife.38200. <https://doi.org/10.7554/eLife.38200>.

99. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium intracellulare*: implications for clinical taxonomic classification in pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* complex disease [Text] / Y. Tateishi [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2021. – Vol. 21. - № 1. – P. 103. doi: 10.1186/s12866-021-02163-9.

100. Current methods and role of next-generation sequencing in the diagnosis of antimicrobial resistance in tuberculosis [Text] / M.C. Rowlinson, K.A. Musser // *Clin. Microbiol. Newsl.* – 2022. - № 44. – P. 1–12. doi: 10.1016/J.CLINMICNEWS.2021.12.001.

101. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 antituberculous drugs [Text] / A. Jouet [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2021. - №57. – P. 2002338. doi: 10.1183/13993003.02338-2020.

102. Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: progress, promise, and challenges [Text] / K.A. Cohen [et al.] // *Genome Medicine.* – 2019. - № 11. – P. 1–18. doi: 10.1186/S13073-019-0660-8.

103. Development and assessment of a novel whole-gene-based targeted next-generation sequencing assay for detecting the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to 14 drugs [Text] / S.H. Wu [et al.] // *Microbiol Spectr.* – 2022. -№ 10. – P. e0260522. doi: 10.1128/spectrum.02605-22.

104. Differential drug susceptibility patterns of *Mycobacterium chimaera* and other members of the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex [Text] / F. P. Maurer [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2019. – Vol. 25. - № 3. – P. 379.e1-379.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.010.

105. Direct detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using targeted next generation sequencing [Text] S.G. Murphy [et al.] // *Front. Public Health*. – 2023. - №11. – P. 1206056. doi: 10.3389/fpubh.2023.1206056.

106. Drug resistance and pathogenic spectrum of patients coinfecting with nontuberculous mycobacteria and human-immunodeficiency virus in Chengdu, China [Text] / D. M. Wang [et al.] // *Chin. Med. J.* – 2019. – Vol. 132. - № 11. – P. 1293-1297. doi: 10.1097/CM9.0000000000000235.

107. Drug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities for diagnosis and treatment [Text] / A. Koch, H. Cox, V. Mizrahi // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2018. - № 42. – P. 7–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.013>, 2018.

108. Drug resistance in nontuberculous mycobacteria: mechanisms and models [Text] / S. Saxena, H. P. Spaink, G. Forn-Cuni // *Biology (Basel)*. – 2021. – Vol. 10/ - № 2. –96. doi: 10.3390/biology10020096.

109. Drug susceptibility testing of slowly growing non-tuberculous mycobacteria using slomyco test-system [Text] / V. Litvinov [et al.] // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, № 9. – P. 0203108. doi: 10.1371/journal.pone.0203108.

110. Drug susceptibility distributions of *Mycobacterium chimaera* and other non-tuberculous mycobacteria [Text] / B. Schulthess [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2021. – Vol. 65. - № 5. – P. e02131-20. doi: 10.1128/AAC.02131-20.

111. Early alveolar macrophage response and IL-1R-dependent T cell priming determine transmissibility of mycobacterium tuberculosis strains [Text] / A. Lovey [et al.] // *Nat. Commun.* - 2022. - №13 (1). – P.884. doi: 10.1038/s41467-022-28506-2.

112. ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis [Text] / J. Augenstreich [et al.] // *Cell. Microbiol.* - 2017. -№ 19 (7). – P. e12726. doi: 10.1111/cmi.12726.

113. Evaluation of whole genome sequencing and software tools for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / J. Van Beek [et al.] // *Clin Microbiol Infect.* – 2019. - № 25. – P. 82–6. doi: 10.1016/J.CMI.2018.03.041.

114. Evaluating the clinical impact of routine whole genome sequencing in tuberculosis treatment decisions and the issue of isoniazid mono-resistance [Text] / M. Park [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2022. - № 22. – P. 349. doi: 10.1186/S12879-022-07329-Y.

115. Factors predictive of the success of tuberculosis treatment: a systematic review with meta-analysis [Text] / N.M.C. Torres [et al.] // *PLoS One.* – 2019. - № 14. – P. e0226507. doi: 10.1371/journal.pone.0226507.

116. False detection of rifampicin resistance using Xpert® MTB/RIF ultra assay due to an A451V mutation in *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / M.M. Fitzgibbon [et al.] // *JAC Antimicrob Resist.* – 2021. -№3. – P. dlab101. doi: 10.1093/JACAMR/DLAB101.

117. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. - 2019. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

118. Foam cell macrophages in tuberculosis [Text] / P. Agarwal, S. Gordon, and F. O. Martinez // *Front. Immunol.* - 2021. - №12. – P. 775326. doi: 10.3389/fimmu.2021.775326.

119. Frequency of the *Mycobacterium tuberculosis* RD(Rio) genotype and its association with multidrug-resistant tuberculosis [Text] / I.N. De Almeida [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2019. – Vol. 19. - № 1. - P. 556. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4152-7>.

120. Genomic characterization of MDR/XDR-TB in Kazakhstan by a combination of high-throughput methods predominantly shows the ongoing transmission of L2/Beijing 94-32 central Asian/Russian clusters [Text] / B.J. Klotoe [et al.] // *BMC Infect. Dis.* – 2019. – Vol. 9. - № 1. - P. 553. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4201-2>.

121. Group 3 innate lymphoid cells mediate early protective immunity against tuberculosis [Text] / A. Ardain, [et al.] // *Nature*. - 2019. - №570 (7762). – P. 528–532. doi: 10.1038/s41586-019-1276-2

122. Heterogeneity in tuberculosis [Text] / A. M. Cadena, S. M. Fortune and J. L. Flynn // *Nat. Rev. Immunol.* - 2017. - № 17 (11). – P. 691–702. doi: 10.1038/nri.2017.69.

123. High proportion of RR-TB and mutations conferring RR outside of the RRDR of the *rpoB* gene detected in GeneXpert MTB/RIF assay positive pulmonary tuberculosis cases, in Addis Ababa Ethiopia [Text] / G.T. Akalu, B. Tessema, B. Petros // *PLoS One*. – 2022. - №17. – P. e0277145. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0277145.

124. High-accuracy long-read amplicon sequences using unique molecular identifiers with nanopore or PacBio sequencing [Text] / S.M. Ghao [et al.] // *Nat. Methods*. – 2021. -№18. – P. 165–9. doi: 10.1038/ s41592-020-01041-y.

125. Histologically confirmed tuberculosis-associated obstructive pulmonary disease [Text] / B. Allwood [et al.] // *Int. J. Tuberculosis. Lung Dis.* - 2019. - № 23 (5). – P. 552–554. doi: 10.5588/ijtld.18.0722.

126. Host-directed therapeutic strategies for tuberculosis [Text] / A. Kolloli and S. Subbian // *Front. Med.* 4, 171. doi: 10.3389/fmed.2017.00171

127. Immunologic and imaging signatures in post tuberculosis lung disease [Text] / S. Singh [et al.] // *Tuberculosis*. - 2022. - № 102244. doi: 10.1016/j.tube.2022.102244.

128. Improved metagenomic analysis with kraken 2 [Text] / D.E. Wood, J. Lu, B. Langmead // *Genome Biol.* – 2019. - № 20. – P. 1–13. doi: 10.1186/S13059-019-1891-0/FIGURES/2.

129. Improving multidrug resistance tuberculosis Papua’s management using whole genome sequencing [Text] / Y. Maladan [et al.] // In: *Advances in Health Sciences Research*. - 2020. - p. 1–7.

130. Improving lung health in low-income and middle-income countries: from challenges to solutions [Text] / J. Meghji [et al.] // *Lancet*. - 2021. - №397 (10277). – P. 928–940. doi: 10.1016/S0140-6736(21) 00458-X.

131. In vitro activity of aminoglycosides, clofazimine, d-cycloserine and dapsone against 83 *Mycobacterium avium* complex clinical isolates [Text] / C. C. Huang [et al.] // *J. Microbiol. Immunol. Infect.* – 2018. – Vol. 51. - № 5. – P. 636–643. doi: 10.1016/j.jmii.2017.05.001.

132. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis* [Text] / I. Mokrousov // *Clin Microbiol Rev.* - 2013. - Vol. 26. - № 2. - P. 342-360.

133. Insight into the biology of *Mycobacterium mucogenicum* and *Mycobacterium neoaurum* clade members [Text] / P.R.K. Behra, [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. - № 9(1). – P. 7–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55464-5>.

134. Macrophage activation highlight an important role for NER proteins in the survival, latency and multiplication of *mycobacterium tuberculosis* [Text] / M. Thakur and K. Muniyappa // *Tuberculosis. (Edinb)*. - 2023. - № 138. – P. 102284. doi: 10.1016/ j. tube.2022.102284

135. Macrophage plasticity as a therapeutic target in tuberculosis [Text] / M. Arish, F. Naz // *Eur. J. Immunol.* - 2022. № 52 (5). – P. 696–704. doi: 10.1002/eji.202149624.

136. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases [Text] / S. Arora [et al.] // *Immunobiology.* - 2018. – № 223 (4-5). – P. 383–396. doi: 10.1016/j.imbio.2017.11.001.

137. Macrophage heterogeneity in the immunopathogenesis of tuberculosis [Text] / M. J. Marakalala [et al.] // *Front. Microbiol.* - 2018. - № 9. – P. 1028. doi: 10.3389/fmicb.2018.01028.

138. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis [Text] / A. Khan, [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* - 2019. - № 106 (2). – P. 275–282. doi: 10.1002/JLB.MR0318-095RR.

139. Macrophage polarization drives granuloma outcome during mycobacterium tuberculosis infection [Text] / S. Marino // *Infect. Immunity*. – 2015. - №83 (1). – P. 324–338. doi: 10.1128/IAI.02494-14.

140. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis [Text] / A. Khan, [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* - 2019. - № 106 (2). – P. 275–282. doi: 10.1002/JLB.MR0318-095RR.

141. Macrophage plasticity as a therapeutic target in tuberculosis [Text] / M. Arish, F. Naz // *Eur. J. Immunol.* - 2022. № 52 (5). – P. 696–704. doi: 10.1002/eji.202149624.

142. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases [Text] / S. Arora [et al.] // *Immunobiology*. - 2018. – № 223 (4-5). – P. 383–396. doi: 10.1016/j.imbio.2017.11.001.

143. Major genotype families and epidemic clones of *Mycobacterium tuberculosis* in Omsk region, Western Siberia, Russia, marked by a high burden of tuberculosis – HIV coinfection [Text] / O. Pasechnik [et al.] // *Tuberculosis (Edinb)*. – 2018. – Vol. 108. – P. 163-168. doi: 10.1016/j.tube.2017.12.003/.

144. Managing antibiotic resistance in nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: challenges and new approaches [Text] / Y. S. Kwon, C. L. Daley, W. J. Koh // *Expert Rev. Respir. Med.* – 2019. – Vol. 13. - № 9. – P. 851-861. doi: 10.1080/17476348.2019.1638765.

145. Mass spectrometry-based identification of new serum biomarkers in patients with multidrug resistant pulmonary tuberculosis [Text] / D. Lin [et al.] // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. - 2019. - Vol.39. - №12. - P.1409-1420.

146. Metformin enhances autophagy and normalizes mitochondrial function to alleviate aging-associated inflammation [Text] / L. P. Bharath, [et al.] // *Cell Metab.* - 2020. - №32 (1). – P. 44–55. e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.04.015.

147. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences [Text] / H. Li // *Bioinformatics*. – 2018. - №34. – P. 3094–100. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTY191.

148. Molecular basis of mycobacterial survival in macrophages [Text] / J. A. Awuh, T. H. Flo // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2017. - №74. – P. 1625–1648. doi: 10.1007/s00018-016-2422-8.

149. Molecular drug resistance profiles of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens using ion semiconductor sequencing [Text] / J. Park [et al.] // *J. Microbiol. Methods.* – 2018. - № 145. – P. 1–6. doi: 10.1016/J.MIMET.2017.12.003.

150. Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* strains [Text] / H.M.A. [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2018. - №8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00114>.

151. Moxifloxacin resistance and genotyping of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* isolates in Japan [Text] / Y. Yamaba [et al.] // *J. Infect. Chemother.* – 2019. – Vol. 25. - № 12. – P. 995-1000. doi: 10.1016/j.jiac.2019.05.028.

152. *Mycobacterium* ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions [Text] / W. H. Conrad [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2017. - № 114(6). - P. 1371–1376. doi: 10.1073/pnas.1620133114.

153. *Mycobacterium tuberculosis* resistance prediction and lineage classification from genome sequencing: comparison of automated analysis tools [Text] / V. Schleusener [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. - № 7. – P. 46327. doi: 10.1038/SREP46327.

154. *Mycobacterium tuberculosis* RD-Rio Strain in Kazakhstan [Text] / Y. Skiba [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2019. - Vol. 25. - № 3. – P. 604-606. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181179>.

155. *Mycobacterium tuberculosis* virulent factor ESAT-6 drives macrophage differentiation toward the pro-inflammatory M1 phenotype and subsequently switches it to the antiinflammatory M2 phenotype [Text] / A. Refai [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* - 2018. - № 8. – P. 327. doi: 10.3389/fcimb.2018.00327.

156. *Mycobacterium tuberculosis* releases an antacid that remodels phagosomes [Text] / J. Buter [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* - 2019. - №15 (9). – P. 889–899. doi: 10.1038/s41589-019-0336-0.
157. Nanopore technology and its applications in gene sequencing [Text] / B. Lin, J. Hui, H. Mao // *Biosensors.* – 2021. - № 11. – P. 214. doi: 10.3390/bios11070214.
158. Neutrophils in tuberculosis—first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? [Text] / T. Dallenga and U. E. Schaible // *Pathog. Dis.* - 2016. - № 74 (3). doi: 10.1093/femspd/ftw012.
159. Neutrophils in tuberculosis-associated inflammation and lung pathology [Text] / C. N. Muefong and J. S. Sutherland // *Front. Immunol.* - 2020. - №11. – P. 962. doi: 10.3389/fimmu.2020.00962.
160. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections [Text] / J. Besser[et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2018. - № 24(4). – P. 335–41. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.013>.
161. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease [Text] / S. Cowman [et al.] // *Eur. Respir. J.* – 2019. – Vol. 54. - № 1. – P. 1900250. doi: 10.1183/13993003.00250-2019.
162. Oxford Nanopore announces positive evaluation of new method for rapid drug-resistant tuberculosis (DR-TB) profiling [Text] // - 2023. - <https://nanoporetech.com/about-us/news/oxford-nanopore-announces-positive-evaluation-new-method-rapid-drug-resistant>.
163. Patient outcomes associated with post-tuberculosis lung damage in Malawi: a prospective cohort study [Text] / Meghji J. [et al.] // *Thorax.* – 2020. - № 75 (3). – P. 269–278. doi: 10.1136/thoraxjnl-2019-213808.
164. Persisting positron emission tomography lesion activity and mycobacterium tuberculosis mRNA after tuberculosis cure [Text] / S. T. Malherbe [et al.] // *Nat. Med.* - 2016. - № 22 (10). – P. 1094–1100. doi: 10.1038/nm.4177.

165. Phenotypic analysis of peripheral b cell populations during mycobacterium tuberculosis infection and disease [Text] / W. J. Du Plessis [et al.] // *J. Inflamm.* - 2016a - № 13(1). – P. 23. doi: 10.1186/s12950-016-0133-4.

166. Population structure of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Central Asia [Text] / A. Engström [et al.] // *BMC Infectious Diseases.* – 2019. № 19 (1). - e908.

167. Posttuberculosis lung impairment: systematic review and meta-analysis of spirometry data from 14 621 people [Text] / O. Ivanova [et al.] // *Eur. Respir. Rev.* - 2023. -№ 32 (168). – P. 220221. doi: 10.1183/16000617.0221-2022.

168. Post-tuberculous lung function impairment in a tuberculosis reference clinic in Cameroon [Text] / B.H.M. Ngahane [et al.] // *Respir. Med.* - 2016. - № 114. – P. 67–71. doi: 10.1016/j.rmed.2016.03.007.

169. Prediction of drug resistance by sanger sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains isolated from multidrug resistant tuberculosis suspect patients in Ethiopia [Text] / E.A. Mesfin [et al.] // *PLoS One.* – 2022. - № 17. – P. e0271508. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0271508.

170. Prevalence and extent of heteroresistance by next generation sequencing of multidrug-resistant tuberculosis [Text] / D.J. Operario [et al.] // *PLoS One.* – 2017. - № 12(7). – P. 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181284>.

171. Prevalence of chronic respiratory disease in urban and rural Uganda [Text] / T. Siddharthan [et al.] // *Bull. World Health Organ.* - 2019. - № 97 (5). P. 318–327. doi: 10.2471/BLT.18.216523.

172. Previous tuberculosis disease as a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional analysis of multicountry, population-based studies [Text] / K. Kamenar [et al.] // *Thorax.* - 2021. - №77 (11). – P. 1088–1097. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-216500.

173. Progress of the art of macrophage polarization and different subtypes in mycobacterial infection [Text] / G. Ge [et al.] // *Front. Immunol.* - 2021. – № 4570. doi: 10.3389/fimmu.2021.752657.

174. Pulmonary BCG induces lung-resident macrophage activation and confers long-term protection against tuberculosis [Text] / E. Mata [et al.] // *Sci. Immunol.* - 2021. - № 6 (63). – P. eabc2934.

175. Pyrosequencing for diagnosis of multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis: a systemic review and meta-analysis [Text] / E. Getachew [et al.] // *J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis.* – 2021. - № 24. – P. 100254. doi: 10.1016/J.JCTUBE.2021.100254.

176. Rapid drug susceptibility testing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical samples by use of amplicon sequencing: a proof-of-concept study [Text] / R.E. Colman [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* - 2016. - № 54. – P. 2058–67. doi: 10.1128/JCM.00535-16.

177. Rapid identification of drug resistance and phylogeny in *M. tuberculosis*, directly from sputum samples [Text] / M. Barbosa-Amezcuca [et al.] // *Microbiol. Spectr.* – 2022. - № 10. – P. e0125222. doi: 10.1128/SPECTRUM.01252-22.

178. Risk factors associated with development of pulmonary impairment after tuberculosis [Text] / K. Gandhi, S. Gupta and R. Singla // *Indian J. Tuberculosis.* - 2016. - № 63 (1). – P. 34–38. doi: 10.1016/j.ijtb.2016.01.006.

179. Routine surveillance for the identification of drug resistant tuberculosis in Tanzania: a cross-sectional study of stakeholders' perceptions [Text] / B.E. Doulla [et al.] // *PLoS One.* - 2019. - №14. – P. e0212421. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0212421.

180. Simple assay to detect Central Asia Outbreak clade of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype [Text] / E. Shitikov [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2019. – May 1. pii: JCM.00215-19. doi: 10.1128/JCM.00215-19.

181. Some synonymous and nonsynonymous *gyrA* mutations in *Mycobacterium tuberculosis* lead to systematic false-positive fluoroquinolone resistance results with the Hain GenoType MTBDRsl assays [Text] / A. Ajileye [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2017. - № 61. – P. e02169. doi: 10.1128/AAC.02169-16.

182. Targeted sequencing workflows for comprehensive drug resistance profiling of *Mycobacterium tuberculosis* cultures using two commercial sequencing platforms: comparison of analytical and diagnostic performance, turnaround time, and cost [Text] / K. Tafess [et al.] // *Clin. Chem.* – 2020. - № 66. – P. 809–20. doi: 10.1093/CLINCHEM/HVAA092.

183. TARM-1 is critical for macrophage activation and Th1 response in mycobacterium tuberculosis infection [Text] / X. Li [et al.] // *J. Immunol.* - 2021. - № 207 (1). P. 234–243. doi: 10.4049/jimmunol.2001037.

184. The burden and determinants of post-TB lung disease [Text] / S. Mpagama [et al.] // *Int. J. Tuberculosis. Lung Dis.* – 2021. - № 25 (10). – P. 846–853. doi: 10.5588/ijtld.21.0278.

185. The immune mechanisms of lung parenchymal damage in tuberculosis and the role of host-directed therapy [Text] / C. Stek [et al.] // *Front. Microbiol.* - 2018.- № 9. – P. 2603. doi: 10.3389/fmicb.2018.02603.

186. The immunoregulatory landscape of human tuberculosis granulomas [Text] / E. F. McCaffrey // *Nat. Immunol.* - 2022. - № 23 (2). – P. 318–329. doi: 10.1038/s41590-021-01121-x.

187. The functional response of b cells to antigenic stimulation: a preliminary report of latent tuberculosis [Text] / W. J. Du Plessis [et al.] // *PloS One.* - 2016b. -№ 11 (4). – P. e0152710. doi: 10.1371/journal.pone.0152710.

188. The macrophage: a disputed fortress in the battle against mycobacterium tuberculosis [Text] / C. J. Queval, R. Brosch and R. Simeone // *Front. Microbiol.* – 2017. - № 8. – P. 2284. doi: 10.3389/fmicb.2017.02284.

189. The role of ESX-1 in mycobacterium tuberculosis pathogenesis [Text] / K.W. Wong // *Microbiol. Spectrum.* - 2017. - № 5 (3). – P. 5.3. 02. doi: 10.1128/microbiolspec.TB2- 0001-2015.

190. The tuberculous granuloma and preexisting immunity [Text] / S. B. Cohen, B. H. Gern and K. B. Urdahl // *Annu. Rev. Immunol.* - 2022. - №40. – P. 589–614. doi: 10.1146/annurevimmunol-093019-125148.

191. The whole-genome sequencing in predicting Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and resistance in Papua, Indonesia [Text] / Y. Maladan [et al.] // DMC Genomics. – 2021. - № 22 (844). - <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08139-3>.

192. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics [Text] / Y. Wang [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2020. - № 48(D1). – P. D1031–41. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz981>.

193. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: policy guidance [Text]. – 2023. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/246131>.

194. TGF β restricts expansion, survival, and function of T cells within the tuberculous granuloma [Text] / B. H. [et al.] // Cell Host Microbe. – 2021. - № 29 (4). – P. 594–606. e6. doi: 10.1016/j.chom.2021.02.005.

195. Transmission phenotype of mycobacterium tuberculosis strains is mechanistically linked to induction of distinct pulmonary pathology [Text] / S. Verma [et al.] // PloS Pathogens. - 2019. - №15 (3). – P. e1007613. doi: 10.1371/journal.ppat.1007613.

196. Treatment of highly drug-resistant pulmonary tuberculosis [Text] / F. Conradie [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2020. - №382. - P. 893–902. doi: 10.1056/NEJMOA1901814/SUPPL_FILE/NEJMOA1901814_DATASHARING.PDF.

197. Tuberculosis—advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers [Text] / R. S. Wallis [et al.] // Lancet Infect. Dis. - 2016. - № 16 (4). – P. e34–e46. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00070-0.

198. Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology [Text] / S. Ravimohan [et al.] // Eur. Respir. Rev. - 2018. - № 27 (147). – P. 170077. doi: 10.1183/16000617.0077-2017.

199. Tuberculosis and chronic respiratory disease: a systematic review [Text] / A. L. Byrne [et al.] // *Int. J. Infect. Dis.* - 2015. - № 32. – P. 138–146. doi: 10.1016/j.ijid.2014.12.016.

200. Tuberculosis-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages [Text] / T. Dallenga [et al.] // *Cell. Host. Microbe.* - 2017. - № 22 (4). – P. 519–30.e3. doi: 10.1016/j.chom.2017.09.003.

201. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies [Text] / N. Du Plessis [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2018. -№18 (7). – P. e183–ee98. doi: 10.3389/fcimb.2018.00332.

202. Turnaround time of whole genome sequencing for mycobacterial identification and drug susceptibility testing in routine practice [Text] / I.D. Oлару [et al.] // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2018. - № 24. – P. 659.e5–7. doi: 10.1016/J.CMI.2017.10.001.

203. Twelve years of SAMtools and BCFtools [Text] // P. [et al.] // *Gigascience.* - 2021. - № 10. – P. 1–4. doi: 10.1093/ GIGASCIENCE/GIAB008.

204. Type I IFN inhibits alternative macrophage activation during mycobacterium tuberculosis infection and leads to enhanced protection in the absence of IFN-g signaling [Text] / L. Moreira-Teixeira [et al.] // *J. Immunol.* - 2016. - № 197 (12). – P. 4714–4726. doi: 10.4049/ jimmunol.1600584.

205. Ultrarapid nanopore genome sequencing in a critical care setting [Text] / J.E. Gorzynski [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2022. - № 386. – P. 700–2. doi: 10.1056/NEJMc2112090.

206. WHO Announces updated definitions of extensively drug-resistant tuberculosis. – 2021. - Available at: <https://www.who.int/news/item/27-01-2021-whoannounces-updated-definitions-of-extensively-drug-resistant-tuberculosis>.

207. WHO. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of the tuberculosis and rifampicin resistance:

Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update. - Geneva: WHO. – 2013. – 79 p.

208. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. - 2016 update. WHO/HTM/TB/2016.04. - Geneva: World Health Organization, 2016 – 64 p.

209. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* directly from clinical samples for high-resolution genomic epidemiology and drug resistance surveillance: an observational study [Text] / G.A. Goig [et al.] // *The Lancet Microbe*. – 2020. - № 1(4). – P. e175–83. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30060-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30060-4).

210. Whole-genome sequencing has the potential to improve treatment for rifampicinresistant tuberculosis in high-burden settings: a retrospective cohort study [Text] / H. Cox [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2022. - № 60. – P. e0236221. doi: 10.1128/jcm.02362-21.

211. World Health Organization. Global tuberculosis report 2024. - Geneva: WHO. - 2024. – 69 p.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

[1-А] Пирмахмадзода, Б.П. Бремя туберкулеза и туберкулеза в сочетании с ВИЧ-инфекцией в г. Душанбе [Текст] / Б.П. Пирмахмадзода, З.Х. Тиллоева, Х. С. Шарифзода // Туберкулёз и болезни лёгких. - 2021. – № 2. - Т. 99. – С. 40-44.

[2-А] Пирмахмадзода, Б.П. Актуальность применения ототоксических аминогликозидов в практике фтизиатрии [Текст] / М.Г. Урунбаева, М.И. Махмудназаров, А.Б. Сангинов, Б.П. Пирмахмадзода // Медицинский вестник национальной академии наук Таджикистана. - 2021. - №39. – Т. 3. – С. 104-111.

[3-А] Пирмахмадзода, Б.П. Эпидемиологический надзор за туберкулёзом в г.Душанбе: пути совершенствования [Текст] / А.А. Сиджотхонов, З.Х. Тиллоева, Н.Дж. Джафаров, Б.П. Пирмахмадзода // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2022. - № 3. – Т. 100. – С. 33-38.

[4-А] Пирмахмадзода, Б.П. Оценка информативности отчетной формы по туберкулёзу в Республике Таджикистан [Текст] / З.Х. Тиллоева, Б.П. Пирмахмадзода, А.Х. Махмадов, К.Р. Сафаров // Здоровоохранение Таджикистана. - 2022. - №2 (355). – С. 87-92.

[5-А] Пирмахмадзода, Б.П. Секвенирование генома микобактерий туберкулеза [Текст] // Доклады Национальной академии наук Таджикистана. - 2023. - № 9-10. - Т. 66. – С. 615-620.

[6-А] Пирмахмадзода, Б.П. Состояние проблемы и идентификация нетуберкулезных микобактерий у лиц с туберкулезом легких [Текст] / Б.П. Пирмахмадзода, О.И. Бобоходжаев // Симург. – 2024. - №22(2). – С. 126-133.

[7-А] Пирмахмадзода, Б.П. Эффективность диагностики и лечения нетуберкулезных микобактериозов легких в Республике Таджикистан [Текст] / О.И. Бобоходжаев, Б.П. Пирмахмадзода, Ф.Р. Шарипов, Х.Х. Киёмиддинов // Вестник ЦНИИТ. – 2024. - №2(27). – Т.8. – С. 26-36.

[8-A] Пирмахмадзода, Б.П. Вирусные гепатиты В и С у больных легочным туберкулёзом [Текст] / З. Тиллоева, С. Азимова, А. Раджабзода, Б. Пирмахмадзода // Проблемы гастроэнтерологии. - 2019. - №2. – С. 13-16.

[9-A] Пирмахмадзода, Б.П. Закономерности эпидемического процесса и эффективность лечения больных туберкулезом с разными спектрами лекарственной устойчивости в Республике Таджикистан [Текст] / О. И. Бобоходжаев, Б.П. Пирмахмадзода, У.Ю. Сироджидинова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2023. - № 2. – Т. 101. - С.73-79.

Статьи и тезисы в других научных изданиях

[10-A] Pirmahmadzoda, B.P. Treatment success using novel and adapted treatment regimens in registered DR-TB children in Dushanbe, Tajikistan, 2013-2019 [Text] / B. Pirmahmadzoda, K. Hann, K. Akopyan, Z. Tilloeva // J. Infect. Dev. Ctries. – 2021. - № 15(9.1). – pp. 7S-16S. doi:10.3855/jidc.14798.

[11-A] Пирмахмадзода, Б.П. Эффективность внедрения методов диагностики нетуберкулёзных микобактериозов легких в Республике Таджикистан [Текст] / Ф.Р. Шарипов, Б.П. Пирмахмадзода, О. Кабиров // 10-й Региональный симпозиум по вопросам лечения туберкулёза в Восточной Европе и Центральной Азии “Научный прорыв: решение проблемы лекарственно-устойчивого туберкулёза в наших руках”. - 2023. - С. 90-93.

[12-A] Pirmahmadzoda, B.P. Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex Using the Xpert MTB/RIF Ultra Assay on the Stool of Pediatric Patients in Dushanbe, Tajikistan [Text] / Michael L. Rekart [et al.] // [www.http://journals.asm.org/journal/spectrum](http://www.journals.asm.org/journal/spectrum) on 10 January 2023 by 109.75.53.222.

[13-A] Pirmahmadzoda, B.P. A case report of a child with probable drug resistant tuberculous pericarditis with a review of challenges involved in diagnosis, treatment and follow up of children with DR-TB pericarditis [Text] / A. Swaminathan, P. du Cros, J. Achar, B. Pirmahmadzoda // BMC Infectious Diseases. - 2020. - №20. – pp. 298.

[14-A] Pirmahmadzoda, B.P. Tuberculosis in key populations in Tajikistan – a snapshot in 2017 [Text] / Zulfiya Tilloeva, Seda Aghabekyan, Karapet Davtyan,

Bobojon Pirmahmadzoda, [et al.] // The journal of Infection Developing Countries. – 2020. – pp.11952. [www.http: Article Text-118511-1-10-20201123](http://www.http://Article%20Text-118511-1-10-20201123).

[15-A] Pirmahmadzoda, B.P. Excellent treatment outcomes amongst children with drug-resistant tuberculosis: a cohort study from Tajikistan [Text] / J. Achar, J. Kliescikova, B. Pirmahmadzoda // 50-th World Conference on Lung Health of the International Union Against // Tuberculosis and Lung Disease (The Union). – 2019. - S.262.

[16-A] Pirmahmadzoda, B.P. Family directly observed therapy for children with drug resistant TB [Text] / Michael L. Rekart [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. 26(8): 792–794 - 2022.

[17-A] Пирмахмадзода, Б.П. Туберкулез и COVID-19 в г.Душанбе: полученные уроки и возможные последствия [Текст] / Б.П. Пирмахмадзода, З.Х. Тиллоева, С.М. Одинаева // В материалах научно-практической конференции на тему: «Коронавирусная инфекция в Республике Таджикистан: эпидемиология, диагностика и современные возможности лечения». - 2020. - С. 145-146.

[18-A] Пирмахмадзода, Б. П. Особенности распространения детского туберкулёза в Душанбе: Обзор данных 2018-2024 [Текст] / О. Одинаева, Б.П. Пирмахмадзода, С.Р. Наимов // В материалах научно-практической конференции, XX (юбилейная) научно–практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием, посвященная годам развития цифровой экономики и инновации 2025-2030 «Интеллектуальные технологии в медицинском образовании и науке: инновационные подходы». - 2025. - Т.1. – С. 400.

Аббревиатура противотуберкулёзных препаратов

Препарат	Аббревиатура
Пероральные препараты первого ряда	
Изониазид (Isoniazid)	H
Рифампицин (Rifampicin)	R
Этамбутол (Ethambutol)	E
Пиразинамид (Pyrazinamide)	Z
Инъекционные препараты	
Канамицин (Kanamycin)	Km
Амикацин (Amikacin)	Am
Капреомицин (Capreomycin)	Cm
Стрептомицин (Streptomycin)	S
Фторхинолоны (FQ)	
Левифлоксацин (Levofloxacin)	Lfx
Моксифлоксацин (Moxifloxacin)	Mfx
Офлоксацин (Ofloxacin)	Ofx
Другие препараты второго ряда с бактериостатической активностью	
Этионамид (Ethionamide)	Eto
Протионамид (Prothionamide)	Pto
Циклосерин (Cycloserine)	Cs
Теризидон (Terizidon)	Trd
Парааминосалициловая кислота (PAS)	PAS
Антибактериальные препараты, применяемые в лечении ЛУ-ТБ	
Клофазимин (Clofazimine)	Cfz
Линезолид (Linezolid)	Lzd
Амоксициллин /Клавулановая кислота (Amoxicillin + clavulanic acid)	Amx/Clv
Тиоацетазон (Tiacetazone)	Thz
Кларитромицин (Clarithromycin)	Clr
Имипенем (Imipenem)	Ipm
Виомицин (Viomycin)	Vm
Деламанид (Delamanide)	Dlm
Бедаквилин (Bedaquiline)	Bdq
Претоманид (Pretomanid)	Pa

