

Министерство образования и науки Республики Казахстан  
Комитет науки  
ЦЕНТР НАУК О ЖИЗНИ НАЗАРБАЕВ УНИВЕРСИТЕТА

УДК 613.62:304.3:622.33

№ госрегистрации 0111РК00442

Инв. №. \_\_\_\_\_

УТВЕРЖДАЮ

генеральный директор ЦНЖ

\_\_\_\_\_ Ж.Ш.Жумадилов

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2012 г.

ОТЧЕТ  
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

КАРТИРОВАНИЕ ЭКО-СОЦИАЛЬНЫХ  
И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К  
ТУБЕРКУЛЕЗУ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН  
(промежуточный)

Зам.генерального директора ЦНЖ

\_\_\_\_\_

Р.Б.Исаева

Руководитель темы

\_\_\_\_\_

А.М.Терликбаева

Астана - Алматы 2012

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

### ЦИГЗЦА

Руководитель темы, MSc	_____	А.М.Терликбаева (введение, 1,2,3, заключение)
Директор проекта, кмн, ЦИГЗЦА	_____	М.А.Даришева (2,3,4)
Зам.директора, кмн, ЦИГЗЦА	_____	Б.Б.Амиров ( 3, 6)
Координатор проекта, ЦИГЗЦА	_____	Д.А.Бекишев (3)
Координатор проекта, ЦИГЗЦА	_____	С. С. Кускулова (3)
IT специалист, ЦИГЗЦА	_____	П.И.Гуляев (6,7)

### **Вклады партнеров, использованные материалы и выражение признательности:**

При составлении данного отчета Центр изучения глобального здоровья в Центральной Азии (ЦИГЗЦА) использовал материалы партнеров – участников выполнения данной НТП «Картирование эко-социальных и генетических факторов, определяющих восприимчивость к туберкулезу населения Республики Казахстан», а именно Национального Центра проблем туберкулеза Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Городского противотуберкулезного диспансера г.Алматы, ОЮЛ Ассоциация фтизиатров Казахстана, Института географии РК.

ЦИГЗЦА выражает признательность директору НЦПТ, доктору медицинских наук, профессору Т.Ш.Абилдаеву, заместителю директора НЦПТ, доктору медицинских наук Бекембаевой Г.С., главному научному сотруднику, доктору медицинских наук, профессору Аленовой А.Х., заведующей референс бактериологической лаборатории

Бисмилде В.Л. и другим сотрудникам НЦПТ. В отчете были использованы статистические и эпидемиологические данные за 2012 годы по ТБ и МЛУ-ТБ, данные из реестра, использованы консультации специалистов НЦПТ по выборке, объему набора участников исследования, критериям пригодности индекс-участников, обучению полевого штата исследовательским процедурам, координации пилотного исследования в г.Алматы, формированию групп участников исследования, проведению этической экспертизы протоколов и инструментов исследования, оценки материально-технической оснащенности региональных партнеров и налаживанию рабочих контактов с региональными партнерами. ЦИГЗЦА выражает искреннюю признательность за сотрудничество и бесценный опыт, который НЦПТ и его руководство привносят в выполнение данной научно-технической программы.

ЦИГЗЦА выражает благодарность главному врачу Городского противотуберкулезного диспансера г.Алматы Мукушеву Н.Р. за предоставление временного полевого офиса и помощь в организации исследования на базе ГПТД, заведующей по лечению новых случаев туберкулеза ГПТД Битаевой А.М, заведующей бактериологической лаборатории ГПТД Аубакировой М.Б. и другим сотрудникам за помощь в формировании групп участников исследования, отбору в проект индекс-участников и его внутреннего контроля, предоставление клинической и лабораторной информации, обеспечение доступа к биоматериалам и его транспортировку в референс-лабораторию НЦПТ.

ЦИГЗЦА выражает свою признательность за плодотворное сотрудничество и вклад в коллективное выполнение данного проекта Ассоциацию фтизиатров РК. При участии президента Ассоциации фтизиатров РК, академика АН РК, доктора медицинских наук, профессора Муминова Т.А. и доктора медицинских наук Жакипбаевой Б.Т. и доцента Бейсембаевой Ш.А. разработаны протоколы по геномному компоненту, транспортировке биоматериала, проведено обучение полевого штата вопросам биобезопасности в генетических исследованиях, в ходе пилотного исследования осуществлен контроль качества сбора (венозная кровь) и транспортировки (венозная кровь, ДНК *M.tuberculosis*) в лабораторию геномики ЦНЖ, осуществлен анализ литературных данных по лабораторной диагностике, эпидемическому контролю ТБ в РК, подготовлены материалы для публикации.

Центр изучения глобального здоровья в Центральной Азии выражает также большую

признательность коллективу Института географии РК, выполнявшему картографическую часть данной научно-исследовательской работы (глава 5 данного отчета), под руководством заместителя директора Института, доктора географических наук, профессора, Акияной Ф.Ш., с участием М.А.Аскаровой, Р.Ю.Токмагамбетовой, К.Б.Егембердиева, А.А.Тулеповой и других.

ЦИГЗЦА также выражает особую признательность зарубежным участникам проекта, д-рам Нилу Шлугеру, Сандро Галеа, Али Гарави, Винсету Эскуйеру и другим консультантам и экспертам, принимавшим участие и оказавшим содействие в выполнении данной НТП.

## РЕФЕРАТ

Отчет 89 с., 7 ч., 15 рис., 1 табл., 64 источников.

Ключевые слова: ТУБЕРКУЛЕЗ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ФАКТОРЫ РИСКА, ВОСПРИИМЧИВОСТЬ, МЛУ-ТБ, ГЕНОТИП, ФЕНОТИП, АЛЛЕЛЬ, ДНК, СЕКВЕНИРОВАНИЕ, MIRU-VNTR, ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ ИНФОРМАЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ (ГИС), КАРТОГРАФИРОВАНИЕ, ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, ИНТЕРВЬЮИРОВАНИЕ.

Объектом исследования являются больные с впервые выявленным ТБ легких (индекс), здоровые контактные (внутрисемейный контроль) и здоровый неконтактный (внешний контроль).

Цель работы - Оценить роль внешнесредовых (эко-социальных) и генетических факторов в формировании восприимчивости к туберкулезной инфекции а также влияние фенотипических и генотипических свойств микобактерий туберкулеза на клиническое течение, исходы заболевания и развитие эпидемического процесса туберкулеза.

В работе использован комплекс современных эпидемиологических и социологических методов исследования: соэкспертная оценка, аналитический обзор, ретроспективный эпидемиологический анализ, информационный поиск, картографирование в программе ГИС, интервьюирование, метод фокус-групп, статистические методы (Excel, SAS), позволяющих выполнить запланированный объем исследований.

В результате пилотного исследования в г.Алматы осуществлено тестирование протоколов и инструментов исследования (компьютеризированная анкета в Датстат на казахском и русском языках, формы информированного согласия, прескрининга, скрининга, ИРК). Отработаны алгоритмы рекрутинга участников исследования (индекс-случай, контроль из домохозяйства, контроль из сообщества); получения информированного согласия; сбора и транспортировки биоматериала для генетических исследований; компьютеризированного опроса в Датстат; сбора клинической и лабораторной информации согласно протоколам исследования. Осуществлен сбор и транспортировка венозной крови, ДНК *M.tuberculosis* в ЦНЖ НУ, в г.Астана. Отработан механизм взаимодействия партнеров в вопросах формирования групп участников исследования, контроля качества над сбором, транспортировки биоматериала. Проведено обучение (тренинг) исполнителей проекта из г.Алматы, Алматинской, Кызыл-Ординской

и Костанайской областей этическим аспектам с последующей сдачей теста по этическим аспектам и получением сертификата, практическим вопросам рекрутинга, критериям пригодности и скрининга, основным правилам работы в Датстат для ввода данных и скайп для мониторинга и обмена информацией, процедурам сбора, хранения и транспортировки биоматериала в рамках программы, биобезопасности в микробиологических и генетических исследованиях. Полевое оборудование с программой DatStat передано исполнителям проекта в регионы.

Таким образом, осуществлена подготовка к проведению основной фазы исследования (июль-декабрь 2012), которая включает формирование групп участников исследования, сбор биообразцов, сбор отдельных данных по демографической, социально-экономической, экологической ситуации на районном уровне. Обучены и обеспечены полевым оборудованием исполнители проекта из г.Алматы, Алматинской, Кызыл-Ординской и Костанайской областей.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	13
1 Изучение эпидемиологических и генетических факторов риска развития ТБ и МЛУ ТБ в современных условиях (обзор литературы).....	18
1.1 Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Республике Казахстан.....	18
1.2 Определение роли различных генотипов <i>микобактерий туберкулеза</i> в патогенезе болезни и процессе развития эпидемии туберкулеза .....	26
1.3 Определение роли генетических факторов человека в формировании восприимчивости к туберкулезу.....	33
2 Дизайн, материалы и методы исследования.....	39
2.1 Дизайн, материалы и методы пилотного исследования.....	41
3. Алгоритм и анализ пилотного исследования.....	45
3.1 Организация и координация пилотного исследования.....	47
3.2 Описание пилотного исследования в части касающейся рекрутинга участников	49
3.3 Сбор и транспортировка биоматериала (венозная кровь).....	51
3.4 Выделение и транспортировка ДНК <i>M.Tuberculosis</i> .....	52
3.5 Безопасность исследователей.....	54
3.6 Результаты пилотного исследования.....	54
4. Обучение полевого штата (исполнителей проекта) из Алматинской, Кзыл-Ординской и Костанайской областей и г.Алматы протоколам, процедурам и этическим аспектам исследования .....	61
5 Картографирование.....	65
6. Реализация интерактивного картирования .....	70

7. Накопление и управление данными проекта .....	76
Заключение.....	81
Список использованных источников.....	85



## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете применяются следующие термины с соответствующими определениями:

**Устойчивость штаммов комплекса *M. Tuberculosis*** - Согласно методу пропорций, устойчивость штамма *M. tuberculosis* отличается от понятия устойчивости, обычно используемого в клинической микробиологии. При использовании метода пропорций высчитывается доля устойчивых бацилл в штамме. Если она ниже определенной пропорции, штамм относится к чувствительным, если выше – к устойчивым. Предполагается, что штамм устойчив, когда на питательной среде, содержащей определенную концентрацию (критическую концентрацию) лекарственного препарата, отмечается рост инокулята в пропорции, превышающей определенную величину (критической пропорции).

**Туберкулез** – инфекционное заболевание, вызываемое микобактериями туберкулёза, характеризующееся образованием патологических изменений в любых тканях, главным образом в легких.

**Вновь выявленный случай (новый случай)** – больной туберкулезом, никогда ранее не принимавший противотуберкулезные препараты или принимавший их менее одного месяца.

**Легочный туберкулез с положительным результатом микроскопии мокроты** (бактериовыделитель) больной, у которого:

при микроскопии мокроты до проведения лечения не менее чем двукратно обнаружены МБТ;

при микроскопии мокроты однократно обнаружены МБТ и при рентгенологическом исследовании выявлены патологические изменения, соответствующие по заключению врача активному туберкулезу легких.

**Бактериовыделение** – наличие микобактерий туберкулёза в мокроте методом бактериоскопии мазка и посевом.

**Бактериоскопия** – лабораторная методика обнаружения микобактерий туберкулёза под микроскопом.

**Туберкулез с сохраненной лекарственной чувствительностью** – сохранена чувствительность ко всем противотуберкулезным препаратам;

**Легочный туберкулез** – заболевание, при котором в патологический процесс вовлечена паренхима легкого.

**Очаг туберкулезной инфекции** – место нахождения больного туберкулезом

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ТБ: туберкулез

МЛУ ТБ: туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью

ЛУ: лекарственная устойчивость

МБТ: микобактерия туберкулеза

РК: Республика Казахстан

БСМ: бактериоскопия мазка

МБТ+: бактериовыделение

МБТ-: без бактериовыделения

ВОЗ: Всемирная организация здравоохранения

ПТП: противотуберкулезные препараты

ПТО: противотуберкулезные организации

ТЛЧ: тестирование на лекарственную чувствительность

ИК: инфекционный контроль

Н:изониазид

Р:рифампицин

ЦНЖ НУ: Центр наук о жизни Назарбаев Университета

НЦПТ: Национальный центр проблем туберкулеза

МЗ РК: Министерство Здравоохранения Республики Казахстан

АФ: Ассоциация фтизиатров

ИГ: Институт географии

ЦИГЗЦА: Центр изучения глобального здоровья Центральной Азии

ПТД: противотуберкулезный диспансер

АГПТД: Алматинский городской противотуберкулезный диспансер

ОПТД: Областной противотуберкулезный диспансер

ПМСП: Первичная медико-санитарная помощь

ГФСТМ: Глобальный фонд по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией

ДГСЭН: Департамент государственного санитарно-эпидемиологического надзора

СНГ: Содружество Независимых Государств

РФ: Российская Федерация

ВИЧ/СПИД: вирус иммунодефицита человека/ Синдром Приобретённого

иммунодефицита

НПРАА: Health Insurance Protection Accountability Act.

АИ: ассистент исследователя

ПИН: персональный идентификационный номер

ДНК: дезоксирибонуклеиновая кислота

ЭК: этический комитет

МТК: микобактерии туберкулезного комплекса

НПП: Национальная противотуберкулезная программа

НПТБ: Национальная программа по борьбе с туберкулезом

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность**

Туберкулез (ТБ) является второй по значимости причиной смерти от какого-либо одного инфекционного агента, уступая лишь ВИЧ/СПИДу. По данным ВОЗ в 2010 году 8,8 миллиона человек заболели ТБ и 1,4 миллиона человек умерли от этой болезни. Более 95% случаев смерти от ТБ происходит в странах с низким и средним уровнем дохода, и эта болезнь является одной из трех основных причин смерти женщин в возрасте от 15 до 44 лет. В связи с этим, туберкулез продолжает наносить огромный ущерб человечеству и уносить больше человеческих жизней, чем любое другое инфекционное заболевание. В последние два года ситуация усугубляется глобальным экономическим кризисом. Согласно прогнозам, туберкулез останется одним из десяти наиболее серьезных заболеваний в мире до 2020 года [1,2].

В Казахстане туберкулез как социально обусловленное заболевание продолжает оставаться серьезной проблемой общественного здравоохранения. По официальным данным ВОЗ, Казахстан занимает лидирующее положение по регистрируемой заболеваемости туберкулезом и входит в число 18 приоритетных стран по туберкулезу Европейского региона ВОЗ. Кроме того, показатель распространенности туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (ТБ МЛУ) является одним из самых высоких в мире.

В Казахстане борьба с туберкулезом является приоритетным направлением и ее особая актуальность обусловлена политической поддержкой Главы Государства и Правительства Республики Казахстан. Национальная противотуберкулезная программа (НПП) осуществляется на государственном уровне и интегрирована в национальную систему здравоохранения. Основной целью контроля над туберкулезом в РК является снижение распространения инфекции путем своевременного выявления больных туберкулезом, выделяющих микобактерии туберкулеза (МБТ) и качественное лечение больных всеми формами туберкулеза [3].

Несмотря на то что за последний пятилетний период наблюдается снижение показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза (со 132,1 до 95,5 и с 20,3 до 10,3 на 100 тыс. населения), эпидемиологическая ситуация остается напряженной [4]. Резкое увеличение заболеваемости туберкулезом по данным ВОЗ отмечено в 1995 (135 на 100

тыс. населения), в 2000 (196 на 100 тыс. населения) и 2004 (223 на 100 тыс. населения), что заставило национальную систему здравоохранения внедрять новые подходы к контролю над туберкулезом [5]. Начиная с 1998 года, Министерство здравоохранения Казахстана (МЗ) приступило к реализации стратегии DOTS в рамках новой Национальной программы борьбы с туберкулезом (НПТБ), в рамках которой осуществляется контроль, профилактика и лечение туберкулеза в Казахстане

НПТБ обеспечивает бесплатное лечение туберкулеза для жителей республики через централизованную сеть противотуберкулезных диспансеров, больниц и поликлиник. Хотя поликлиники могут проводить предварительную диагностику туберкулеза, а затем служить в качестве локальных пунктов для продолжения лечения, они сначала направляют все подозрительные случаи в специализированные противотуберкулезные учреждения [6]. В настоящее время система противотуберкулезной помощи включает 315 лабораторий для микроскопию, Казахстан является единственной центрально-азиатской республикой, где все области могут выполнять тестирование на лекарственную устойчивость, а генотипирование по Хейну в настоящее время осуществляется в 10 из 14 областях. Так как заболеваемость туберкулезом достигла своего пика в Казахстане в 2003 и 2004, в рамках НПТБ достигнуты некоторые успехи в сдерживании дальнейшего роста; однако, МЛУ-ТБ представляет собой растущие проблемы для здоровья населения. ВОЗ сообщает, что 14% (диапазон 11-18%) всех вновь выявленных случаев туберкулеза в Республике Казахстан составляют случаи ТБ с множественной лекарственной устойчивостью. Среди повторных случаев 45% являются положительными на МЛУ. Важно отметить, что, поскольку регистрация случаев началась в 1998 году, процент успеха лечения в стране новых случаев заболевания туберкулезом был постоянно ниже рекомендуемых ВОЗ  $\geq 85\%$  излечения. На самом деле, уровень успешного лечения снизился до 62% в 2009 году после достигнутого ранее максимума в 79% [7,8]. Проблема усугубляется высоким уровнем МЛУ-ТБ в пенитенциарной системе, где заболеваемость МЛУ ТБ может быть в пять раз выше, чем среди общего населения. С повышением заболеваемости МЛУ ТБ в течение последних двух десятилетий вырос интерес к социальным, экономическим и экологическим детерминантам ТБ. Контекстуальная среда, в которой люди живут и работают, очень важна для понимания и сдерживания этого заболевания [10].

Понимание причин «ножниц» между показателями заболеваемости ТБ и МЛУ ТБ, различий в географическом распределении ТБ и МЛУ ТБ, а также определения

«неизвестного фактора риска» в практике национальной отчетности будет иметь решающее значение для разработки эффективной стратегии борьбы с туберкулезом в Республике Казахстан и снижения распространения МЛУ штаммов туберкулеза. В связи с этим, существует необходимость системного подхода к анализу характеристик процесса эпидемии туберкулеза и составляющих элементов с выявлением особенностей влияния на них социально-экономических факторов, факторов окружающей среды и других детерминант.

**Цель исследования:** Оценить роль внешнесредовых (эко-социальных) и генетических факторов в формировании восприимчивости к туберкулезной инфекции, а также влияние фенотипических и генотипических свойств микобактерий туберкулеза на клиническое течение, исходы заболевания и развитие эпидемического процесса туберкулеза.

**Задачи исследования:**

1. Изучить внешнесредовые (социально-экономические, экологические) и внутренние (сопутствующие заболевания, состояние питания, иммунный статус и др.) факторы индивидуального и популяционного риска заражения и развития туберкулеза путем проведения компьютеризированного анкетирования среди 180 субъектов исследования.

2. Оценить генетические факторы риска развития туберкулеза, его отдельных клинических форм и признаков, в том числе посредством: а) изучения полиморфизма генов SLC11A1, VDR, MBL, NOS2A, IL1B, ILRA, IL12B, IL1RN и др. б) установления дискриминирующей способности различных MIRU-VNTR-локусов для субтипирования штаммов МБТ доминирующего генотипа (Beijing) и разработкой предложений по оптимальному набору локусов для их эффективного типирования, и. Провести молекулярно-эпидемиологический анализ штаммов *M.tuberculosis* и оценить влияние штаммов различных генотипов МБТ на развитие различных клинических форм туберкулеза, тяжесть и исходы заболевания, проявления эпидемического процесса, связь генотипа с лекарственной устойчивостью возбудителя и изучить биологические свойства, включая лекарственную устойчивость, штаммов МБТ, выделенных от обследуемых больных ТБ и оценить их популяционную вариабельность в трех изучаемых регионах.

3. Провести *многофакторный анализ* и математическое моделирование тенденций развития эпидемического процесса туберкулезной инфекции с использованием социально-экономических, экологических и генетических факторов риска и обосновать группы населения с высоким риском заболевания.

4. Разработать комплексную программу эффективного, своевременного выявления больных туберкулезом (критерии ранней диагностики), определить приоритетные направления профилактических, лечебных и противоэпидемических мероприятий, социальной профилактики, совершенствования эпидемиологического надзора и контроля данной инфекции в Казахстане.

#### **Научная новизна и теоретическая значимость исследования:**

Впервые в Казахстане с использованием международных стандартов к методологии научных исследований будет проведено комплексное изучение экологических, социально-экономических, поведенческих, генетических факторов индивидуального и популяционного риска заражения и развития туберкулеза, на основании чего будут предложены прогностические признаки, наиболее рациональные подходы к ранней диагностике, профилактике и контролю.

Изучение популяционной вариабельности микобактерий туберкулеза важно для развития фундаментальных основ медицинской микробиологии и генетики. Впервые в Казахстане будет дана оценка клинического и эпидемического значения различных генотипов микобактерий. Будет оценена дискриминирующая способность различных MIRU-VNTR-локусов для субтипирования штаммов МБТ доминирующего генотипа (Beijing), циркулирующих на территории РК. Данные генотипирования будут поданы для включения в Международную базу микобактерий, что позволит участвовать в международных исследованиях глобальной эпидемиологии туберкулеза и филогении микобактерий.

Впервые в Казахстане будут использованы современные географические информационные технологии в биомедицинских и эпидемиологических исследованиях, что позволит оценить геопространственное распределение и распространение инфекции, выявить очаги наибольшей концентрации и визуализировать эпидемиологический процесс, а также основные факторы, влияющие на него.



### **Практическая значимость:**

Применение методологии комплексного подхода для анализа эпидемиологии туберкулеза позволит объективно оценить эпидситуацию, роль основных эко-социальных факторов риска развития ТБ и МЛУ ТБ в Казахстане на современном этапе, и определить приоритетные направления эпидемиологического надзора и контроля, предложить меры по оптимизации профилактики среди отдельных социальных групп.

Будет создана математическая модель кратко- и среднесрочного прогнозирования уровня заболеваемости и развития эпидемического процесса туберкулезной инфекции, учитывающая влияние наиболее значимых эко-социальных и *генетических* факторов подверженности к заболеванию, что позволит рационализировать планирование профилактических, лечебных и противоэпидемических мероприятий.

Выявленные ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов подверженности к туберкулезу позволят прогнозировать риск развития заболевания на индивидуальном уровне.

Будут предложены наборы MIRU-VNTR-локусов для эффективной дифференциации штаммов МБТ доминирующего в РК генотипа Beijing, что позволит повысить эффективность этиологической диагностики и информативность молекулярно-эпидемиологических исследований при туберкулезе, проводить эпидемиологический надзор на современном уровне.

Будет проведена комплексная оценка системы эпидемиологического надзора и мониторинга за ТБ и МЛУ ТБ в Казахстане, с использованием молекулярно-генетических методов, что позволит в будущем внедрить компонент молекулярно-генетического мониторинга в систему эпидемиологического надзора за ТБ инфекцией в Казахстане

Впервые будут использованы современные ГИС-технологии для геокартирования распространенности ТБ и МЛУ ТБ и дальнейшего совершенствования системы эпидемиологического надзора и контроля за инфекцией.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **1. Изучение эпидемиологических и генетических факторов риска развития ТБ и МЛУ ТБ в современных условиях (обзор литературы)**

Туберкулез принято считать социально-обусловленным заболеванием и связь различных социально-демографических, экономических и экологических факторов с заболеваемостью туберкулезом хорошо представлена в мировой литературе и описана в предыдущем отчете по выполняемой НТП. В настоящем отчете, мы хотели бы поподробнее остановиться на обзоре и анализе эпидемиологической ситуации в Казахстане за первый квартал 2012 года и дать предварительную оценку причин продолжающейся напряженности эпидемиологической ситуации в стране. Кроме того, мы обсудим роль различных генотипов микобактерий туберкулеза в процессе развития эпидемии туберкулеза в мире и в Казахстане на современном этапе, а также факторы, определяющих генетическую предрасположенность человека к туберкулезу, как на основе обзора мировой литературы, так и собственных исследований наших партнеров по проекту, Национальной Ассоциации Фтизиатров Казахстана.

#### **1.1 Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Республике Казахстан и меры по достижению целевых индикаторов**

В целях реализации Государственной Программы развития здравоохранения Республики Казахстан «Саламатты Қазақстан» на 2011-2015гг., Постановления Правительства Республики Казахстан от 21.12.2007г. № 1263 «О мерах защиты населения от туберкулеза в Республике Казахстан», Межведомственного Рабочего Плана по координации реализации противотуберкулезных мероприятий на 2008-2012гг. и нормативных актов по туберкулезу, в республике реализуется комплекс противотуберкулезных мероприятий, направленных на снижение бремени туберкулеза и туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) [11].

По данным Национального центра проблем туберкулеза МЗ РК (НЦПТ), интенсивные мероприятия по профилактике туберкулеза позволили снизить

заболеваемость населения бациллярной формой туберкулеза, уровень которой в I квартале 2012г. достиг 5,8 против 6,8 за аналогичный период 2011г. на 100 тыс.населения. Вместе с тем, в таких областях, как Акмолинская – 7,4; Атырауская – 8,8; Кызылординская – 10,5 на 100 тыс.населения ситуация остается напряженной.

Вместе с тем, поставщиками запущенных случаев туберкулеза являются Алматинская (0,6%), Атырауская (0,8%), Карагандинская (0,8%), Павлодарская (0,7%), Северо-Казахстанская (1,7%) области и г.Астана (0,5%) при республиканском показателе – 0,3%.

Отрицательным моментом в ухудшении качественного показателя заболеваемости туберкулезом является удельный вес больных туберкулезом МЛУ ТБ среди впервые выявленных, который повысился на 6,3% и составил 11,7% против 11,0% в 2010г., среди подростков данный показатель увеличился на 8,2% и составил 14,5% против 13,4% в 2010г. Особенно высок удельный вес МЛУ ТБ среди впервые выявленных больных ТБ подростков в г.Алматы – 29,4%, Жамбылской – 24,5%, Актюбинской – 22,2%, Мангистауской – 21,6%, Атырауской – 19,2% областях, а среди детей- в Северо-Казахстанской – 20,0%.

Результатом недостаточного взаимодействия противотуберкулезной службы с организациями ПМСП по вопросу раннего выявления туберкулеза, является выявление больных с деструктивными изменениями в легких как среди взрослых и подростков, так и у детей, соответственно 35,4% и 15,0%. Так, в Атырауской, Карагандинской, Павлодарской и Северо-Казахстанской областях в 33,3-100,0% случаях среди впервые выявленных больных детей регистрируются лица с деструктивными изменениями в легких.

### *Смертность от туберкулеза*

В республике отмечается стойкая тенденция снижения смертности от туберкулеза, особенно значимо среди впервые выявленных - до 4,5%.

Сравнительный анализ показателя смертности населения по стране по итогам I квартала 2012г. свидетельствует о снижении абсолютного числа умерших с 389 до 313 человек, показатель смертности снизился на 20,8% и составил 7,5 против 9,6 за аналогичный период 2011г. на 100 тыс. населения.

Рост показателя смертности отмечается в Мангистауской - на 69,0%, Павлодарской – на 22,2% областях. Показатель смертности, превышающий республиканский уровень (7,5), сохраняется в Восточно-Казахстанской – 15,2; Карагандинской – 9,7; Кызылординской – 10,1; Костанайской – 8,2; Мангистауской – 8,8; Павлодарской – 13,4 областях на 100 тыс. населения.

В структуре умерших лиц от туберкулеза по итогам I квартала 2012г. наибольший удельный вес составляют больные IV категории – 56,9%; больные из I категории составляют – 4,5%; из II категории – 31,3%. Умершие от туберкулеза на территории КУИС МВД РК составляют 6,7 %. Из общего числа умерших больные с МЛУ ТБ составляют 59,1%. Гистологически диагноз туберкулеза подтвержден в 67,4%.

### *МЛУ ТБ*

Казахстан относится к странам в мире с высоким уровнем распространенности туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ). Так, уровень первичной множественной лекарственной устойчивости в 2011г. составил 19,1%, а приобретенной – 53,3%. Увеличение количества выявленных больных МЛУ ТБ связано с улучшением диагностики и внедрением в стране ускоренных высокоспецифичных молекулярно-генетического методов ВАСТЕС MGIT-960, Hain-test . G-Xpert будет внедряется в 2012г. в 2 пилотных областях , г. Алматы, НРЛ) республики, его внедрение позволит своевременно диагностировать лекарственно-устойчивые формы туберкулеза и назначить адекватное лечение с учетом чувствительности. С увеличением обследования больных туберкулезом на ТЛЧ, заболеваемость туберкулезом МЛУ ТБ в 2011г. составила 10,1 против 10,5 в 2010г. на 100 тыс. населения (снижение на 3,8%). За I квартал 2012г. заболеваемость МЛУ ТБ снизилась с 2,3 в 2011г. до 2,2 на 100 тыс. населения (снижение на 4,3%).

В настоящее время во всех областных и региональных противотуберкулезных диспансерах выполняются мероприятия по охвату больных культуральными исследованиями и постановкой теста на лекарственную чувствительность (ТЛЧ) к противотуберкулезным препаратам I и II ряда. По стране ТЛЧ охвачено 98,2% впервые выявленных и 98,9% повторных больных. Вместе с тем, высокий показатель первичной лекарственной устойчивости, превышающий более 1,5 раза республиканский уровень

отмечается в Актюбинской – 35,9%, Восточно-Казахстанской – 33,9%, Мангистауской - 33,7%, Павлодарской -32,0% областях и в г. Алматы – 32,4%.

На основании разработанной стратегии контроля над МЛУ ТБ, при дополнительном финансировании из грантов проектов 6 и 8 раундов Глобального фонда по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией (ГФСТМ), ежегодно увеличивается охват адекватным лечением больных МЛУ ТБ в режиме ДОТС - плюс. Охват лечением больных МЛУ ТБ противотуберкулезными препаратами второго ряда в 2011г. составил 66,9%. В рамках Госпрограммы развития здравоохранения Республики Казахстан «Саламатты Қазақстан» на 2011-2015гг. и грантов ГФСТМ планируется достижение указанного показателя до 85%.

На сегодняшний день Мангистауская область (89%) и г.Алматы (85%) уже достигли данного стандарта, тогда как в других областях охват лечением ПВР не достигает 60%, Восточно-Казахстанской – 52,3%, Павлодарской – 57,8%, Южно-Казахстанской-58,4, Северо-Казахстанской - 58,6% и Кызылординской областях -59,5%.

Когортный анализ эффективности лечения за I квартал 2012г. у впервые выявленных больных с бактериовыделением при сохраненной лекарственной чувствительности свидетельствует о достижении показателя «успешности лечения» в 81,6% случаях. Успешность лечения новых случаев с бактериовыделением при сохраненной чувствительности оказалась ниже 80% в таких областях, как Акмолинской – 72,6%, Карагандинской- 74,1%, Костанайской – 76,9%, Восточно-Казахстанской - 78,2% и в г. Астане (78,6%).

Все регионы в I квартале 2012г. полностью охвачены первой поставкой противотуберкулезных препаратов, как основного, так и резервного ряда.

### *Социальная поддержка*

Значительная доля больных туберкулезом и МЛУ ТБ принадлежит к уязвимым и социально-дезадаптированным группам населения, таким как бывшие осужденные, мигранты, лица, страдающие алкогольной и наркотической зависимостью, ВИЧ-инфицированные. В связи с этим, огромную роль в повышении эффективности лечения и приверженности больных к лечению играет социальная мотивация больных туберкулезом на амбулаторном этапе. Практика оказания социальной помощи и выплаты поощрительного вознаграждения больным осуществляется во всех регионах. Только в

2011г. объем выделенного денежного ассигнования Акиматами на поддержку больных составил 257,8 млн.тенге, против 216,5 млн. тенге в 2010г. по республике. За I квартал 2012г. социальная помощь оказана 6 879 больным туберкулезом на сумму 60 449,1 тыс.тенге.

#### *Профилактические осмотры населения*

По итогам I квартала 2012г. количество лиц из группы «риска», подлежащих флюорографическому осмотру, по республике составило 4 699 503, охвачено флюорографическим осмотром – 1 012 884 (21,6%). Пospисочная сверка прошедших флюорографическое обследование лиц из группы «риска» проводится учреждениями ПМСП ежемесячно в разрезе участков. Медицинским центрам и учреждениям, не имеющих на балансе флюорографические установки, согласно их заявке, областной противотуберкулезный диспансер на договорной основе предоставляет передвижные установки. Курирующими фтизиатрами и специалистами из туботдела территориальных ДГСЭН еженедельно контролируется своевременность дообследования флюороположительных лиц.

Эпидемиологическое обследование бациллярных очагов проводится участковыми фтизиатрами совместно со специалистами ДГСЭН на основании приказа МЗ РК от 17.06.2011г. № 404 «О мерах совершенствования мероприятий по борьбе с туберкулезом в Республике Казахстан».

#### *Противоэпидемические мероприятия в очагах туберкулезной инфекции*

По республике по итогам I квартала 2012г. насчитывается 70 174 контактных лиц, состоящих на диспансерном учете, из них взрослых – 36 821, подростков – 4 847, детей - 28 501. За указанный период 2012г. заболело взрослых контактных туберкулезом – 29, подростков – 8, детей – 14. Заболеваемость контактных составила соответственно 0,08%; 0,2%; 0,05%. Наибольшее число заболевших контактных лиц туберкулезом в Восточно-Казахстанской -10 (взрослых – 7, детей -3), Костанайской – 7(взрослых – 6, детей -1) и Южно-Казахстанской – 8 (взрослых –3, подростков – 2, детей -3). Контактные дети своевременно изолируются из очагов туберкулезной инфекции и оздоравливаются в детских противотуберкулезных санаториях и учреждениях санаторного типа.

Обязательная химиопрофилактика контактными детям и подросткам проводится согласно приказа МЗ РК от 25.04. 2011г. № 218 «О некоторых вопросах по борьбе с туберкулезом».

#### *Реструктуризация коечного фонда*

Согласно Постановлению Правительства РК от 21.12.2007г. № 1263 «О мерах защиты населения от туберкулеза в Республике Казахстан» и приказа МЗ РК от 10.03.2009г. №129 «Об усилении мер по предупреждению формирования резистентных форм туберкулеза», последовательно осуществлялась реструктуризация коечного фонда противотуберкулезных организаций (ПТО) в стране, что способствовало принятию решений разделения потоков больных по эпидемиологическому статусу, согласно их лечебной категории и лекарственной чувствительности. Приоритетом лечения в условиях высокоспециализированных областных и городских противотуберкулезных диспансеров определены больные МЛУ ТБ. Во всех регионах реализуются утвержденные Планы мероприятий по усилению инфекционного контроля (ИК) в ПТО, определены задачи руководителей по приведению этих организаций в соответствии с международными требованиями. На базе НЦПТ МЗ РК создана постоянно действующая комиссия по инфекционному контролю. На сегодня в большинстве противотуберкулезных стационарах республики созданы условия для разделения больных по моностатусу и при госпитализации больных в стационары регионы придерживаются рекомендаций комиссии по инфекционному контролю НЦПТ МЗ РК. Эффективные мероприятия по реструктуризации коечного фонда проведены в Акмолинской, Жамбылской и Мангистауской областях. Примером является Акмолинская область, в которой соответствие состояний противотуберкулезных стационаров к требованиям инфекционного контроля положительно оценены специалистами по ИК международной неправительственной организации KNCV. Для приведения стационаров в соответствие требованиям ИК в республике за I квартал 2012г. сокращено 175 коек в маломощных неэффективно используемых стационарах Алматинской и Костанайской областях. Несмотря на приоритет использования межрайонных туберкулезных больниц на территории страны, в Атырауской и Карагандинской областях нет разделения межрайонных ПТО для больных с сохраненной чувствительностью в зависимости от бактериовыделения.

В целом, в большинстве регионов для больных туберкулезом без бактериовыделения предпочтение отдается стационарному лечению, что противоречит рекомендациям ВОЗ. Основной причиной содержания данной категории больных в условиях стационара является недостаточная организация амбулаторного этапа лечения, слабое взаимодействие с сетью ПМСП и отсутствие достаточной социальной поддержки больных на амбулаторном этапе лечения со стороны местных органов власти. Больше всего больничных туберкулезных коек для больных без бацилловыделения выделены в Павлодарской – 38,1% из всей имеющейся коечной мощности, Кызылординской – 31,4% и Западно-Казахстанской – 30,5%.

Снижение резервуара туберкулезной инфекции, особенно с множественной лекарственной устойчивостью, возможно, при достаточной изоляции больных с хроническими формами туберкулеза с созданием хороших условий в стационарах. В настоящее время стационары для изоляции указанной категории больных открыты во всех регионах, однако, количество коек для изоляции не соответствует контингенту Восточно-Казахстанская – 141 больной, коек 55). Карагандинская (125/45), Кызылординская (93/70), Павлодарская (больных 62, коек - 35), Северо-Казахстанская (больных 44, коек 20). При этом в большинстве областей, за исключением Мангистауской, Акмолинской, Жамбылской и Атырауской, условия содержания в имеющихся стационарах данного контингента не способствуют длительному нахождению больных в них.

Таким образом, в I квартале 2012г. в республике действует 117 ПТО с коечной мощностью 13073, в которых развернуто 18 отделений на 530 коек для принудительного лечения больных с заразной формой туберкулеза, уклоняющихся от лечения, 38 отделений МЛУ ТБ на 2682 койки и 23 отделения для изоляции хроников на 780 коек.

#### *Эпидемиологический анализ, проведенный в рамках настоящей НТП*

Проведенный в 2011 г. в рамках настоящего исследования [12] анализ случаев впервые выявленных больных туберкулезом из национального регистра с 2007-2010 гг. по областям Казахстана, выявил похожую картину [3]. В 2007 г. показатель заболеваемости ТБ составил 126,4 случаев, а в 2010 г. эта цифра значительно снизилась до 95,3 случаев на 100 тыс. населения ( $p = 0.02$ ). В девяти областях Казахстана из 14-ти наблюдалось существенное снижение уровня заболеваемости туберкулеза в период 2007 – 2010 гг. (Акмолинская, Актюбинская, Атырауская, Карагандинская, Костанайская,



Кызылординская, Мангистауская, Северо-казахстанская и Павлодарская области). Аналогично, существенно снизилась распространенность с 283,6 случаев в 2007 до 166,3 случаев на 100 тыс. населения в 2010 г. ( $p < 0.01$ ).

Однако, в тот же период показатель заболеваемости МЛУ ТБ на национальном уровне увеличился с 5,8 случаев в 2007 до 10,5 случаев на 100 тыс. населения в 2010 г. ( $p = 0.12$ ). В четырех из 14 областей наблюдались существенные статистически значимые изменения в уровне заболеваемости МЛУ ТБ (Алматинская, Актюбинская, Атырауская и Кызылординская области). Распространенность МЛУ ТБ увеличилась с 54,4 случаев в 2007 до 61,6 случая на 100 тыс. населения в 2010 ( $p = 0.25$ ). Показатель заболеваемости ТБ и МЛУ-ТБ распределяется неравномерно по стране. Так, в Атырауской и Мангистауской области отмечается существенное снижение уровня заболеваемости ТБ в сочетании с относительно большим увеличением уровня заболеваемости МЛУ-ТБ.

Нами также проводился анализ индивидуальных факторов риска среди впервые выявленных больных туберкулезом в национальном регистре. Индивидуальные факторы, включенные в анализ, определялись наличием их в регистре, и включали: употребление алкоголя, дети или молодежь из уязвимых групп, наличие диабета, история употребления наркотиков, тюремное заключение в течение последних двух лет, статус мигранта, нерегулярное употребление противотуберкулезных препаратов, сотрудники пенитенциарной системы, недавно родившие женщины (в течение одного года после выставления диагноза), зарегистрированный контакт ТБ или МЛУ-ТБ, сотрудника противотуберкулезного учреждения и «неизвестный фактор риска».

Из 26 собранных характеристик, 7 имели наибольшую связь с новыми случаями ТБ, включая: зарегистрированные контакты с ТБ ( $p = 0.02$ ), находящиеся в заключении в течение последних 2 лет ( $p = 0.03$ ), имеющие «неизвестный фактор риска» ( $p = 0.03$ ), определяющие себя как служащие ( $p = 0.05$ ), определяющие себя как рабочие ( $p = 0.05$ ), определяющие себя как безработные ( $p = 0.04$ ) и определяющие себя как задержанные ( $p = 0.03$ ). Показательно то, что свыше 85% случаев имели «неизвестные факторы риска», выявленные при диагностике.

В целом по стране, **возможными причинами напряженной эпидемиологической ситуации являются:**

- высокий уровень множественной лекарственной устойчивости (первичная МЛУ – 19,1%; приобретенная – 53,3%) и, возможно, особая вирулентность мульти-резистентных

штаммов, циркулирующих на территории РК, способных распространяться быстрее, чем обнаружиться первый больной – источник МЛУ ТБ.

- распространение ВИЧ-инфекции среди населения (более 13 тыс.) В некоторых исследованиях, ВИЧ-инфицированные с ТБ чаще приобретают резистентность к препаратам, особенно к рифампицину, в ответ на нерегулярный прием препаратов [13].

- проблемы внешней и внутренней миграции населения. Это предположение поддерживается высоким показателем МЛУ ТБ в двух районах с высоким уровнем миграции. Большинство мигрантов приезжают в РК из соседних центрально-азиатских стран с высокой распространенностью ТБ. Предыдущие исследования показали более высокий уровень МЛУ ТБ среди иностранцев [14].

- сложившаяся неблагоприятная обстановка в пенитенциарной системе

- недостаточный инфекционный контроль в ПТУ гражданской и пенитенциарной системы,

- недостаточная работа в очагах инфекции по своевременной изоляции контактных (особенно детей и подростков)

## **1.2. Определение роли различных генотипов *микобактерий туберкулеза* в патогенезе болезни и процессе развития эпидемии туберкулеза в современных условиях.**

Рост заболеваемости туберкулезом ставит новые задачи в области выявления очагов и изучения путей распространения инфекции. Традиционные методы бактериологической диагностики туберкулеза имеют очень ограниченные возможности для внутривидовой дифференциации штаммов микобактерий. В последнее время эти задачи решаются на основе современных методов молекулярной эпидемиологии. Генотипирование микобактерий является основой для высокодостоверных клинико-эпидемиологических исследований при выявлении источника заражения, диагностики нозокомиальной инфекции, дифференциации эндогенной реактивации возбудителя или экзогенной суперинфекции, уточнения причин неблагоприятного течения заболевания, обнаружения лабораторной кросс-контаминации. Применение молекулярно-биологических технологий позволяет на качественно новом уровне подойти к решению проблем диагностики, лечения и профилактики туберкулеза. Определение новых генетических маркеров идентификации и типирования возбудителей позволит разработать

и внедрить в практику клинических лабораторий информативные ускоренные и более экономичные методы и ПЦР-тест-системы для диагностики туберкулеза.

Комплексное использование различных методов генотипирования (RD-, MIRU- и VNTR-типирование, PCR – RFLP, сполиготипирование, биологические микрочипы и др.) штаммов микобактерий туберкулеза позволяет получить более точные данные о свойствах различных штаммов микобактерий туберкулеза, циркулирующих в регионах; выявить эпидемиологически значимые варианты и типы, с которыми связано наиболее тяжелое течение заболевания.

Однако эти методы пока не нашли применения в условиях Казахстана, где эпидемиологическая ситуация является неблагоприятной в течение многих десятилетий. Республиканская служба здравоохранения остро нуждается в тщательном научном анализе структуры циркулирующей популяции возбудителя туберкулеза, для прогнозирования территориальных особенностей течения эпидемического процесса и организации противоэпидемических мероприятий.

Изучение наследственных и условно-наследственных заболеваний, предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям, внедрение молекулярно-генетических методов диагностики, лечения и профилактики ряда актуальных для Казахстана заболеваний положило основу для развития молекулярной медицины в Казахстане. Большой вклад в развитие этого направления внесли российские научные школы. Некоторые из этих разработок внедрены в исследования по молекулярной медицине в Казахстане.

Одной из приоритетных проблем в Казахстане остается высокая заболеваемость населения такими инфекциями как туберкулез, вирусные гепатиты, СПИД и др. Впервые в Казахстане под руководством профессора Т.А.Муминова начато изучение генетической структуры популяций микобактерий туберкулеза из различных регионов Казахстана, молекулярно-генетических механизмов лекарственной устойчивости к химиопрепаратам. Показано, что геном микобактерий туберкулеза является структурно лабильным и содержит большое количество повторов и делеций, роль которых в адаптации микобактерий туберкулезного комплекса (МТК) к организму человека и животных не известна. Тем не менее, эти делеции и повторы локализуются в геноме в определенных местах и могут служить маркерами клонального происхождения штаммов. В частности, интерес вызывает область RD7, которая, как стало известно, делетирована у

*Mycobacterium bovis*, *M. microtii*, *M. caprae*, *M. africanum* субтип I, но присутствует у *M. tuberculosis*, *M. africanum* субтип II, *M. canettii*. Таким образом, наличие или отсутствие этой области может служить дифференцирующим признаком при генотипировании МТК.

Аmplification участка *senX3regX3* области RD7, у разных видов микобактерий имеет разное число так называемых MIRU-элементов, что позволяет проводить дифференциацию видов также по размеру ампликонов. Наконец, амплификация участка гена *gugB* давала ампликон, рестрикционный полиморфизм которого способствовал дифференциации *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*. Таким образом, доминирующим возбудителем туберкулеза у человека на территории Казахстана является *M. Tuberculosis* [18].

Развитие лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* на фоне роста заболеваемости отражает весь драматизм, сложившейся в настоящее время эпидемической ситуации по туберкулезу. Одной из причин высокого уровня распространения лекарственноустойчивого туберкулеза является циркуляция штаммов *M. tuberculosis* определенных генотипов (Beijing с VNTR-профилем 2435), обладающих мультирезистентностью к противотуберкулезным препаратам и представляет наибольшую эпидемическую опасность. Сполиготимирование проведено совместно с д.м.н. Нарвской О.В. (лаборатория молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Пастера), а по методам генотипирования микобактерий консультативную помощь оказали сотрудники Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН лаборатории М.Л.Филиппенко.

В КазНМУ, используя «ТБ-биочип (МДР)», разработанный в Институте молекулярной биологии РАН им. В.А.Энгельгардта (Москва) изучен спектр мутаций устойчивости к рифампицину и изониазиду в генах *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* 160 штаммов микобактерий туберкулеза, изолированных от больных из различных регионов Казахстана. В качестве контроля использован референтный штамм H37Rv. Удалось обнаружить широкий спектр мутаций устойчивости к рифампицину в гене *groB*. Наиболее часто выявлялись мутации в 531-кодоне (78,1%). Доминирующими оказались мутации *Seg aLeu*. Устойчивость к изониазиду определялась по частоте мутаций генов *katG* (83,1%) и *inhA* (17,3%). Эти данные весьма важны для подбора соответствующих методов лечения, к тому же доказана высокая специфичность испытанного набора биочипов [18].

Методами молекулярной биологии было установлено, что современная популяция штаммов МБТ является неоднородной. Генетические различия выявлены как между штаммами, циркулирующими в пределах одного географического региона, так и в разных частях мира. Оценка генетического разнообразия популяции штаммов МБТ позволяет выявлять доминирующие генотипы и проводить мониторинг за распространением определенных штаммов с целью изучения динамики эпидемического процесса [19].

Одним из ключевых моментов программ контроля туберкулеза является не только своевременный диагноз и адекватная терапия, но и обязательное раннее выявление источника заражения для предупреждения дальнейшего распространения инфекции. Традиционные эпидемиологические методы расследования не позволяют выявить эпидемиологические связи в большинстве случаев заболевания, что обусловлено как особенностями течения инфекции (длительный инкубационный период, латентные формы), так и сложностью и длительностью культурального метода исследования и ограниченными возможностями эпидмаркирования на основе фаготипирования и антибиотикограммы штаммов, поскольку число фаготипов микобактерий туберкулеза ограничено, а профиль лекарственной чувствительности того или иного штамма МБТ является нестабильным [20]. Высокодостоверно обосновать источник инфекции в очагах туберкулеза позволяют современные методы генотипирования [21,22]. Сложность оценки молекулярно-генетическими методами факторов вирулентности МБТ определяется генетическими особенностями возбудителя. Можно сказать, что разнообразие клинических ответов на инфекцию определяется не столько наличием того или иного гена патогенности, сколько регуляцией экспрессии этого гена у микроорганизма в условиях макроорганизма.

В целом, опыты на животных и эпидемиологические исследования показали, что чувствительные и лекарственно-устойчивые штаммы МБТ обладают разной степенью патогенности [23]. Такие различия могут быть обусловлены выявленной в последние годы генетической неоднородностью вида *Mycobacterium tuberculosis*. Так, штаммы МБТ семейства Beijing, циркулирующих на Северо-Западе РФ, характеризуются высокой степенью множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) - 64,6% [21] и достоверно более высокой частотой высокой и средней вирулентности для мышей в сравнении со штаммами других генотипов. У больных, выделяющих МБТ генотипа Beijing, наблюдаются более выраженные симптомы интоксикации, более распространенные

поражения легочной ткани и прогрессирующее течение, чем у больных с возбудителем иных генотипов [22]. С другой стороны, данные литературы свидетельствуют о разной степени вирулентности МБТ этого генотипа для мышей [23]. Молекулярно-генетические исследования выявили, что мутация в гене *groB* (замена 531 TCG—»TTG, Ser-<sup>^</sup>Leu) обуславливает резистентность к высоким концентрациям рифампицина и не нарушает жизнеспособности МБТ [24]. D.van Soolingen et al.(2000) приводят данные об ассоциации мутации в гене *katG* (замена 315AGC—>ACC( Ser—>Leu)) с высокой трансмиссивностью штаммов МБТ. Мутанты Ser315-Thr не утрачивают вирулентности для мышей (Put A.et al., 2002). Для мультирезистентных МБТ генетического семейства Beijing характерно наличие обеих этих мутаций [21,22,23].

В виду неблагоприятной эпидемиологической ситуации и широкого распространения устойчивых к различным лекарственным препаратам штаммов в стране особое внимание должно быть уделено определению роли различных генотипов *микобактерий туберкулеза* в патогенезе болезни и процессу развития эпидемии туберкулеза в современных условиях.

Методы генетического типирования *Mycobacterium tuberculosis complex* являются надежным способом доказательства идентичности штаммов и в настоящее время широко используются за рубежом для решения задач эпидемиологии туберкулеза [23,24,25,26, 27,28].

С середины 80-х годов XX века проведены многочисленные исследования для изучения генома МТК [29], поиска полиморфизма ДНК, пригодных для внутривидового различения МТК [30, 31, 32, 33, 34,35], стандартизации методов генотипирования [36], создания баз генотипов микобактерий из различных регионов мира [27]. Данными работами была создана основа для практического использования методов молекулярной эпидемиологии и в широкомасштабных популяционных исследованиях распространения туберкулеза [37, 38, 39, 40], и для расследования отдельных локальных вспышек госпитальной инфекции [41] контроля гипердиагностики туберкулеза в результате внутрिलाбораторной перекрестной контаминации, выявления эпидемиологических связей, не идентифицированных традиционными методами эпидемиологического расследования.

Современные методы генотипирования позволяют: изучить структуру популяции на территориях, достоверно обосновать эпидемиологические связи между заболевшими в очагах туберкулеза, в том числе при госпитальной инфекции, идентифицировать

эпидемический штамм возбудителя и проводить мониторинг за его распространением (как географическим, так и среди различных социальных групп), выявить скрытые контакты и факторы риска заражения, провести дифференциальную диагностику эндогенной реактивации и экзогенной суперинфекции при рецидивах заболевания, провести ускоренное выявление лекарственно-устойчивых штаммов, оценить их трансмиссивность и вирулентность, контролировать качество бактериологической диагностики (распознавание кросс-контаминации образцов). Для оценки эпидемической ситуации важным является вопрос о соотношении числа случаев реактивации латентного туберкулеза и первичного заражения, так как эти данные отражают активность передачи туберкулеза на данной территории. В регионах, неблагополучных по заболеваемости туберкулезом, активность трансмиссии, рассчитанная по числу кластеризующихся колютов, составляет от 50 до 75%, свидетельствуя, что наибольшее число случаев заболевания – результат недавнего заражения [42].

Использование методов геномной дактилоскопии для изучения структуры популяции МБТ выявило широкое распространение штаммов генетического семейства W-Beijing на территории Китая, стран Юго-Восточной Азии, Карибского бассейна, в Южной Африке, в США и в России [39, 42,43, 46].

Учитывая устойчивость этого семейства к основным противотуберкулезным препаратам в совокупности с высокой трансмиссивностью и вирулентностью подобных клонов, считается, что выделение их может служить показателем эпидемиологического неблагополучия в регионе [46, 47].

Масштабные молекулярно-биологические исследования, проведенные за рубежом, позволяют выявить преобладающие и спорадически встречающиеся генотипы, а, следовательно, осуществлять слежение за клональной диссеминацией штаммов в рамках территориальных образований и за их пределами.

«Золотым стандартом» типирования МБТ считается метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP) (Restriction Fragment Length Polymorphism), основанный на анализе распределения мобильных последовательностей ДНК IS6110 в геноме МБТ [47].

Дискриминирующая способность данного метода – 99% и воспроизводимость 100%. Однако изучаемые рестрикты могут присутствовать не во всех штаммах МБТ [36]. Кроме того, данный метод требует наращивания микобактерий в течение одного-двух месяцев и

может быть применен лишь для ретроспективного эпидемиологического анализа. Сама процедура RFLP-анализа многоэтапна, занимает значительное время, требует сложного оснащения и высокой квалификации персонала, результаты сложны для учета и интерпретации, которые невозможны без специального программного обеспечения для сравнительного анализа распределения электрофоретических паттернов гидролиза ДНК в геле и поиска совпадающих генотипов в базе данных. Метод также непригоден для штаммов с малым количеством копий IS6110 в геноме. В последнее время в зарубежной литературе появились отдельные сообщения о том, что некоторые лекарственно-устойчивые штаммы могут обладать относительной нестабильностью IS6110-паттернов [48]. К недостаткам метода следует также отнести работу с радиоактивной меткой. К наиболее широко используемым вторичным методам генотипирования микобактерий относятся метод сполиготипирования (Spoligotyping), основанный на регистрации полиморфизма спейсеров в регионе прямых повторов *M.tuberculosis*.

В последние годы появились методики, позволяющие типировать МТК с меньшими затратами, в частности, MIRU- и VNTR-типирование. Первый основан на амплификации участков генома, содержащих повторяющиеся рассеянные элементы (MIRU) размером 50-77 п.о. Определяя количество повторов можно получить MIRU-профиль. Сущность VNTR – типирования состоит в том, что после выделения геномной ДНК микобактерий туберкулеза проводят амплификацию полиморфных локусов ДНК с фланкирующими их праймерами в отдельных реакционных смесях с последующей детекцией ПЦР-продуктов и определением номера аллеля в соответствии с формулой, учитывающей размер ПЦР-продукта, число и размер tandemных повторов. Указанные методы широко применяются за рубежом в изучении генетического разнообразия штаммов микобактерий. в том числе и в России [49,50].

До недавнего времени основным их недостатком являлась более низкая, чем у ПДРФ, разрешающая способность. Однако разработанная в последнее время технология VNTR по 12 и более парам локусов VNTR-MIRU позволила приблизиться и в ряде случаев превзойти эффективность использования ПДРФ [51].

Поскольку IS6110-RFLP, MIRU-VNTR-типирование и сполиготипирование направлены на разные молекулярные мишени в геноме микобактерий эти методы могут эффективно дополнять друг друга при проведении широкомасштабных филогенетических и эпидемиологических исследований [52,53,54,55]. Относительная простота, дешевизна, воспроизводимость и возможность создания международных баз данных определили



широкое использование указанных методов в молекулярно-эпидемиологических исследованиях.. В то же время, популяции МТК во многих странах, включая страны с высоким уровнем заболеваемости, в том числе Казахстан, по генетическим маркерам изучены очень слабо, а по делеционным маркерам вообще не изучались.

Таким образом, разработка и внедрение методов генетического типирования возбудителя туберкулеза для решения текущих и долгосрочных задач мониторинга эпидемиологической ситуации по туберкулезу представляется особенно актуальным в регионах с высокой эндемичностью заболевания., таких как Казахстан. Проведение исследований с применением методов молекулярного типирования может способствовать лучшему пониманию закономерностей распространения возбудителей разных субтипов из одного региона или страны в другой, изучить зависимость гетерогенности субтипов от географического расположения региона, установить возможную связь субтипов с вирулентностью, определить особенности передачи инфекции.

В рамках этой НТП на базе лаборатории геномики ЦНЖ будут применены некоторые из перечисленных выше методов, в частности метод ДНК-секвенирования и MIRU-VNTR. В силу сложности, дороговизны и необходимости наличия большой бактериальной массы для выделения ДНК МТБ, процедура RFLP –анализа не будет использована на этом этапе проекта, но рассматривается на будущее для ретроспективного эпидемиологического анализа. Внедрение этого важного метода потребует вложения дополнительных ресурсов на приобретение дополнительного оборудования и специального программного обеспечения, что не предусмотрено ограниченным бюджетом данной НТП, Использование метода сполиготипирования, также продолжительной и ресурс затратной процедуры, находится на рассмотрении.

### **1.3. Определение роли генетических факторов человека в формировании восприимчивости к туберкулезу**

Генетические факторы в значительной мере определяют восприимчивость к различным заболеваниям. Особое внимание в последние годы уделяется изучению генетических основ формирования и течения инфекционных заболеваний, в том числе туберкулеза. Наиболее распространенным методом изучения генетических механизмов этих заболеваний является поиск ассоциаций заболевания с полиморфизмом кандидатных генов. Накопленные наблюдения о существовании разной степени восприимчивости и

устойчивости к туберкулезу, большая частота одновременного заболевания монозиготных близнецов по сравнению с дизиготными, определенные закономерности заболеваемости туберкулезом среди родственников больных пробандов в обширных семьях, с одной стороны явились свидетельством возможной существенной роли генетических факторов в механизмах резистентности, а с другой, послужили причиной целенаправленных исследований в этой области.

В настоящее время считается, что приблизительно одна треть населения земли инфицирована *Mycobacterium tuberculosis*, однако клиническая картина развивается только у 10% инфицированных. Этот факт свидетельствует о наличии мощных механизмов резистентности человека к туберкулезной инфекции. Другими словами, сопротивляемость туберкулезу, очевидно, находится под контролем генов резистентности и чувствительности [56,57,58].

Академиком Муминовым в своих исследованиях были изучены распределения генотипов и аллелей (D543N) гена *SLC11A1* у больных туберкулезом легких в Казахстане. По изученному полиморфному варианту D543N гена *SLC11A1* как у больных, так и в контрольной группе не отмечено отклонения распределений генотипов от ожидаемых при равновесии Харди-Вайнберга. В результате исследований было установлено, что генотип DD наиболее распространен как в группе больных, так и в группе здоровых лиц и составляет  $87,4 \pm 2,41\%$  и  $78,4 \pm 2,58\%$  соответственно,  $p < 0,05$ . Генотип NN в обеих группах встречается значительно реже, чем DD и составляет в обеих группах по 1%,  $p > 0,05$ . При сравнительном анализе частоты распространенности генотипа DN гена *SLC11A1*(D543N) в группе больных туберкулезом легких и здоровых лиц обнаружены достоверно значимые различия (OR=0,500; C.I.=[0,292-0,856];  $\chi^2 = 6,53$ ,  $p=0,01059$ ).

Анализ частотного распределения аллелей данного гена выявил, что наиболее распространенным аллелем в группе больных и здоровых лиц является аллель D ( $93,2 \pm 1,30\%$  и  $88,8 \pm 1,4\%$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Более редкий аллель N статистически значимо чаще регистрировался в группе контроля. При сравнительном анализе частотного распределения аллеля N между группами больных туберкулезом легких и здоровых лиц также выявлены достоверно значимые различия (OR=0,584; C.I.=[0,360-0,947];  $\chi^2=4,84$ ,  $p=0,02784$ ). Данные литературы противоречивы. Одни авторы выявили ассоциацию аллеля N с развитием туберкулеза. В то же время отсутствие такой связи отмечают в

Дании, Марокко, Таиланде, Мексике, Индонезии .Японские исследователи предположили, что вариации в локусах D543N и 3'UTR гена *SLC11A1* ассоциированы с развитием мультирезистентного туберкулеза .

По результатам этих исследований при изучении полиморфизма D543N гена *SLC11A1* у больных туберкулезом легких в г.Алматы аллель N полиморфного локуса *SLC11A1*-D543N достоверно чаще встречается в группе контроля. Однако, по литературным данным, чаще наблюдается обратная ситуация, когда аллель N преимущественно встречается у больных туберкулезом. Возможно, это связано с разной этнической принадлежностью исследуемых групп. Замена отрицательно заряженной аспарагиновой кислоты (аллель D) на нейтральный аспарагин (аллель N) на карбоксильном конце пептида *SLC11A1*, возможно, влияет на его функцию. У японцев и китайцев показана слабая ассоциация аллеля *SLC11A1*\*543N с туберкулезом], хотя в нескольких популяциях негроидов и европеоидов, связи заболевания с этим генным вариантом не обнаружено. Это предполагает, что вариант D543N является этнически специфичным маркером подверженности к заболеванию. У тувинцев частота патологического аллеля *SLC11A1*\*543N выше, чем в других популяциях мира, что может быть одним из факторов повышенной частоты туберкулеза в Республике Тыва.

Вероятно, что ген *SLC11A1* определяет неспецифическую устойчивость к туберкулезу в период непосредственно после первичного инфицирования, поскольку соответствующий белок функционирует в макрофагах. Очевидно, что ген *SLC11A1* не является единственным, контролирующим устойчивость человека к туберкулезу.

Более частая регистрация аллеля N полиморфного локуса *SLC11A1*-D543N в группе контроля (Odds\_ratio=0,584; C.I.=[0,360-0,947];  $\chi^2 = 4,84$ , p=0,02784) предполагает, что данный аллель проявляет себя как протективный фактор при заболевании туберкулезом легких жителей г.Алматы. Тестирование данного полиморфизма в других регионах республики может иметь значение для досимптоматической диагностики туберкулеза легких в группах высокого риска [56,57,58]. Указанный выше метод рекомендуется нами для включения в исследование.

Этой же группой исследователей было изучено **распределение аллельных вариантов (C+3954T) гена *IL1B* и (G-308A) гена *TNFA* у здоровых лиц и больных**

**туберкулезом легких среди** 190 больных туберкулезом легких и 255 лиц контрольной группы, ранее и на момент обследования не страдавших туберкулезом. По возрасту, полу и национальному составу исследуемые группы были сопоставимы.

На основании полученных данных можно предположить, что полиморфизм C+3953T гена *IL1B* не вносит существенного вклада в общую подверженность к туберкулезу у населения г.Алматы. При анализе +3954C/T гена *IL1B* у больных туберкулезом легких по сравнению со здоровыми индивидами также не обнаружили различий между исследуемыми группами ( $\chi^2=1,28$ ,  $p= 0,564$ ). Однако данное предположение не исключает его возможного влияния на течение туберкулезного процесса.

TNF $\alpha$ , провоспалительный цитокин, регулирует широкий спектр биологических процессов, включая пролиферацию клеток, их дифференцировку и апоптоз. Известно, что TNF $\alpha$  играет ключевую роль в формировании и поддержании гранулем. Проявления генетического полиморфизма гена *TNFA* на молекулярном и биохимическом уровнях в настоящее время достаточно активно изучаются. Известно, что нуклеотидная замена гуанина на аденин в позиции -308 промоторной области гена *TNFA* значительно повышает его транскрипционную активность и увеличивает скорость образования мРНК. У носителей генотипа -308A/A синтез белка происходит в 3 раза активнее, чем у лиц с генотипом -308G/G.

Результаты проведенного анализа свидетельствуют о вероятном отсутствии существенной взаимосвязи исследованного полиморфизма G-308A гена *TNFA* с заболеванием туберкулезом среди жителей г.Алматы.

Согласно литературным данным ряд генов-кандидатов, в том числе *IL1B* и *TNFA*, не только вносят определенный вклад в предрасположенность к тому или иному заболеванию, но и оказывают влияние на особенности клинического течения. Аллельные варианты промоторных участков генов цитокинов не влияют на аминокислотную последовательность белка, но могут приводить к изменению уровня продукции цитокина и, как следствие, выраженности иммунологических реакций. Поэтому несмотря на отсутствие различий между группами больных и здоровых по частотам аллелей и генотипов полиморфизмов (C+3954T) гена *IL1B* и (G-308A) гена *TNFA*, была исследована связь уровня продукции цитокинов с генотипами и аллелями изучаемых полиморфизмов [1,2,3].

Приведенные выше сведения идут в русле современного научного направления по изучению взаимодействия макро- и микроорганизма [59]. Микобактерии туберкулеза являются универсальными активаторами рецепторов макрофагов и соответственно регуляторами иммунного ответа [60]. Кроме того, липопротеины микобактерий напрямую регулируют активацию Т-лимфоцитов через Toll-like рецепторы 1 и 2 поэтому изучение полиморфизма Toll-like рецепторов представляет значительный интерес в выяснении чувствительности макроорганизма к туберкулезу [61]. Выяснено, например, что полиморфизм Toll-like рецепторов играет важную роль в предрасположенности к внелегочному туберкулезу, определяет количество натуральных киллеров в организме больного туберкулезом [62,63]. Выясняется также ассоциативная роль полиморфизма хемоатрактантного протеина-1 с повышенной чувствительностью к легочному туберкулезу [64].

Таким образом, полиморфизм генов цитокинов, в частности, в промоторном регионе может быть одним из механизмов, участвующих в формировании индивидуальной вариабельности уровня продукции белка. При патологии этот феномен имеет важное значение, так как цитокины являются ключевым фактором формирования эффективного иммунного ответа.

Учитывая приведенные выше данные, были внесены вышеуказанные гены были внесены в протоколы настоящего исследования с целью дальнейшего изучения их роли в формировании предрасположенности и в патогенезе заболевания.

**Таким образом,** комплексное изучение экологических и социо-экономических факторов индивидуального и популяционного риска заражения и развития туберкулеза, вариабельности штаммов микобактерий туберкулеза, а также ассоциаций заболевания с полиморфизмов кандидатных генов позволит в полной мере изучить эпидемиологическую картину заболеваемости туберкулезом в Казахстане и разработать рациональные подходы к ранней диагностике, профилактике и контролю туберкулеза и МЛУ-ТБ в стране. Для этого, в методы нашего исследования мы включили сбор целого ряда показателей, характеризующих как окружающую среду (социально-экономических и экологических), так и индивидуальные характеристики, включающие биологические (генетические), демографические, поведенческие. На основе литературного обзора, а также изучения предыдущих молекулярно-генетических и геномных исследований, проведенных на

территории Казахстана партнерами, консультирующими нас в этом проекте, в методы исследования были включены MIRU-VNTR генотипирование и ДНК-секвенирование. Кроме того, с учетом опыта предыдущих исследователей, область геномных исследований была уточнена с включением генов-кандидатов и их полиморфизмов.

## Глава 2. ДИЗАЙН, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ:

Для изучения экологических, индивидуальных поведенческих и биологических факторов риска ТБ, а также генетических характеристик *M.tuberculosis*, мы будем использовать комбинированный дизайн, который будет включать: 1) исследование случай-контроль, 2) проспективное исследование когорты, 3) молекулярно-эпидемиологическое исследование, 4) исследования генетической восприимчивости к хозяину (человека) к туберкулезу (рис.1).



Рисунок 1 - Схематический обзор предлагаемого дизайна исследования (молекулярно-эпидемиологическое исследование)

Следующие изменения были внесены в протокол исследования в связи с сокращением финансирования НТП в этом году:

1) Размер выборки: первоначальный размер выборки, который включал 1800 человек: 600 больных впервые выявленным туберкулезом легких, 1200 здоровых контрольных участников (контактные внутри семьи индексированных участников и внесемейный контроль), был значительно сокращен в связи с недостаточным бюджетом. В настоящий момент, нами планируется набрать 180 человек (60 больных впервые выявленным туберкулезом легких и 60 здоровых контролей) в 2012 г. в 2 регионах – г. Алматы и Алматинская область. В 2013 г., с учетом бюджета исследования, проект будет распространен на Костанайскую и Кызылординскую области, где планируется набрать еще 180 человек минимально.

## **2) Тип выборки: кластерная выборка**

Для репрезентативности выборки на уровне выбранных регионов, а также в целях увеличения эффективности при сокращении затрат, будет использована кластерная выборка районов в 4 регионах, вошедших в проект. Основным принцип кластерной выборки заключается в том, что сначала изучаемая совокупность делится на взаимоисключающие и взаимодополняющие подгруппы, называемые кластерами. Затем с помощью вероятностного метода выборки, такого как простая случайная выборка, отбираются кластеры. Элементы кластера должны быть максимально разнородны, а сами кластеры — как можно более однородными. В идеале каждый кластер должен представлять собой небольшую модель генеральной совокупности. Распространенная форма кластерной выборки — территориальная выборка (area sampling), в которой кластеры состоят из географических территорий, таких как округа, жилые районы или кварталы. В нашем случае, в качестве кластеров будут выступать районы, из которых состоят области и города, вошедшие в генеральную совокупность.

Нами были сделаны прогностические расчеты объема набора участников в проект за 3 месяца активного рекрутинга на основании численности впервые выявленных больных в выбранных регионах в 2010 г.

Итак, в кластерную выборку вошли:

- **г. Алматы (7 - все районы) : Алатауский, Алмалинский, Жетысуский, Медеуский, Турксибский, Ауэзовский , Бостандыкский районы.** Ожидается: 750 случая /год; 187 случая/3 мес. набора



- **Алматинская область (6): Алакольский район, Балхашский район, Енбекшиказахский район, Жамбылский район, Капчагай Г.А., Саркандский район.** Ожидается: 750 случаев /год; 187 случаев/3 мес. набора
  - **Костанайская область (8): Наурзумский, Амангельдинский, Аркалык Г.А., Аулиекольский, Денисовский, Жангельдинский, Карабалыкский, Карасуский район.** Ожидается 254 случая /год; 63 случая/3 мес. набора
  - **Кызылординская область (8 - все): Аральский, Жалагашский, Жанакорганский, Казалинский, Кармакшинский, Кызылорда Г.А., Сырдарьинский, Чиилийский.** Всего 692 случая /год; 173 случая/3 мес. набора
- 3) исключен иммунологический компонент исследования
- 4) уточнены методы молекулярно-генетические методы, которые будет применяться в лаборатории геномики ЦНЖ для генотипирования M.Tuberculosis. В этом году будут использованы методы ДНК-секвенирования и MIRU-VNTR. В последующем, возможно расширение методов с включением более дорогостоящих и трудоемких методов, таких как RFLP и сполиготипирование, что потребует дополнительного финансирования, оснащения и обучения персонала лаборатории.
- 5) в четырех регионах исследованиях в отобранных районах, будет осуществлен сбор и картографирования комплекса социально-демографических, экологических, экономических и эпидемиологических показателей, а также клинико-лабораторных данных впервые выявленных больных путем выкопировки медицинских карт больных.

## **2.1 Дизайн пилотного исследования в г.Алматы**

**Цель пилотного исследования:** Тестирование инструментов, протоколов, процедур исследования для адаптации к местным (полевым) условиям

**Задачи пилотного исследования:**

1. Тестирование протоколов и инструментов исследования (формы, анкеты)
2. Отработка алгоритма процессов рекрутинга, скрининга, анкетирования участников исследования
3. Отработка алгоритма сбора и транспортировки биоматериала
4. Отработка механизмов взаимодействия партнеров
5. Отработка алгоритма сбора клинической и лабораторной информации
6. Отработка процедуры менеджмента данных

**Размер и объем исследования:** сбор и транспортировка 9-ти образцов венозной крови (3 индекс-участника; 3 участника из внутреннего и 3 участника из внешнего контроля) и 3-х образцов мокроты индекс-участников.

**Учреждение, на базе которого проводится пилот:** межрайонный противотуберкулезный диспансер г. Алматы, Турксибский район, ул. Вторая Остроумова, 45). Ответственный: Мукушев Н. Р.

**Выборка и набор участников:** в выборку вошли 7 районов г Алматы: Алатауский район, Алмалинский район, Жетысуский район, Медеуский район, Турксибский район, Ауэзовский район, Бостандыкский район .

**Критерии включения/исключения:**

Универсальные критерии пригодности:

- Возраст старше 18 лет на момент скрининга;
- наличие постоянного места жительства и адрес, по которому проживают не менее 3 месяцев;
- наличие других взрослых членов семьи, проживающих с ним вместе;
- Не планировать переезда в ближайшие 12 месяцев;
- Свободно говорить по русски или казахски;
- отсутствие серьезных психиатрических или когнитивных нарушений, способных нарушить предоставлению информированного согласия и заполнению анкет проекта.
- отсутствие соматических заболеваний, которые могут привести к ухудшению и/или летальному исходу в течение года после скрининга.

**Специфические критерии пригодности**

**Алгоритм отбора индекс – участников**

Выбор осуществлялся врачом-фтизиатром из списка больных с впервые выявленным легочным туберкулезом из выбранных районов с диагнозом, выставленным в течение 3 месяцев до момента начала набора в проект, обязательно учитывая при этом:

- наличие положительного посева мокроты и выращенной культуры на момент проведения пилота

Соответствие определению впервые выявленного случая легочного туберкулеза в проекте:

- Положительная микроскопия мазка; ИЛИ
- Положительный посев мокроты (Левенштейна-Йенсена и БАКТЕК); ИЛИ
- Отрицательная микроскопия мазка И клинические и рентгенографические данные, специфичные для туберкулеза легких, с ответом на противотуберкулезное лечение

• <sup>1</sup>

#### **Алгоритм отбора внутреннего контроля**

- Отсутствие впервые выявленного легочного туберкулеза, отвечающего определению случая в проекте
- Один семейный контроль случайным образом выбирается из соответствующих по возрасту и национальности членов семьи, проживающих в доме индекс-участника
- В каждом выбранном доме, все проживающие в доме, соответствующие по возрасту и национальности, проходят скрининг на критерии пригодности
- Контроль случайным образом выбирается из подходящих по критериям на основании таблицы Киш

#### **Алгоритм отбора внешнего контроля**

- Отсутствие предварительно выявленного легочного туберкулеза, отвечающий определению случая в проекте
- Один контроль случайным образом выбирается среди соседей, которые проживают в том же районе что и каждый индекс участник
- Выбор осуществляется методом «ручки», адаптированном из EPI (Расширенная программа по иммунизации). Метод заключается в использовании ручки для выбора направления для поиска внешнего контроля. В выбранном направлении с шагом равным 3, будет отобран дом для последующего выбора внешнего контроля среди домохозяев<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Этот критерий введен только для пилотного исследования в целях сокращения времени для выращивания культуры. В основном исследовании в проект будут вводиться больные как с положительным, так и отрицательным результатом посева мокроты.

<sup>2</sup> Процедура может менять по ходу пилотного исследования в целях выбора оптимального подхода для выбора внешнего контроля с учетом технической выполнимости, максимального охвата и сокращения сроков набора

- Если индекс участник проживает в многоэтажном и многоквартирном доме, методом «ручки» выбирается этаж проживания внешнего контроля.

### **Набор участников (общая информация)**

В пилоте участвовали 3 случая впервые выявленного туберкулеза легких, отвечающих определению случая в проекте. Врач-фтизиатр отобрал 3 потенциальных участников из списка больных, выявленных за последние 3 месяца среди больных, зарегистрированных в 5 вышеуказанных районах города Алматы и имеющих результаты бактериологического посева мокроты на момент начала пилота. Врачи туберкулезного диспансера связались с отобранными больными, уведомили их о проекте и пригласили к участию. В случае согласия, провели предварительный скрининг и выяснили о возможности участия семейного контроля. При соответствии всем критериям и предварительном согласии на участие в проекте семейного контроля (предоставленном потенциальным индекс-участником), оба приглашались в полевой офис проекта для прохождения окончательного скрининга, базового интервью и забора венозной крови. При нахождении больного ТБ в стационаре, все процедуры по проекту имеют место в ТБ диспансере и врач лично проводил скрининг и компьютеризированное базовое интервью, медицинская сестра процедурного кабинета осуществляла забор крови. При этом параллельно все процедуры исследования внутрисемейный контроль проходили в полевом офисе проекта. Индекс-участник и внутрисемейный контроль входили в проект одновременно. Сотрудник ЦИГЗЦА убеждался в соответствии критериям и согласии на участие со стороны внутрисемейного контроля, прежде чем давать разрешение врачу на включение данного участника в исследование.

Все мероприятия по рекрутингу, скринингу и опросу внешнего контроля производились сотрудниками ЦИГЗЦА в соответствии с процедурами, описанными в протоколе рекрутинга.

### **Забор биоматериала**

Кровь: забраны 2 пробирки по 4 мл венозной крови. Собранная кровь должна была храниться при температуре +4 и в течение 5-7 дней быть доставлена в лабораторию ЦНЖ (г. Астана).

Образцы культуры МБТ должны были быть пророщены к моменту пилотного исследования, (см. критерии включения для пилота). Готовые образцы маркировались персональным идентификационным номером (ПИН) участника исследования и транспортировались в лабораторию НЦПТ (г. Алматы), где из них выделялись ДНК микобактерии. Готовые ДНК МБТ также в промаркированном виде транспортировались в лабораторию ЦНЖ согласно процедурам, описанным в протоколе по транспортировке ДНК.

#### **Материалы и Формы:**

Для врача:

1. бумажная прескриниговая анкета
2. флаер проекта
3. скрипт (краткая информация о проекте для рекрутинга участника)
4. ИРК

Для проектного штата ЦИГЗЦА:

1. флаер проекта
2. скрипт (краткая информация о проекте для рекрутинга участника)
3. форма информированного согласия на русском языке
4. компьютеризованная скриниговая анкета на русском языке
5. компьютеризованная версия базовой анкеты на русском и казахском языке
6. форма контактной информации

Материалы:

1. расходные материалы (пробирки для забора крови)

### **3. Алгоритм и анализ пилотного исследования в г.Алматы**

Согласно технической спецификации и календарного плана в июне 2012 г. проведено пилотное исследование в г.Алматы на базе межрайонного противотуберкулезного диспансера г. Алматы.

**Задачи пилотного исследования:**

7. Тестирование протоколов и инструментов исследования (формы, анкеты)
8. Отработка алгоритма процессов рекрутинга, скрининга, анкетирования участников исследования,
9. Отработка алгоритма сбора и транспортировки биоматериала
10. Отработка механизмов взаимодействия партнеров
11. Отработка алгоритма сбора клинической и лабораторной информации
12. Отработка процедуры менеджмента данных

*Сроки проведения - 25-29 июня 2012 г.*

**Размер и объем исследования:** Осуществлен сбор и транспортировка 9-ти образцов венозной крови (3 индекс-участника; 3 участника из внутреннего и 3 участника из внешнего контроля) и 3-х образцов мокроты индекс-участников.

**Выборка и набор участников:** в выборку вошли 7 районов г Алматы: Алатауский район, Алмалинский район, Жетысуский район, Медеуский район, Турксибский район, Ауэзовский район, Бостандыкский район .

#### **Выбор и тренинг исполнителей**

Проведен 2-х дневный тренинг исполнителей проекта из Алматинской, Кызыл-Ординской и Костанайской областей и г.Алматы для обучения практическим вопросам рекрутинга и удержания в проекте участников исследования, критериям пригодности и скрининга, основным правилам работы в Датстат для ввода данных и скайп для мониторинга и обмена информацией, процедурам сбора, хранения и транспортировки биоматериала в рамках программы, биобезопасности в микробиологических и генетических исследованиях. Проведение компьютерного теста и сертификация по этике СУ исполнителей программы. Общее количество участников тренинга 18 человек. Количество часов – 16 час. (Подробная информация о тренинге представлена в главе 4 данного отчета).

### **3.1 Организация, координация пилотного исследования**

#### ***ЦИГЗЦА***

1. Организация и координация пилотного исследования в г. Алматы. Отработка алгоритма процессов рекрутинга, скрининга, анкетирования, сбора и транспортировки биоматериала; сбора клинической и лабораторной информации.

**Ответственные:** А. Терликбаева, Б.Амиров, М.Даришева

2. Сбор и транспортировка биоматериала (венозной крови) и ДНК *M.tuberculosis*

**Ответственные:** М.Даришева, Д.Бекишев, С.Кускулова

3. Получение этического согласия, проведение компьютеризированного опроса

**Ответственные:** М.Даришева, Д.Бекишев

#### ***НЦПТ МЗ РК***

1. Организация и координация пилотного исследования

**Ответственные:** Бекембаева Г.С., Аленова А.Х.

2. Сбор биоматериала:

а) мокроты, крови

б) выделение культуры МБТ, ДНК

в) исследование на ВАСТЕС MGIT 960

г) контроль качества за микробиологическим компонентом исследования (сбор, транспортировка мокроты, крови, динамикой культуральных данных, ТЛЧ)

д) анализ результатов по сбору биоматериала у больных ТБ, контактных и здоровых лиц в процессе НТП в пилотных регионах

**Ответственные:** Бекембаева Г.С., Аленова А.Х., Бисмильда В.Л., Чингисова Л., Игликова Ш.

#### ***АФ РК***

1. Мониторинг и контроль качества по сбору и транспортировке биоматериала (венозной крови) для генетических исследований

**Ответственные:** Бейсембаева Ш.А.

#### ***Алматинский городской противотуберкулезный диспансер (АГПТД)***

1. Содействие в организации пилотного исследования, выбора противотуберкулезного диспансера для пилотного исследования, размещение временного полевого офиса. Обеспечение доступа к биоматериалу (мокрота) участников исследования в г. Алматы.

**Ответственные:** Мукушев Н.Р. Алгоритм пилотного исследования представлен на рисунке 2.

*Алгоритм пилотного исследования в г. Алматы*

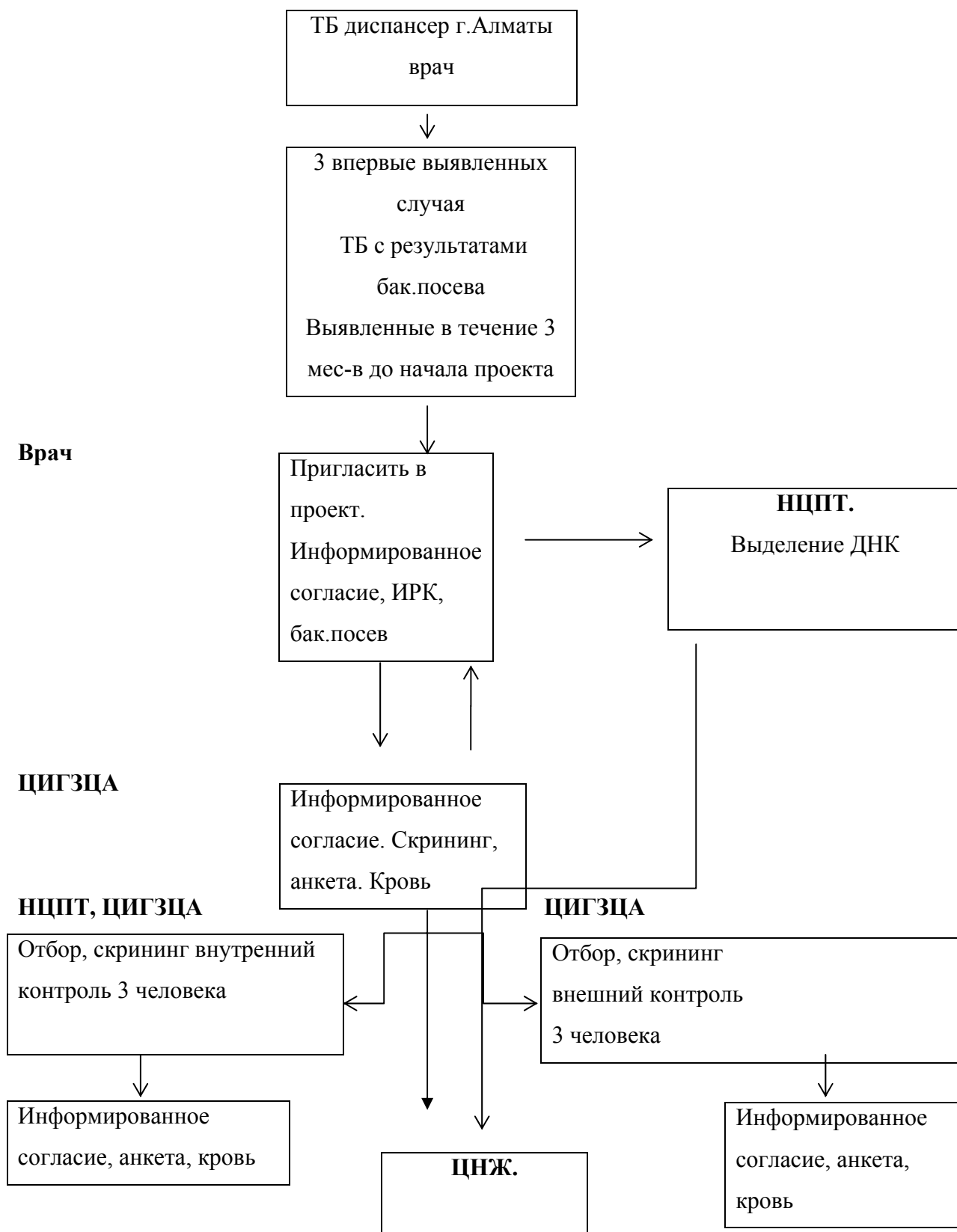


Рисунок 2— Алгоритм пилотного исследования



### **3.2 Описание пилотного исследования в части касающейся рекрутинга (набора) участников**

Рекрутинг индекс-участника и семейного контроля возложен на врача - заведующего отделением впервые выявленных случаев ТБ межрайонного противотуберкулезного диспансера, которая прошла обучение процедурам исследования на тренинге организованном в г.Алматы 7-8 июня 2012 г. на базе НЦПТ МЗ РК. Количество потенциальных участников, соответствующих критериям отбора – имеющих постоянное место жительства и адрес, по которому проживают не менее 3 месяцев, имеющих контактных, не имеющих психических и когнитивных нарушений, было сокращено дополнительным условием для пилота - наличие результатов бактериологического посева мокроты. Пилот проведен в течение 5-ти дней, так как за указанный период необходимо было транспортировать биообразцы (венозную кровь и ДНК *M.tuberculosis*) в лабораторию ЦНЖ НУ, г. Астана.

**1-ый день пилотного исследования.** Рекрутировано в проект - 2 индекс-участника и 2 внутренних контрольных (контактных) к ним. Участники соответствовали критериям и были приняты в проект. Процедуры, связанные с участием в исследовании - получение информированного согласия, компьютеризированное интервьюирование, забор крови прошли согласно протоколу и не создали никаких негативных, нештатных ситуаций. Однако впоследствии было выявлено отсутствие биоматериала (культуры) на одного из индекс-участников (культура уничтожена после проведения теста на лекарственную чувствительность).

По завершению процедур связанных с участием индекс-участников ассистенты исследователя (АИ) приступили к рекрутингу внешнего контроля. Выехав по адресу проживания индекс-участника обнаружено, что в данном одноподъездном 2-х этажном доме всего 5 жилых квартир. Одна из которых - квартира участника, в двух проживают люди не соответствующей индекс - участнику по национальности, одна квартира была закрыта, а хозяева другой квартиры в грубой форме отказались от участия в исследовании.

В этой связи, было внесено изменение в протокол пилотного исследования в части увеличения (территориально) участка из которого возможен рекрутинг внешнего контроля. Немаловажными факторами повлиявшим на решение изменить стратегию являлись:

-ограниченные сроки пилотного исследования

-необходимость высылки всех образцов крови *одной партией в течение 5-7 дней.*

Таким образом, принято решение изучить несколько вариантов рекрутинга внешнего контроля.

Одним из вариантов явился метод – использование базы предыдущих исследований ЦИГЗЦА. Определив нескольких потенциальных участников, проживающих в радиусе 1 км от места проживания индекс-участника, осуществив отсев неподходящих по национальному признаку и по возрасту, найден человек проживающий по адресу Гагарина...(подробнее в форме контактной информации) и рекрутирован в исследование по телефону. Встреча назначена в полевом офисе ЦИГЗЦА, по адресу Утепова 19а.

Подобным образом был рекрутирован внешний контроль ко второму индекс-участнику. Встреча с ними состоялась по адресу их места проживания. Из двух скринированных членов домохозяйства случайным образом выбран один.

Такой метод обеспечивает сокращение сроков набора участников. В данной ситуации он также способствовал тестированию всех остальных процедур (транспортировки биоматериала и т.д.). Применим только в г.Алматы.

**2-ой день пилотного исследования** Рекрутировано 2 человека (индекс- участник и контактный) врачом межрайонного ПТД. Интервьюирование проходило на казахском языке. В целом интервьюируемые с анкетой справлялись, хотя по ходу интервью - вопросов связанных с анкетированием было больше, чем у участников отвечавших на русском языке. Высветилась необходимость наличия в исследовательском штате ассистента исследователя в совершенстве владеющим казахским языком. Необходимость наличия второго ассистента исследователя также подтверждена слишком плотным графиком встреч в пилотном исследовании (при этом предположительно темп рекрутинга в пилотном исследовании соответствует планируемому темпу рекрутинга в основном исследовании). Также состоялись все процедуры, связанные с участием внешнего контроля рекрутированного в первый день пилота.

**3-ий день пилотного исследования** Состоялась встреча с внешним контролем и индекс-участником.

**4-ый день пилотного исследования** Был протестирован метод уличного набора к третьему индекс-участнику. Для этого был определен ближайший к его месту проживания магазин и посетителям магазина, соответствующим индекс-участнику по возрасту и национальности, и проживающим в этом районе предлагалось принять участие в

исследовании. Ссогласившимся была назначена встреча в полевом офисе ЦИГЗЦА.

**5-ый день пилотного исследования** Состоялась встреча с четвертым индекс – участником и его контактным в межрайонном противотуберкулезном диспансере. Все процедуры прошли нормально, сложностей не возникло. По завершению интервью участница из внутрисемейного контроля согласилась привлечь в исследование внешний контроль (соседку). В этот же день встреча с участником из внешнего контроля состоялась.

Таким образом, в течение 5-ти дней в проект рекрутировано **12** человек: **4** индекс-участника, **4** внутрисемейных контроля, **4** внешних контроля.

### **3.3 Сбор и транспортировка биоматериала (венозная кровь).**

Забор крови происходил согласно протоколу исследования. В две пробирки объемом 9 мл набрано по 4 мл венозной крови в каждую. Пробирки (в кол-ве 300 шт), а также иглы и держатели к ним получены от ЦНЖ НУ.

Сложностью явилось нежелание участников в категории внешний контроль тратить время на посещение полевого офиса. Они предпочитали пройти анкетирование у себя дома, соответственно сдать дома и кровь.

Собранная кровь хранилась при температуре +4. С момента забора образца от участника до помещения в стационарный холодильник ЦИГЗЦА (в среднем 3-4 часа) пробирки находились в сумке с хладоэлементами, обеспечивающей данный температурный режим. Образцы собирались соответственно датам встреч с участниками, описанными выше. 3 июля 2012 г. вся партия в сумке с хладоэлементами отправлена в лабораторию ЦНЖ НУ, г.Астана. Изучение услуг предоставляемых транспортными и почтовыми компаниями, функционирующими на рынке страны, показало, что ни одна из компаний не занимается транспортировкой биообразцов.

Учитывая это, принято решение для разовой транспортировки крови в ЦНЖ в рамках пилотного исследования попробовать один из вариантов:

- **транспортировка крови посредством рейсового автобуса** (время в пути -18 часов) используя 12 – вольтовый холодильник, питающийся от прикуривателя. Минусом данного способа являлось:

1. Достаточно низкая температура заморозки (до – 27 по инструкции), предусматривающая необходимость постоянного контроля – включения- отключения холодильника водителем для обеспечения требуемой (+4) температуры.
2. Несоответствие электро-технических характеристик (холодильник – 12 вольт, выход с прикуривателя в автобусе – 24 вольт), что требует закупа дополнительного оборудования – преобразователя 24/12.
3. Услуги по транспортировке вызывают сомнения в части легальности

- **транспортировка крови посредством поезда** (время в пути – 12 часов) используя сумку с хладоэлементами. Минусами данного способа являются:

1. Температура в сумке в последние 5-6 часов следования поезда поднимается до +10. Что подтверждено индикатором температуры, заложенным в сумку в момент отправки.
2. Услуги по транспортировке вызывают сомнения в части легальности

Транспортировка биообразцов осуществлена вторым способом ( через поезд).

### **3.4 Выделение и транспортировка ДНК *M.Tuberculosis***

В рамках пилотного исследования осуществлено выделение ДНК *M.tuberculosis* из культуры 3-х больных с впервые выявленным туберкулезом легких, находившихся на лечении в ПТД г.Алматы.

Культуры МБТ 3-х индекс-участников доставлены в Национальную бактериологическую референс-лабораторию НЦПТ с соблюдением правил техники безопасности и температурного режима.

#### **Контроль качества**

Сопроводительная форма-заявка были тщательно проверены на предмет идентичности (номер образца должен совпадать с номером, указанным в форме-заявке) до приема образцов в лабораторию.

При получении образцы были должным образом были осмотрены; тип, количество, качество и объем образцов. Установлено недостаточное количество материала (6 колоний) в образце одного из индекс-участников.

Условия и длительность транспортировки были проверены, замечаний нет.

Выделение ДНК МБТ проводилось по следующей схеме:

1. Налить в стеклянные пробирки по 2,5-3 мл FAST-DNA или TE-буфера и добавить в пробирки несколько лопаток культуры, максимально размазывая культуру по стенке до гомогенности.
2. Закрыть крышкой пробирки, кипятить в водяной бане при 94-95°C 40 мин
3. Полученную бактериальную убитую взвесь разлить в две пробирки по 1-1,5мл, подписать пробирки, окутать крышки пробирок парафильмом для герметичности, хранить при минус 19-20°C в морозильнике.
4. Заполнить формы на образцы.

FAST-DNA 1% MCS (метилцеллозольв) in 2 mM borate buffer, pH 9.5

#### FAST-DNA

1% MCS (метилцеллозольв) in 2 mM borate buffer, pH 9.5

Рецепты боратного буфера:

##### 1. Borate Buffer

4.76 g Boric Acid

2.54 g Borax

1000 mL of ddH<sub>2</sub>O

pH to 9,5 with NaOH

Sterile Filter

2. 50мл 0.025M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> \*10 H<sub>2</sub>O (9.525г/л) +х мл 0.1M HCl, разбаляют H<sub>2</sub>O до 100мл.

3. 10 ммоль борной кислоты, растворяем в 900-950 мл воды, доводим pH гидроксидом натрия, доводим объем до 1 л.

Для приготовления TE буфера (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7.0)) необходимо:

1. Приготовить стоковый концентрированный раствор 1M Tris-HCl (MW 121,14) - 6,05гр Tris-HCl в 50мл дистиллированной воды. Можно приготовить 100мл.

Также стоковый концентрированный раствор 0,5M EDTA (MW 372,24) — 9,32гр EDTA в 50мл дистиллированной воды.

1. Из этих двух стоковых растворов необходимо приготовить раствор TE буфера - 1мл 1M Tris-HCl + 0,5мл 0,5M EDTA + 48,5мл дистиллированной воды. В результате получается 50мл TE буфера, если необходимо 100-200-300мл буфера — увеличивается соответственно объемы стоковых растворов.

Таким образом, в рамках пилотного исследования было осуществлено выделение ДНК *M.tuberculosis* из культуры 3-х больных с впервые выявленным туберкулезом легких и осуществлена их транспортировка в лабораторию геномики ЦНЖ НУ г. Астана.

### **3.5 Безопасность исследователей**

При проведении компьютеризированного опроса и сбора венозной крови среди индекс-участников, согласно требованиям инфекционного контроля в противотуберкулезных учреждениях исследователи (директор, координатор по рекрутингу, медицинская сестра) были обеспечены индивидуальными средствами защиты. Перед входом в отделение новых случаев ТБ ГПТД г.Алматы были надеты одноразовые халаты, шапочки и респираторы марки «KleenGuard, respirator FFP2D, M20, EN 149 : 2001 FFP2D». После работы средства защиты были утилизированы в специальную корзину.

### **3.6 Результаты пилотного исследования**

Результаты пилотного исследования, извлеченные уроки в отношении методологических и практических сложностей в реализации проекта приведены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты пилотного исследования в г.Алматы

Процедуры	Методологические сложности	Практические сложности	Требуемые изменения
Выбор индекс -участника		- условие – «наличие результатов посева» - значительно сокращает объем выборки потенциальных индекс-участников.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- требуется получить сведения на лиц в списке, не подошедших по критериям пригодности</li> <li>- прескрининговые формы должны быть заполнены на всех больных в этом списке</li> <li>- получено устное согласие на прескрининг с отметкой в прескрининговой анкете</li> <li>- требуется предоставление дополнительной компенсации участнику за прескрининг и привлечение контактного. Выдать на этапе скрининга.</li> </ul>
Выборка контактного		- - критерии пригодности, такие как	Необходимо внести изменения

		возраст и национальность значительно сужают пул потенциальных участников среди контактных (н-р, многие живут с родителями, супруга другой национальности).	в такие критерии пригодности как возраст и национальность
Выборка внесемейного контроля	Метод «ручки» требует достаточного большого количества времени и наличия в полевом штате дополнительных единиц. Данный метод недостаточно детализирован в протоколе исследования, не понятен четкий алгоритм действия, предусматривающий все возможные ситуации.	-визиты на дом к потенциальным участникам без предварительной договоренности по телефону вызывают недоверие и отказы. - - нежелание участников этой категории тратить время на посещение полевого офиса (предпочитают проходить анкетирование и тестирование у себя дома)	Требуется выбрать стандартный метод выбора внешнего контроля и детализировать протокол и алгоритм действий с описанием всех возможных ситуаций и местных условий. Требуется дополнительное тестирование этих процедур в условиях области.
Скрининг	Метод случайного отбора по	Скрининг- анкета не соотносит	- Внести вопросы о



	таблице Киша, недостаточно детализирован в протоколе исследования.	контрольных участников к индекс-участнику по национальности и возрасту.	национальности и поле контактных в скрининг-анкету - детализировать протокол исследования в части метода отбора, используя таблицу Киша
Скрининг		- Отдаленное расположение основной базы – межрайонного противотуберкулезного диспансера. Большая потеря времени на дорогу. - Отсутствие автомобиля в проекте еще более затрудняет оперативность мероприятий.	Требуется наличие транспорта (автомобиля) в проекте
Анкетирование	Анкета на казахском языке требует дополнительного тестирования.		Требуется дополнительное тестирование анкеты на казахском языке Взять в штат проекта рекрутера, свободно

			владеющего казахским языком
Сбор биоматериала		Часть культуры уничтожается противотуберкулезными диспансерами ввиду отсутствия оборудования для хранения	НЦПТ должен обеспечить сохранности культуры как минимум в течение 3 месяцев после регистрации впервые выявленного больного
Транспортировка биоматериала	Алгоритм транспортировки биоматериала в лабораторию ЦНЖ необходимо детализировать в связи с местными условиями.	- Ограничение во времени пилота 5 днями, поскольку за это время необходимо было транспортировать биообразцы в лабораторию ЦНЖ - Способы транспортировки, предложенные в пилотном исследовании действенны, однако имеют определенные минусы и требуют дополнительного тестирования.	Определить стандартный метод транспортировки биоматериала, согласовать график сбора и отправки, определить ответственных со стороны ЦНЖ Требуется дополнительное тестирование процедур транспортировки биообразцов в условиях области.
Телекоммуникации		Проведение пилотного исследования было затруднено	Рекомендуется использовать полевое оборудование со

		<p>слабой системой телекоммуникации (городская и мобильная связь, интернет) между исследователями и сотрудниками АГПТД. Причиной является отсутствие городского телефона у заведующей отделением лечения новых случаев ТБ. На территории АГПТД слабый уровень приема сигналов сотовой связи, что делает затруднительным общение посредством мобильных телефонов.</p>	<p>встроенной программой Skype и USB-модемом Beeline, которые во время тренинга были переданы полевому штату.</p>
--	--	--	---

### **Рекомендации/замечания по улучшению работы в проекте**

- 1 Для выделения ДНК и получения более достоверных результатов генотипирования ДНК МБТ необходимо заведующим бактериологических лабораторий АГПТД и ОПТД обеспечить достаточное количество материала в биообразцах предоставляемых в Национальную референс-лабораторию НЦПТ.
- 2 Для улучшения коммуникации и обмена информации рекомендуется использовать полевое оборудование со встроенной программой Skype и USB-модем Beeline, которые во время тренинга были переданы полевому штату.
- 3 Требуется получить дополнительные сведения на лиц в списке, не подошедших по критериям пригодности. Прескрининговые формы должны заполняться на всех больных в этом списке. Получение устного согласия на прескрининг должно отмечаться в прескрининговой анкете. Требуется выделение дополнительных средств для выплаты компенсации для прескрининга.
- 4 Требуется выбрать стандартный метод выбора внешнего контроля и детализировать протокол и алгоритм действий с описанием всех возможных ситуаций с учетом местных условий. Требуется дополнительное тестирование процедур в условиях области.
- 5 НЦПТ должен обеспечить сохранность культуры как минимум в течении 3-х месяцев после регистрации впервые выявленного больного ТБ
- 6 Определить стандартный метод транспортировки биоматериала, согласовать график сбора и отправки, определить ответственных со стороны ЦНЖ. Требуется дополнительное тестирование процедур в условиях области.
- 7 Отдаленное расположение основной базы – межрайонного противотуберкулезного диспансера, отсутствие автомобиля в проекте значительно затрудняет оперативность мероприятий. В этой связи, требуется наличие транспорта (автомобиля) в проекте.

#### **4. Обучение полевого штата (исполнителей проекта) из Алматинской, Кызыл-Ординской и Костанайской областей и г. Алматы протоколам и процедурам и этическим аспектам исследования**

##### **Обучение исполнителей проекта**

7-8 июня 2012 г. в г. Алматы на базе Учебного центра Национального Центра проблем туберкулеза МЗ РК проведен тренинг “Field Operations and Human Subject Ethics in TB Project” для исполнителей проекта из Алматинской, Кызыл-Ординской и Костанайской областей и г. Алматы. Общее количество участников тренинга составило 18 человек. Участниками тренинга были специалисты региональных противотуберкулезных диспансеров Кызыл-Орды, Костаная, г. Алматы и Алматинской области (главные врачи, врачи-фтизиатры, врачи-бактериологи, специалисты организационно-методических отделов) - 10 человек и представители организаций участвующих в проекте: Национальный Центр проблем туберкулеза, Институт географии, Национальная Ассоциация фтизиатров РК – 8 человек. Количество часов – 16 час.

Цели тренинга:

- 1) ознакомить полевой штат с алгоритмом пошаговых действий по реализации программы и формирования групп участников исследования в изучаемых сайтах
- 2) обучить полевой штат этическим аспектам (получение информированного согласия), протоколам исследования (критериям отбора, прескрининга участников исследования)
- 3) ознакомить врачей-фтизиатров и врачей-бактериологов с формами сбора лабораторной и клинической информации разработанными в рамках программы
- 4) ознакомить специалистов организационно-методических отделов ПТД с перечнем демографических, экологических, социально-экономических показателей, сбор которых осуществляется на районном и областном уровне
- 5) Обучить средний медицинский персонал сбору и транспортировке биоматериала в рамках программы

Программа тренинга включала следующие вопросы:

1. Краткое описание проекта. Организационная структура проекта. Роли и задачи исполнителей проекта. Вопросы компенсации. (Докладчик: А.М Терликбаева, ЦИГЗЦА)

2. Защита субъектов исследования. Информированное согласие. (Докладчик: Луиза Гилберт, КУ)
3. Этические аспекты клинических исследований во фтизиатрии (Докладчик: Аленова А.Х., НЦПТ)
4. Субъекты исследования. Критерии пригодности Рекрутинг и скрининг индекс участников и внутреннего (семейного) контроля (Докладчик: Д.Бекишев, ЦИГЗЦА)
5. Практические вопросы рекрутинга (Докладчик: Д.Бекишев, ЦИГЗЦА)
6. Ролевая игра: рекрутинг и скрининг участников исследования для отработки практических навыков (М.А.Даришева, Д.Бекишев, ЦИГЗЦА)
7. Создание геоинформационной базы данных и картографирование эпидемиологической ситуации в разрезе пилотных регионов Казахстана: Алматинская, Костанайская, Кызылординская области и г.Алматы II этап (Докладчик: А.А.Тулупова, ИГ)
8. Компьютерный тест и сертификация по этике (ЦИГЗЦА)
9. Вопросы биобезопасности в микробиологических исследованиях (Докладчик: В.Л.Бисмильда, НЦПТ)
10. Вопросы биобезопасности в генетических исследованиях (Докладчик: Ш.А.Бесембаева, КАФ)
11. Сбор, хранение и транспортировка биологических образцов ДНК (Докладчик: Ш.А.Бесембаева, КАФ)
12. Протокол менеджмента данных (Докладчик: М.А.Даришева, ЦИГЗЦА)
13. ПИК (персональный идентификационный код) (Докладчик: П.И.Гуляев, ЦИГЗЦА)
14. Введение в DatStat (Докладчик: П.И.Гуляев, ЦИГЗЦА)
15. Базы данных. Переменные. База данных для участников исследования  
База данных для картографирования (Докладчик: П.И.Гуляев, ЦИГЗЦА)
16. Отчетность, формы сбора клинической и лабораторной информации (Докладчик: М.А.Даришева, ЦИГЗЦА)
17. Отслеживание и удержание участников в течение года (Докладчик: Д.Бекишев, ЦИГЗЦА)

В июне 2012 года два со-исследователя из Колумбийского университета, США находились в Республике Казахстан для встречи с командой, проводящей исследования,

обучения персонала, и оказания консультаций по услугам, оказываемым Национальной Программой по борьбе с туберкулезом в Казахстане. Доктор Набила Эль-Бассель, Основной исследователь, профессор Луиза Гилберт по социальной работе приняли участие в двухдневном тренинге “Field Operations and Human Subject Ethics in TB Project”.

Профессор Луиза Гилберт выступила с лекцией: Защита субъектов исследования. Информированное согласие. В лекции была дана основная информация о международных требованиях к этическим аспектам научных исследований, защите и правах пациентов, получению информированного согласия, сертификации по этике исполнителей проекта согласно требованиям Колумбийского университета.

В рамках тренинга исполнители проекта сдали он-лайн тест и прошли сертификацию по этике Колумбийского университета.

После завершения тренинга слушателям были вручены сертификаты.

#### **Подготовка к тренингу**

Для координации действий было проведено рабочее семинар-совещание партнеров с решением организационных и финансовых вопросов тренинга.

На совещании утвержден:

- окончательный список лиц, задействованных в проведении полевых работ;
- подготовлен проект программы тренинга;
- назначены ответственные лица по проведению подготовительных работ и тренинга;

На предварительном этапе были сделаны запросы в пилотные районы, составлены списки участников тренинга, разослана программа тренинга. Утверждена дата проведения тренинга - 7-8 июня в г.Алматы на базе учебного центра НЦПТ МЗ РК.

Перечень разработанных тренинг-материалов:

- а) программа тренинга
- б) учебно-тренировочный комплекс
- в) алгоритм пошаговых действий при реализации проекта на базе региональных ОПТД
- г) сертификаты участников тренинга

### **Рабочая встреча исполнителей проекта в г. Алматы, 6 июня 2012 г.**

Совещание с участием всех партнеров состоялось в Алматы 6 июня 2012 г. Основная цель совещания заключалась в сведении вместе всех партнеров по исследованию, чтобы представить и обсудить организацию пилотного исследования и основной фазы исследования (формирования групп участников и сбора биоматериала) в 2012 г..

Совещание провел директор НЦПТ МЗ РК д.м.н., профессор Абильдаев Т.Ш.

Участники, вместе с американскими коллегами обсудили каждую деталь выполнения основной фазы исследования, включая все программные вопросы – как рекрутировать пациентов с новыми случаями ТБ с положительными и отрицательными результатами биотестирования и логистические и административные вопросы, такие как вовлечение персонала с соответствующим профессиональными навыками, оборудование полевых сайтов, способность проведения определенных исследований на местах, доступ к биокультуре и т.д.

Участники также обсуждали возможные направления подготовки статей, которые могут быть подготовлены по результатам исследований.

Обсуждались также административные вопросы организации исследования партнерами, которые тесно были вовлечены в первом году программы и участвовали в планировании разработке исследовательских протоколов и инструментов.

Совещание проводилось в формате рабочей дискуссии. По завершении встречи полевое оборудование (ноутбук со встроенным программным обеспечением Датстат и программой Skype) был передан НЦПТ.



## 5. Картографирование

*Результаты исследований:* Научно-исследовательские работы выполнены в соответствии с Технической спецификацией и календарным планом в полном объеме, и включают следующие основные результаты:

- сформирована в Microsoft Access 2010 база геоданных по заболеваемости населения пилотных областей Республики Казахстан туберкулезом и факторам (демографическая, социально-экономическая и экологическая ситуации), определяющим восприимчивость к туберкулезу в разрезе областей на 2010 г. Разработана структура и дизайн базы геоданных;
- созданы векторные основы Алматинской, Костанайской, Кызылординской областей (масштаб 1:2 500 000), и г.Алматы (масштаб 1: 200 000) с векторными слоями и аннотациями в программном обеспечении ArcGIS Desktop 10 (рис.3-6).



Рисунок 3 – Векторная основа Алматинской области в ArcGIS Desktop 10

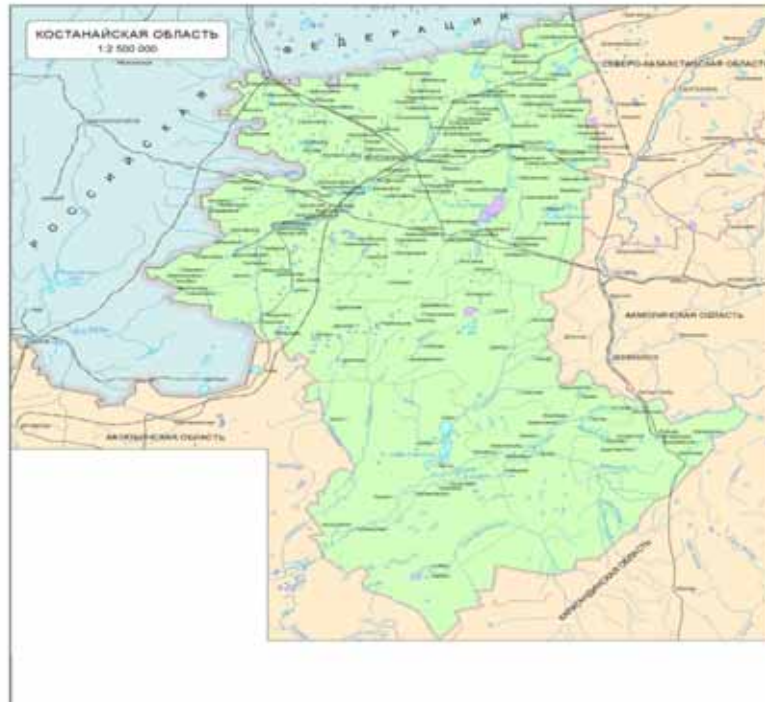


Рисунок 4 – Векторная основа Костанайской области в ArcGIS Desktop 10

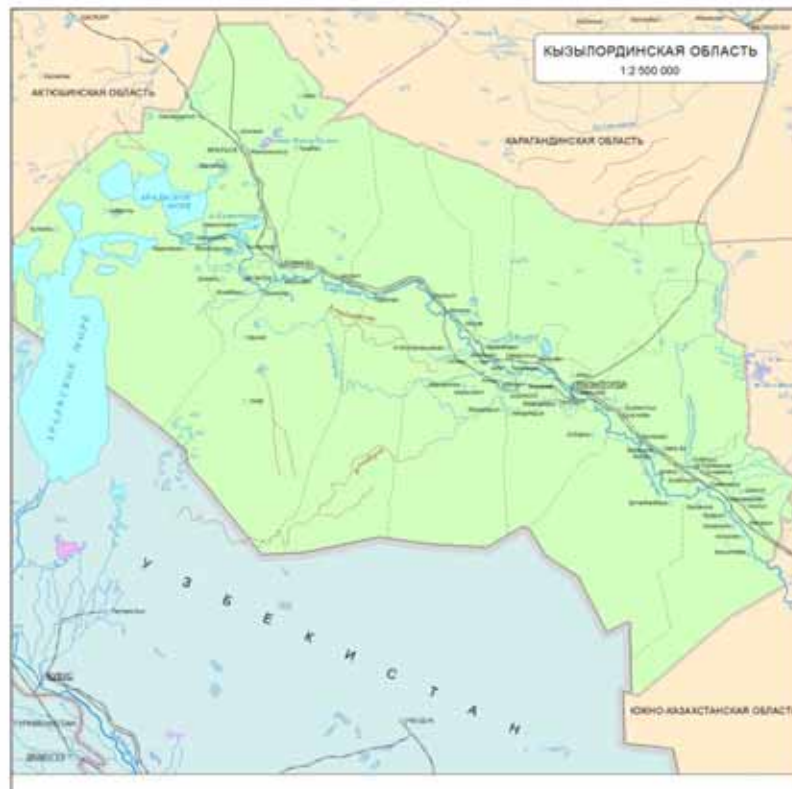


Рисунок 5 – Векторная основа Кызылординской области в ArcGIS Desktop 10

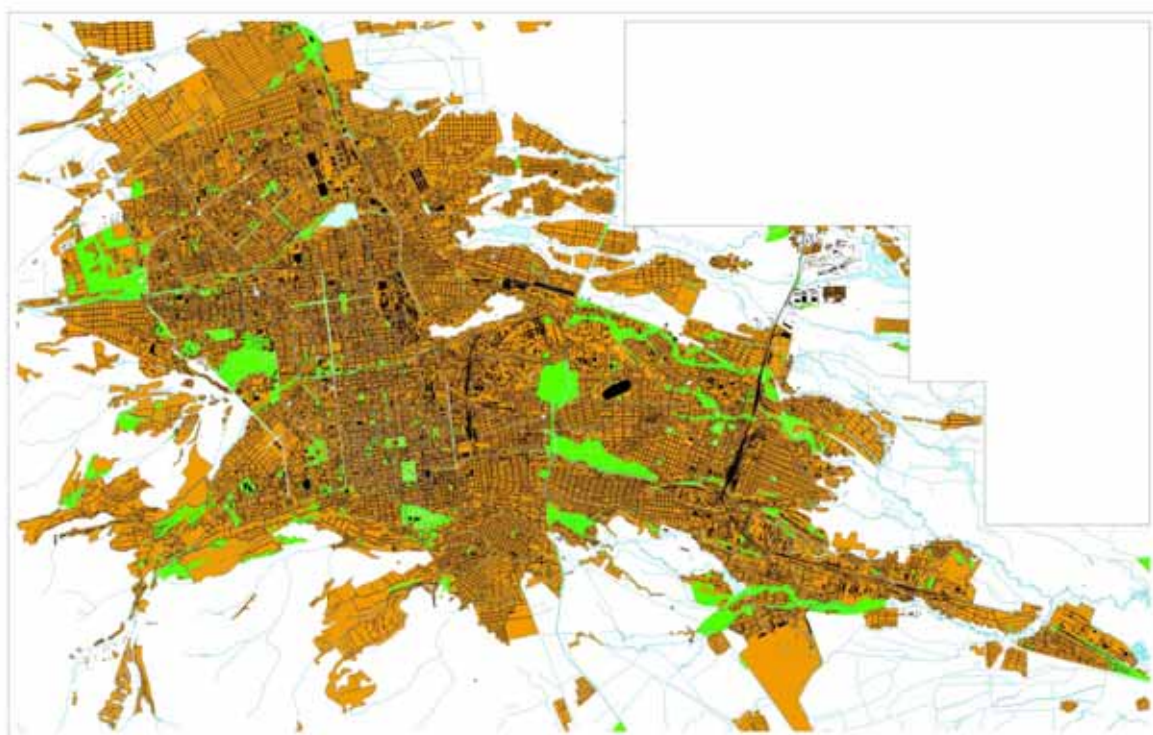


Рисунок 6 - Векторная основа г.Алматы в ArcGIS Desktop 10

В настоящее время возникла и набирает силу новая геоинформационная концепция в теории картографии, появилось особое направление – геоинформационное картографирование и его ответвления: оперативное и динамическое картографирование, ГИС-мониторинг и др.

1. **Выбор проекции.** Уникальной отличительной чертой географических информационных систем является использование системы координат, часто в комбинации с топологией. В международной практике как стандарт для вычисления местоположений, расстояний и других параметров используется система WGS 84 (Мировая геодезическая система 1984 г.). Для того, чтобы выбрать наиболее подходящую проекцию в нашем случае учитывались такие аспекты, как сохранение равнопромежуточности при отображении того обширного участка земной поверхности, который занимает Республика Казахстан. Поэтому проекцией для создания карт для данного проекта мы выбрали

равнопромежуточную коническую проекцию с определением центрального меридиана и стандартных параллелей.

2. Создание **цифровой векторной основы** для главных (1:2 500 000; 1:200 000) тематических карт (с персональной базой геоданных, включающей базовые классы объектов).

На начальном этапе создания карт данного проекта было целесообразно осуществить подготовку уникальных разномасштабных цифровых векторных основ, являющихся базисом для последующего составления тематических карт.

В связи с тем, что исследования будут вестись в рамках территориально-административных объектов РК, было решено в качестве общих масштабов для последующего картирования использовать масштабы 1:2 500 000, 1:200 000. Для достижения этих целей посредством инструментария полнофункционального пакета ArcGIS нами были созданы новые векторные основы.

Основы административных областей РК представлены в формате БГД (Базы Географических Данных) и содержат векторные слои: государственных, территориально-административных границ, населенных пунктов гидрографии – озер и рек, заболоченных территорий, солончаков, ледников, песков и путей сообщения.

При создании векторных слоев одновременно создавались так называемые аннотации – слои, содержащие надписи-названия сопредельных государств, населенных пунктов, физико-географических объектов и другую информацию, необходимую для отображения на картах. Информация для надписывания и размещения на картах была занесена в атрибутивные таблицы каждого создаваемого слоя. Помимо этого, атрибутивные таблицы содержат в себе данные для классификации объектов, оценки их площадных размеров и т.д.

Итогом проведенных работ по геоинформационному картографированию является создание векторных основ Алматинской, Костанайской, Кызылординской областей (масштаб 1:2 500 000), и г.Алматы (масштаб 1: 200 000).

**База данных (БД).** Структура базы данных разработана на основе методов классификации и идентификации географических объектов, принятых в РК. Разработка включает трансформацию табличных данных из различных форматов в формат ArcGIS, Access 2010, разработку атрибутивной таблицы в базе геоданных.

Для хранения базы геоданных была выбрана СУБД MS SQL SERVER 2008, поскольку продукты от компании ESRI имеет полную поддержку данной СУБД как на уровне рабочих станции, так и на уровне серверных продуктов класса ArcGIS. Microsoft SQL Server — система управления реляционными базами данных (СУБД), разработанная корпорацией Microsoft. Основной используемый язык запросов — Transact-SQL, создан совместно Microsoft и Sybase.

Структура базы данных по заболеваемости населения Алматинской, Костанайской, Кызылординской областей и г.Алматы туберкулезом создана на основе применения Классификатора административно-территориальных объектов (КАТО) и будет содержать данные в разрезе областей и районов. Наличие в SQL Server 2008 функции экспорта данных позволяет преобразовывать таблицу с кодами КАТО в форматы приложения MS Excel, MS Access.

## 6. Реализация интерактивного картирования

### Размещение:

Вся информация по проекту, и в том числе по картированию размещена на отдельном сайте. Система работает по управлению ОС Linux, web сервер Apache. Для размещения интерактивных карт используется отдельный ArcGis сервер. Его рабочие характеристики требуют отдельного программного обеспечения, а также определенных системных характеристик компьютера-сервера.

На сайте сделано разделение доступа к информации. Общая информация доступна для всех, а часть, касающаяся картирования, отчетов и статей – только разрешенным, зарегистрированным пользователям.

Адрес сайта проекта <http://tbkzproject.org/>, раздел Проект – Интерактивные карты.

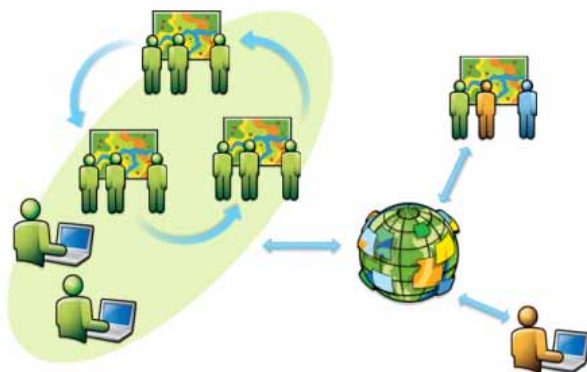
Для входа в эту область используйте регистрационные данные:

Имя пользователя: Map Пароль: map2012

### Описание:

Интерактивные карты проекта ТБ предназначены для наглядного отображения комплексной информации проекта на географическом диапазоне карт Казахстана. Они представлены по пилотным областям и районам. Информация привязана по территориальному распределению.

В качестве программного обеспечения выбран ArcGIS пакет. ArcGIS технология Online - это законченная, облачная, объединенная система управления содержанием для работы с географической информацией. Эта платформа предоставляет безопасную, открытую, настраиваемую инфраструктуру для создания веб-карт и веб-обработки данных, обеспечения общего доступа к карте, данным и приложениям, а также для управления содержанием.



Технология картографирования использует следующие инструменты:

1. Настольное картографирование ( с использованием программ ArcDesktop и ArcView) позволяет создать первичные карты областей и районов для нанесения исследуемых

показателей. В нашем случае заболеваемость ТБ, его распространенность, МЛУ случаи и т.д.

2. Производственное картографирование позволяет объединить все эти карты с признаками в единую систему

3. Технология ArcGis сервера позволяет обработать и представить данные картографирования в режиме от-line, т.е. посредством Всемирной сети (рис.7)



Рисунок 7 – Методология проектирования

Мы используем возможности условно-бесплатных технологий системы ArcGis, а также возможности предоставленного доступа к серверу ArcGis Института Географии.

На текущий момент представлены 4 пилотных области проекта. На каждой карте выделены границы областей и районов, и сделаны выборки данных про регистру ТБ за 2011 год: общая заболеваемость ТБ, по диспансерным группам, диагнозам ТБ, локализации и бактериовыделителей.

Список открытых карт:

- 01 Половозрастная структура
- 02 Миграция населения
- 03 Национальный состав населения

- 04 Материнская смертность
- 05 Соотношение мужчин женщин
- 06 Соотношение городского сельского населения
- 07 Естественный прирост населения
- 08 Смертность населения
- 09 Младенческая смертность
- 10 Плотность населения
- 11 Рождаемость населения
- 12 Доходы населения ниже величины прожиточного минимума
- 13 Доходы населения ниже стоимости продовольственной корзины
- 14 Уровень безработицы населения
- 15 Уровень экономической неактивности населения
- 16 Потребление мяса населением
- 17 Индикаторы уровня жизни населения
- 18 Площадь занимаемого жилья населением
- 19 Макроэкономические показатели
- 20 Индекс бедности населения
- 21 Загрязнения воздушного бассейна
- 22 Радиоэкологическая напряженность
- 23 Общая заболеваемость населения
- 24 Заболеваемость населения туберкулезом
- 25 Заболеваемость населения вирусным гепатитом
- 26 Заболеваемость населения болезнями системы кровообращения
- 27 Заболеваемость населения болезнями органов дыхания
- 28 Заболеваемость населения с острыми кишечными заболеваниями
- 29 Заболеваемость населения злокачественными новообразованиями
- 30 Заболеваемость туберкулезом городского населения
- 31 Заболеваемость туберкулезом сельского населения
- 32 Смертность населения от туберкулеза
- 33 Болезненность туберкулезом детей
- 34 Болезненность туберкулезом подростков
- 35 Болезненность туберкулезом взрослых



- 36 Заболеваемость туберкулезом детей
- 37 Заболеваемость туберкулезом взрослых
- 38 Заболеваемость туберкулезом подростков
- 39 Число больных с впервые выявленной МЛУ ТБ
- 40 Заболеваемость туберкулезом с МЛУ
- 41 Заболеваемость туберкулезом у новых легочных случаев с положительным посевом
- 42 Заболеваемость туберкулезом с МЛУ. Взрослые и подростки
- 43 Заболеваемость туберкулезом с МЛУ. Дети
- 44 Заболеваемость населения туберкулезом (с положительной микобактерией)
- 45 Заболеваемость населения туберкулезом (с отрицательной микобактерией)
- 46 Заболеваемость населения туберкулезом (с положительной бациллой Коха)
- 47 Заболеваемость населения туберкулезом (с отрицательной бациллой Коха)
- 48 Заболеваемость туберкулезом по результатам мазка и посева мокроты у легочных случаев

Управлять ими не сложно, в верхней части каждой карты имеется простое меню: увеличение-уменьшение масштаба, движение карты в плоскости, кнопка Map Identify дает информацию по данной географической точке или области. Данные можно сохранить в области add results (Result) или вывести на принтер (Print). Слева от карт отображены слои, которые можно по выбору пользователя активировать или наоборот отключать. В зависимости от загрузки линии сервера, карты могут загружаться и реагировать с разной скоростью. Пример карты приведен на рисунке 8.

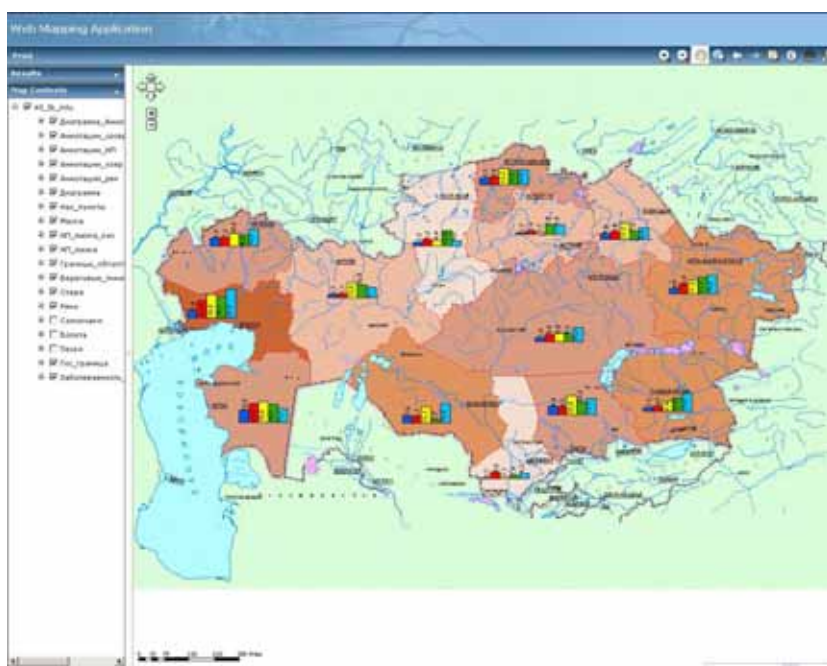


Рисунок 8- Заболеваемость туберкулезом с МЛУ (пример карты)

Кроме этого подготовлены картографические материалы (в виде готовых jpg файлов). Они расположены в том же раздела сайта.

### 1. По демографической ситуации:

Половозрастная структура населения в разрезе областей, по данным переписи 2009 г.

Естественный прирост населения РК в разрезе районов, за 2009 г.

Смертность населения РК в разрезе районов за 2009 г.

Младенческая смертность в разрезе районов за 2009 г.

Миграция населения РК в разрезе областей, за 2009 г.

Плотность населения в разрезе административных районов РК на начало 2010 г.

Национальный состав населения РК, в разрезе областей на 2009г.

Материнская смертность РК в разрезе областей, за 2009 г.

### 2. По социально-экономической ситуации:

Потребление мяса

Индикаторы уровня жизни

Площадь занимаемого жилья

Макроэкономические показатели

Индекс бедности населения.

### **3. По заболеваемости населения:**

Заболеваемости населения болезнями системы кровообращения.

Заболеваемости населения болезнями органов дыхания.

Заболеваемости населения острыми кишечными инфекциями.

Заболеваемости населения злокачественными новообразованиями.

### **4. По экологической ситуации**

По загрязнению атмосферы областей и крупных городов РК выбросами загрязняющих веществ, в т.ч. сернистым ангидридом, окисями углерода и азота в период с 2007 по 2010 гг.

В настоящее время решается вопрос о независимом размещении сервера ArcGis на серверной площадке ЦНЖ.

## 7. Накопление и управление данными проекта

В рамках реализации научно-технической программы осуществляется сбор индивидуальных и популяционных данных. Индивидуальный уровень заключается в сборе индивидуальных данных посредством базы данных (MS Access), таблиц (Excel) и персональных анкет (DatStat).

Для проекта разработаны базы данных по первичным случаям ТБ (рис.9, 10). Данная база данных предназначена для накопления и обработки данных, собранным по всем областям (и районам) страны.

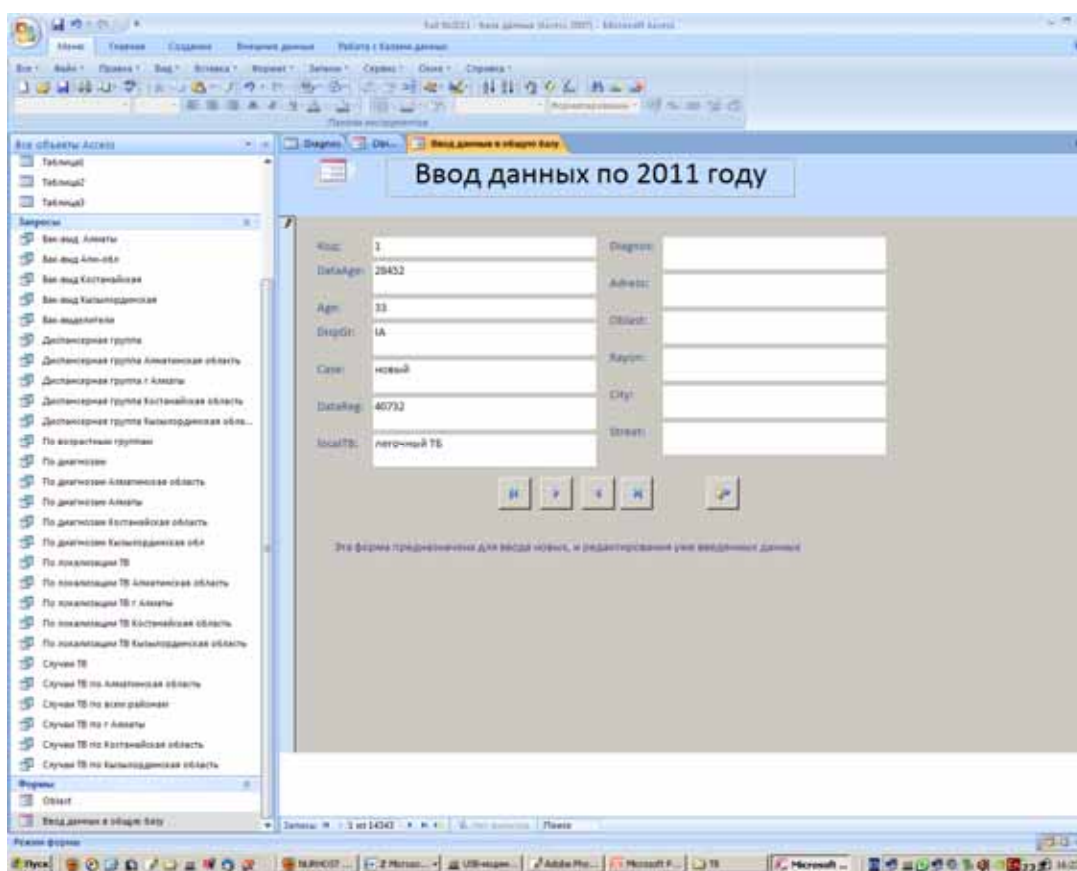


Рисунок 9 – База данных по первичным случаям ТБ

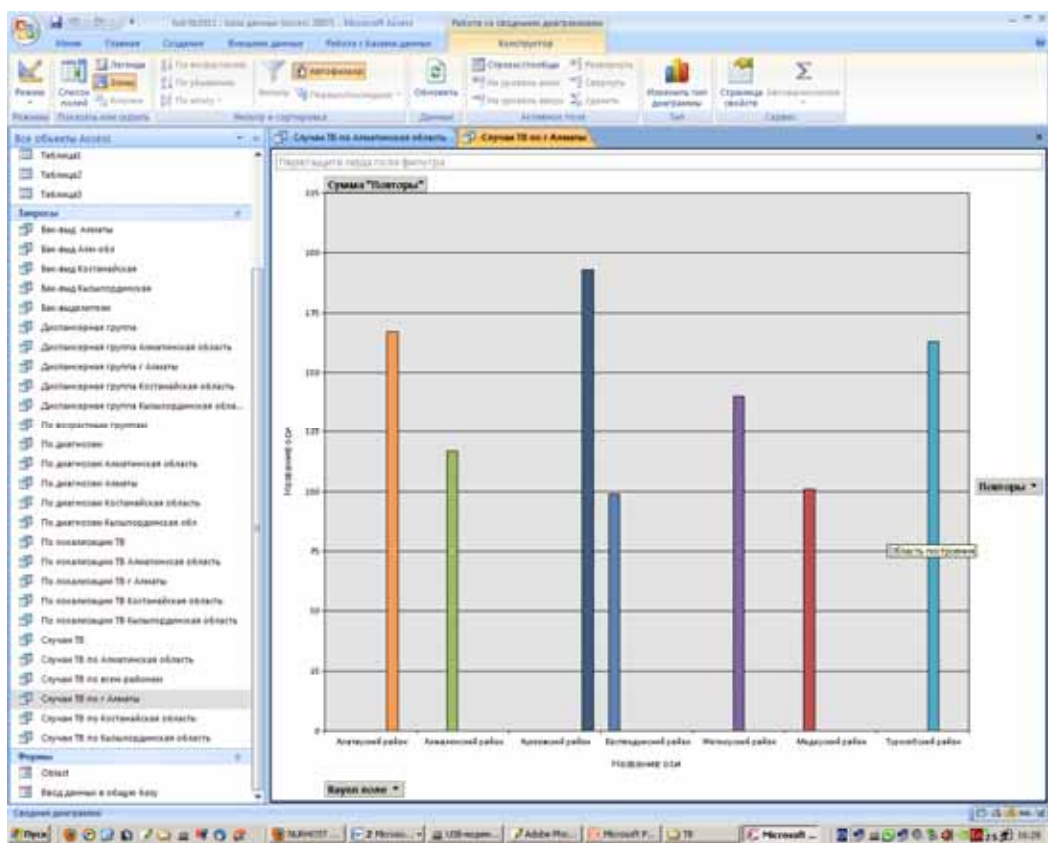


Рисунок 10 – Пример обработки и представления данных по базе

Существует аналогичная база по МЛЮ ТБ за 2007-2011 гг. Данные анализа этих баз размещены на web сайте в разделе Базы Данных.

Разработана пилотная база для сбора клинической и лабораторной информации об участниках исследования, которая является дополнением к проведению компьютеризированного опроса в DatStat.

Создана электронная форма Индивидуальной регистрационной карты в Access для заполнения врачами, которая содержит в себе лабораторную и клиническую информацию (рис.11-14).

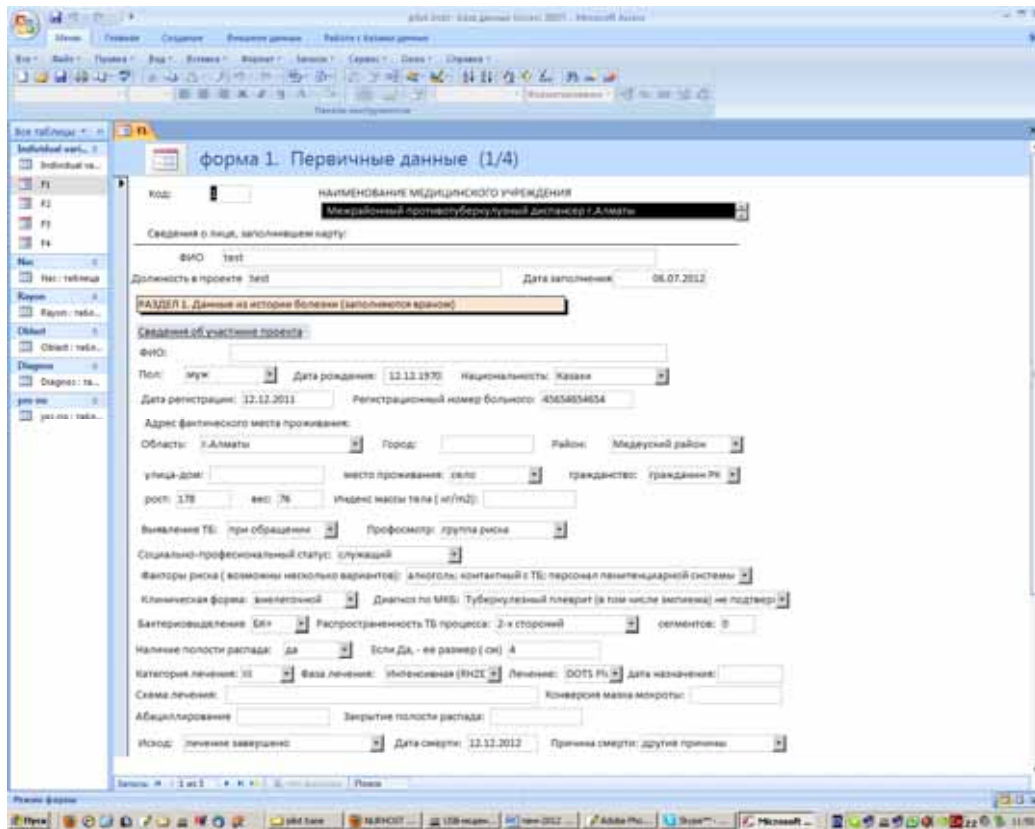


Рисунок 11 – Электронная форма индивидуальной регистрационной карты

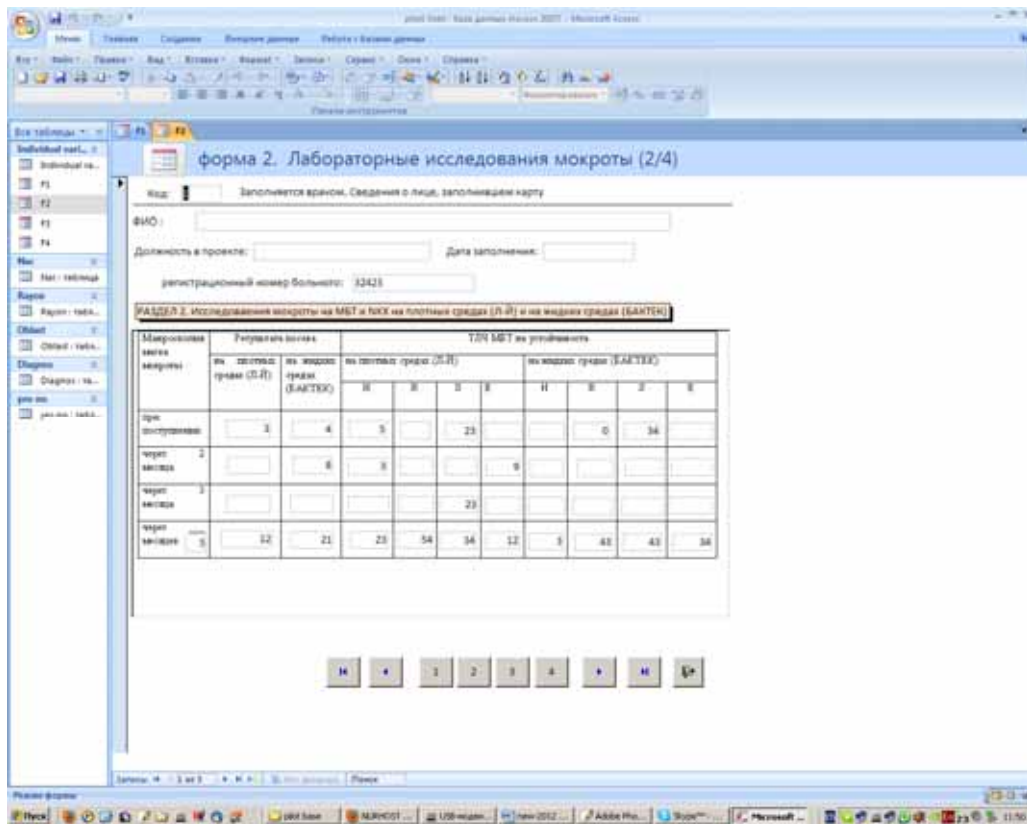


Рисунок 12 – Раздел лабораторных исследований мокроты

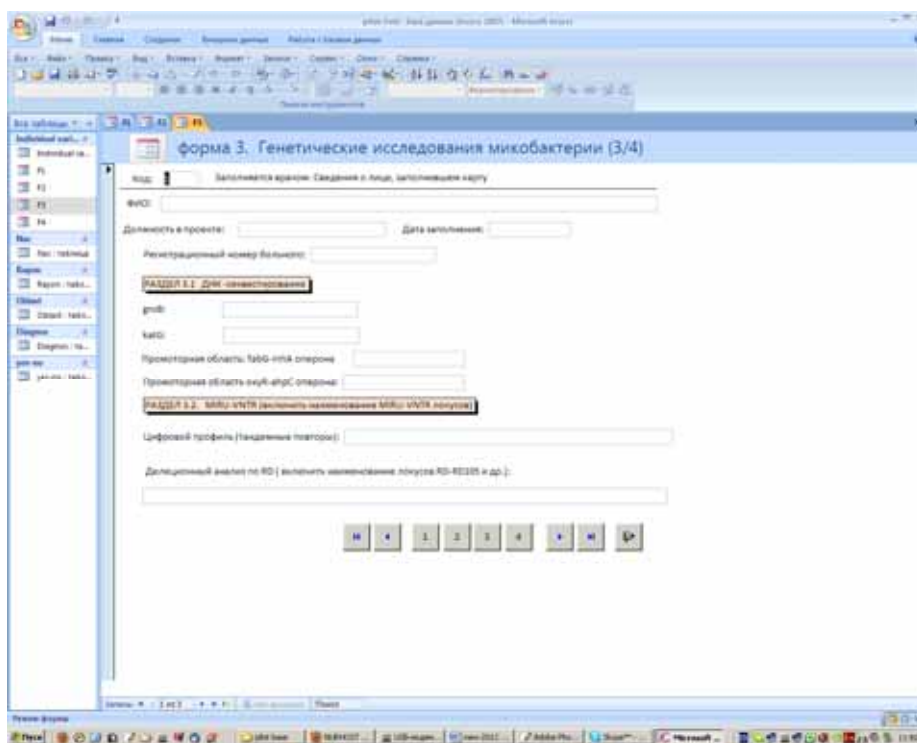


Рисунок 13– Раздел генетических исследований микобактерий

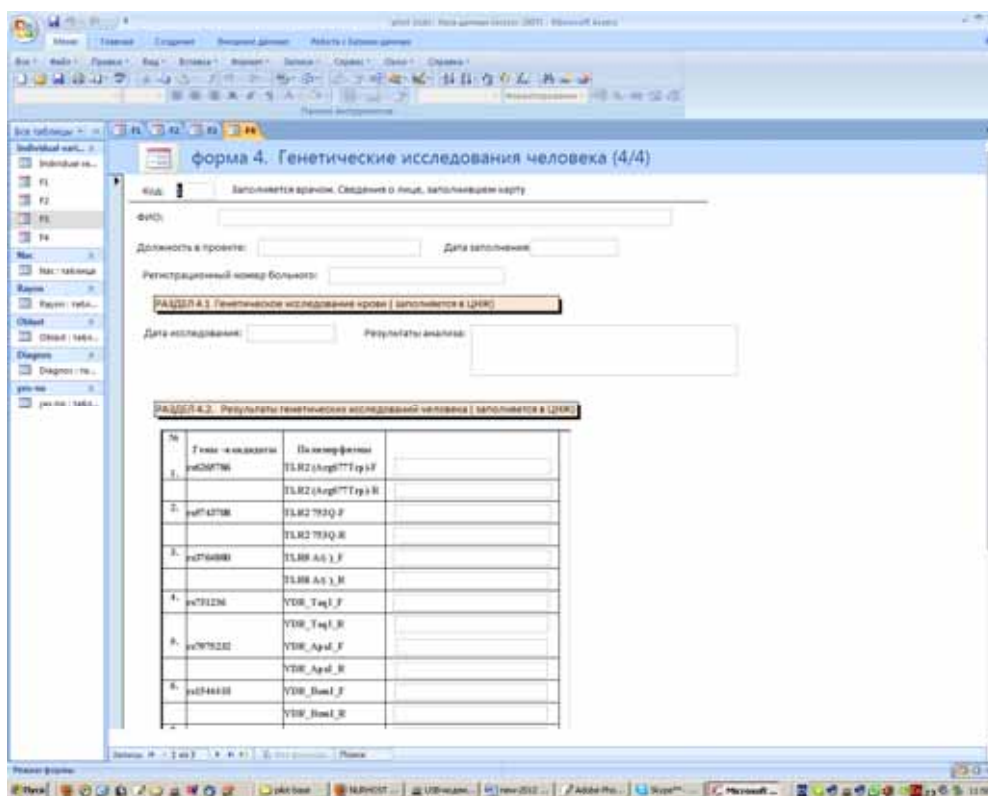


Рисунок 14 – Раздел генетических исследований человека

Популяционный – определяет сбор тех или иных данных с статистических наблюдений. В проекте производится систематизация по показателям:

- социально-демографические
- по заболеваемости
- экономические
- экологические

База данных по статистическим показателям представляет собой симбиоз обычной базы и геобазы в системе географического анализа ArcGis.

The screenshot shows a Microsoft Access database window with a table named 'Доля этносов\_2007'. The table contains data for 17 regions, including population percentages for different ethnic groups like Russians, Kazakhs, and Ukrainians.

Код	АВ	СР	состав	все национ	Казак	Русские	Узбеки	Украинцы
1	00	00	Республика Ю	100	59,18	23,63	2,86	2,86
2	11	00	Алматынская	100	43,53	36,48	6,57	0,10
3	13	00	Актюбинская	100	77,03	13,27	5,18	0,09
4	19	00	Алматынская	100	63,27	18,30	6,41	0,18
5	23	00	Атырауская	100	90,52	6,86	0,26	0,07
6	27	00	Западно-Каза	100	89,74	23,83	2,90	0,04
7	31	00	Жамбылская	100	66,34	14,51	4,49	2,16
8	35	00	Карагандинск	100	42,80	40,55	4,86	0,18
9	39	00	Костанайская	100	34,67	41,72	11,34	0,09
10	43	00	Мангистаулинск	100	95,37	3,03	0,09	0,14
11	47	00	Мангистаулинск	100	84,86	9,54	0,07	0,10
12	51	00	Южно-Казахст	100	89,75	6,50	0,39	17,26
13	55	00	Павлодарская	100	44,68	28,25	4,78	0,10
14	59	00	Северо-Казах	100	32,79	48,02	5,84	0,16
15	63	00	Восточно-Каза	100	52,79	42,12	6,82	0,08
16	71	00	Астана г.в.	100	60,19	27,83	3,36	0,66
17	75	00	Алматы г.в.	100	47,75	36,17	1,42	0,44

Рисунок 15- База данных по статистическим показателям

**Полевое оборудование.** Для сбора информации на местах закуплены портативные устройства (ноутбуки). Установлено все необходимое программное обеспечение, в т.ч база данных для пилотного сбора данных. А также анкеты в формате DatStat.

Для передачи собранных данных и связи используются 3G технология, предоставленная компанией Veeline.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем отчете представлены промежуточные результаты за 1-ое полугодие 2012 г.

Основные результаты за прошедший период включают в себя следующие виды выполненных работ и полученных результатов:

Подготовлен и представлен пакет документов для прохождения ЭК НЦПТ МЗ РК, Назарбаев Университета и Колумбийского Университета. Получено одобрение этических комитетов НЦПТ МЗ РК, ЦНЖ НУ.

Проведена пространственная привязка топографических бумажных карт территорий и обработка (векторизация) материалов растрового формата города Алматы (в масштабе 1:200 000) и Алматинской области (в масштабе 1: 2 500 000); Костанайской и Кызылординской областей (в масштабе 1: 2 500 000)

Произведен сбор отдельных данных по социально-экономической ситуации Алматинской области и г. Алматы: макроэкономические показатели, уровень безработицы населения. Векторизированы топографические бумажные карты территорий Костанайской и Кызылординской областей (в масштабе 1: 2 500 000) на основе использования программного обеспечения ArcGIS Desktop 10. Проведена картографическая редакция векторных основ Алматинской, Костанайской, Кызылординской областей (масштаб 1:2 500 000), и г.Алматы (масштаб 1: 200 000).Произведен сбор отдельных данных по демографической ситуации Алматинской области и г. Алматы: естественный прирост , национальный состав населения.Произведен сбор отдельных данных по экологической ситуации Алматинской области и г. Алматы (по выбросам вредных веществ в атмосферу : оксид углерода).

Утверждены окончательные варианты протоколов по микробиологическому компоненту исследования: «Условия отбора и транспортировки образцов для культивирования. Микроскопия и культивирование микобактерии. Тест на лекарственную чувствительность» и геномному компоненту исследования. Разрабатывается инфраструктура для полевой деятельности.

Создан каркас нового сайта на <http://tbkzproject.org> с хостингом на 3 года. Определены основные разделы сайта с отдельным доступом для участников проекта. Ежемесячно ведется информационное наполнение сайта.

Разработана структура геоинформационной базы данных в формате Microsoft Access 2010. Разработана база данных на основе MS Access 2007 для отработки накопленных данных (за 2011 г.) по форме ТВ 01. Осуществлена обработка базы данных по МЛУ ТВ за 2007-2011 гг с размещением данной информации на веб-сайте проекта. Разработана пилотная база (MS Access) для сбора клинической и лабораторной информации об участниках исследования, которая является дополнением к проведению компьютеризированного опроса в DatStat.

Проведен 2-х дневный тренинг сотрудников-исполнителей проекта (полевого штата) из г.Алматы, Алматинской, Кзыл-Ординской и Костанайской областей по сбору и менеджменту данных, протоколам и процедурам исследования, этическим вопросам (получению информированного согласия), критериям пригодности, рекрутинга и скрининга участников, процедурам сбора, хранения и транспортировки биоматериала в рамках программы, биобезопасности в микробиологических и генетических исследованиях. Проведен инструктаж по работе и вводу данных в DatStat. Полевое оборудование с программой DatStat передано исполнителям проекта в регионы. Общее количество участников тренинга - 18 человек. Количество часов – 16 час.

Проведен компьютерный тест и сертификация по этическим принципам исследований исполнителей программы согласно правилам Колумбийского университета.

Проведено пилотное исследование в г.Алматы. Отработан алгоритм процессов набора, скрининга, анкетирования, сбора и транспортировки биоматериала; клинической и лабораторной информации согласно протоколам исследования. Осуществлен рекрутинг и компьютеризированный опрос 12 участников исследования, сбор 12 образцов венозной крови и выделение ДНК МБТ 3 индекс-участников. Все биообразцы транспортированы в лабораторию геномики ЦНЖ НУ, г.Астана. Уточняются протоколы исследования с учетом пилота в г. Алматы. Установлено, что необходимо обеспечить контроль над получением достаточного количества материала (колоний) в мокроте, предоставляемой в Национальную референс-лабораторию НЦПТ для выделения ДНК. Для контроля процесса рекрутинга участников необходимо получать дополнительные сведения на лиц, не подошедших по критериям пригодности. Требуется детализировать метод выбора внешнего контроля и детализировать протокол и алгоритм действий с описанием всех возможных ситуаций с учетом местных условий. НЦПТ должен обеспечить сохранность культуры как минимум в течении 3-х месяцев после регистрации впервые выявленного

больного ТБ при условии достаточного количества и качества мокроты. Необходимо определить стандартный метод транспортировки биоматериала в ЦНЖ НУ г.Астана.

Проведено 8 рабочих совещаний с партнерами, в том числе рабочее совещание с участием руководителя научной темы от Колумбийского университета (КУ) Набилы эл Бассел и эксперта КУ Луизы Гилберт. Обсуждены программные и организационные вопросы по реализации НТП, проведению полевой фазы исследования в 2012 г. В рамках визита экспертов КУ в РК осуществлены консультации по процедурам сбора и менеджмента данных, проведен тренинг для исполнителей по этике биомедицинских исследований с последующей сдачей компьютерного теста, а также проведены встречи по обсуждению концепции статьи по эпидемиологии туберкулеза в Казахстане на основе существующих данных партнеров, собранных в ходе предыдущих проектов.

#### **Выводы:**

За отчетный период осуществлено обучение 18 специалистов (исполнителей проекта) из г.Алматы, Алматинской, Кызылординской, Костанайской областей этическим аспектам, протоколам и инструментам исследования, менеджменту данных в рамках программы.

Проведено пилотное исследование в г.Алматы, осуществлена транспортировка 12 образцов крови и 3 образцов ДНК МБТ. Выявлены методологические и практические сложности реализации полевой работы. Внесены требуемые изменения в протоколы и инструменты исследования.

Проведена картографическая редакция основ территорий г. Алматы, Алматинской, Костанайской и Кызылординской области с сбором отдельных данных по демографической и экологической ситуации.

Разработана структура геоинформационной базы данных и продолжается ее информационное оформление.

#### **ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

##### **для национальной противотуберкулезной программы:**

1. Дальнейшее совершенствование системы эпидемиологического надзора за ТБ и МЛУ ТБ, в частности внедрение молекулярно-генетического мониторинга штаммов

микобактерии туберкулеза для изучения популяционной вариабельности штаммов микобактерии, циркулирующих на территории Казахстана, а также их клинического и эпидемиологического значения для планирования контрольных и профилактических мероприятий.

2. Рассмотреть возможность внедрения новых технологий в систему эпидемиологического надзора, а именно геоинформационные системы, которые позволят отслеживать распространение заболевания, а также факторов риска в пространственном отношении и визуализировать процесс анализа данных

3. Расширить возможности для анализа данных национального электронного регистра больных туберкулеза и усилить контроль качества ввода данных. Данные индивидуального уровня, включая факторы риска ТБ и МЛУ ТБ имеют важное значение для составления эпидемиологического профиля больных ТБ и МЛУ ТБ. Тем не менее, на данный момент они не вводятся в регистр и представлены в национальных отчетов только в агрегированном виде.

#### **Для лаборатории геномики ЦНЖ:**

1. Поскольку IS6110-RFLP, MIRU-VNTR-типирование и сполиготипирование направлены на разные молекулярные мишени в геноме микобактерий и эти методы могут эффективно дополнять друг друга при проведении широкомасштабных филогенетических и эпидемиологических исследований, рекомендуется рассмотреть возможность внедрения IS6110 – RFLP и сполиготипирования в спектр методик молекулярно-генетических исследований, проводимых в лаборатории.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Dye C., Scheele S., Dolin P. et al. Consensus statement: Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project //Journal of the American Medical Association. - 1999. - Vol. 282. – P. 677-686.
- 2 M/XDR-TB: 2010 global report on surveillance and response (WHO/HTM/TB/2010.3)
- 3 Министерство Здравоохранения Республики Казахстан. Национальный Центр Проблем Туберкулеза. (2008). Руководство по контролю туберкулеза в Республике Казахстан, Алматыб 2008.
- 4 Ríos, M. (2009). A graphical study of tuberculosis incidence and trends in the WHO's European region (1980–2006). European journal of epidemiology, 24(7), 381-387. doi: 10.1007/s10654-009-9347-6
- 5 World Health Organization. (2011b). Global Health Observatory Data Repository: country statistics Kazakhstan Retrieved October 29, 2011, from <http://apps.who.int/ghodata/?vid=11400&theme=country>
- 6 Huffman, S. A., Veen, J., Hennink, M. M., & McFarland, D. A. (2011). Exploitation, vulnerability to tuberculosis and access to treatment among Uzbek labor migrants in Kazakhstan. Social Science & Medicine. doi: 10.1016/j.socscimed.2011.07.019
- 7 World Health Organization. (2009). Global Tuberculosis Control 2009: epidemiology, strategy, financing. WHO/HTM/TB/2009.411, Geneva, Switzerland.
- 8 World Health Organization. (2011c). Kazakhstan Tuberculosis Profile Retrieved November 4, 2011, from [https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO\\_HQ\\_Reports/G2/PROD/EXT/TB\\_CountryProfile&ISO2=kz&outtype=pdf](https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO_HQ_Reports/G2/PROD/EXT/TB_CountryProfile&ISO2=kz&outtype=pdf)
- 9 USAID. (2009). Kazakhstan Tuberculosis Profile Retrieved November 8, 2011, from [http://www.usaid.gov/our\\_work/global\\_health/id/tuberculosis/countries/asia/kazakhstan.pdf](http://www.usaid.gov/our_work/global_health/id/tuberculosis/countries/asia/kazakhstan.pdf)
- 10 Lönnroth, K., Jaramillo, E., Williams, B. G., Dye, C., & Raviglione, M. (2009). Drivers of tuberculosis epidemics: The role of risk factors and social determinants. Social Science & Medicine, 68(12), 2240-2246. doi: 10.1016/j.socscimed.2009.03.041

- 11 Национальный Центр Проблем Туберкулеза. Анализ эпидемиологической ситуации в РК за 1 квартал 2012 г.
- 12 A.Terlikbayeva, S.Hermosilla, T.Abildayev, T.Muminov, F.Akiyanova, A.Sharman, Z.Zhumadilov, S.Galea, N.Schluger, L.Bartkowiak, S.Yegeubayeva, N.El-Bassel. Tuberculosis in Kazakhstan: analysis of risk determinants in the national surveillance data.//BMC Infectious diseases, under review
- 13 Acquired rifamycin monoresistance in patients with HIV-related tuberculosis treated with once-weekly rifapentine and isoniazid. Tuberculosis Trials Consortium. Vernon A, Burman W, Benator D, Khan A, Bozeman L.Lancet. 1999 May 29;353(9167):1843-7
- 14 Faustini, A., A. J. Hall, C. A. Perucci (2006). Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax*, 61(2): 158-163.
- 15 Демкин В.В., Муминов Т.А., Бейсембаева Ш.А. и др
- 16 Ж. «Молекулярная генетика, микробиология и вирусология», 2008, №2, С.18-23. Россия
- 17 Ахматуллина Н.Б., и др. Кн.«От генетики вирусов до генетики человека», с.271-281, Алматы, 2010
- 18 Муминов Т.А., Бейсембаева Ш.А., Жакипбаева Б.Т. «Молекулярная диагностика - 2010».Сб. трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Том 1. с.154-156, 24-26 ноября 2010г, Москва
- 19 Gruft H., Johnson R., Claflin R. //Amer. Rev. Respir. Dis., 1984, V.130, P.96-97.
- 20 Van Soolingen D. //J. Intern. Med. – 2001. – Vol. 249. – P. 1- 26.
- 21 Нарвская О.В. Геномный полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis* и его значение в эпидемическом процессе: автореф. ... докт. мед. наук. – СПб., 2003. – 35 с.
- 22 Сапожникова Н.В. Особенности течения туберкулеза легких в зависимости от биологических свойств возбудителя. Автореф.дисс....канд.мед.наук. –С.-Петербург., 2003
- 23 Dye, C., K. Lonnroth, E. Jaramillo, BG Williams, M Raviglione. Trends in tuberculosis incidence and their determinants in 134 countries// Bulletin of the WHO. –2009. – Vol. 87. –P.683-691.
- 24 Bishai W., Graham N.M, Harrington S. e.a. Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy//JAMA.-1998.-Vol.280, N19.- P. 1679-1684.

- 25 Gascoyne-Binzi D., Barlow R., Frothingham R. e.a. // J. Clin. Microbiol.- 2001.- Vol.39, N.1.- P.69-74.
- 26 Gutierrez m., Vincent V., Aubert D. e.a. Molecular fingerprinting of M.tuberculosis and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area.// J. Clin. Microbiol.- 1998.- Vol.36.- P.486-492.
- 27 Rhee J., Piatek A., Harris I. e.a. //Ibid.-1999.-Vol.37.-N6- P.1764-1770.
- 28 Sola C., I.Filliol, M.C.Gutierrez et.al. Spoligotype database of Mycobacterium tuberculosis: Biogeographic distributijn of shared types and epidemiologic and phylogenetic perspectives.// Emerging infectious Diseases.- 2001.-Vol.7.-No.3.-P. 390.
- 29 van Rei A., Warren R., Richardson M. e.a.//N.Engl.J.Med.-1999.-Vol.341,N.16.- P.1174-1179.
- 30 Cole S., Brosch R., Parkhill J. e.a. Deciphering the biology of M.tuberculosis from the complete genome sequence.//Nature, 1998.- Vol.393.- P.537-544.
- 31 Шагинян И.А., Нестеренко Л.Н., Гришина Т.Д. и др. Исследование геномного полиморфизма штаммов M.tuberculosis// Журн.микробиол.-1996.-№3.-С.65-68.
- 32 Шемякин И.Г., Степаншина В.Н., манзенюк о.Ю. и др. Использование молекулярно-биологических методов для индивидуальной характеристики штаммов Mycobacterium tuberculosis// Журн.микробиол.-2000.-№2.-С.6-11.
- 33 Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H. Genetic relatedness among strains of the Mycobacterium tuberculosis complex: analysis of restriction fragment heterogeneity using cloned DNA probes.//Am.Rev.Respir.Dis.-1986.-Vol.133.-P.1065-1068.
- 34 Frothingham R. and Meeker-O`CONNELL W. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based jn variable number of tandem DNA repeats. //Microbiology. 1998.-V.144.-P.1189-1196.
- 35 Kamerbeek J., Schouls a., Kolk M. e.a. Simultaneous detection and strain differentiation of M.tuberculosis for diagnosis and epidemiology.// J. Clin. Microbiol.- 1997.- Vol.35.- P.907-914.
- 36 Thierry D., Brisson-Noel A., Vincent-Levy-Frebault V. e.a. Characterisation of a M.tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis.// J. Clin. Microbiol.- 1990.- Vol.28.- P.2668-2673.
- 37 Kremer K., van Soolinger R., Frothingham R. et al. Comparison of methods based on differrent molecular epidemiological markers for typing of M.tuberculosis complex strains;

interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility.// J.Clin. Microbiol. -1999.- V.37.-P.2715-2716.

38 Bishai W., Graham N.M, Harrington S. e.a. Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy//JAMA.-1998.-Vol.280, N19.- P. 1679-1684.

39 Small P.M., Hopewell P., Singh S./e/a/ The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods// N.Engl.J.Med.-1994.-Vol.301.- P.1704-1709

40 Van Soolingen, Borgdoff M., de Haas P.E.W. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997.// J.Infect. Dis - 1999.-Sep; 180(30):726-36.

41 Beck-sague c.S., Dooley S.W., Hutton M.D. e.a. Hospital outbreak of multydrug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections. Factors in transmission to staff and HIV-infected patients.//JAMA.-1992.- V.268.-P.1280-1286.

42 Van soolinger, Hermans P., de Haas P.E.W. et al. The occurrence and stability of insertion sequences in M.tuberculosis complex strains: evaluation of insertion-sequences-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis.// J.Clin. Microbiol. -1991.-V.29.-P.2578-2586.

43 J.R.Glynn, J.Whiteley, P.J.Bifani et.al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review. Emerging infectious Diseases.- 2002.-Vol.8.-No.8.-P.843-849.

44 Тунгусова О.С. Марьяндышев А.О.Молекулярная генетика туберкулеза// Проблемы туберкулеза, 2003.- №11, - С. 39-42.

45 Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Лимещенко Е.В. и др. Молекулярная эпидемиология туберкулеза//Большой целевой журнал о туберкулезе.-2000.-№7-8.-С.4-6.

46 J.D.A.van Embden, M.D.Cave, J.T.Crawford et.al. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendations for standardized methodology.// Journal of clinical microbiology.-1993.-P.406-409.

47 B. Mathema, N. E. Kurepina, P. Bifani, and B. N. Kreiswirth. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. Clinical Microbiology Review , Oct. 2006, p. 658–685



- 48 J.R.Glynn, J.Whiteley, P.J.Bifani et.al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerging infectious Diseases*.- 2002.-Vol.8.-No.8.-P.843-849.
- 49 Киншт В.Н. Молекулярно-эпидемиологический анализ штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Западно-сибирском регионе. Дис....к.м.н., Новосибирск, 2002.
- 50 Сурикова О.В., Войтих Д.В., Кузьмичева Г.А., Татьков С.И., Мокроусов И.В., Нарвская О.В., Филиппенко М.Л. Дифференциация микобактерий туберкулеза семейства W-Beijing, распространенных на территории Российской Федерации, на основе VNTR-типирования // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2005.- №3,- С.22-29
- 51 Van soolinger, Qian L., de Haas P.E.W. et al.Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis.// *J. Clin. Microbiol.*-1995.-V.33.-P.3234-3238.
- 52 Mazars E., Lesjean S., Gilbert M. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology //PNAS. - 2001.-Vol. 98, No. 4. - P. 1901-1906.
- 53 Cowan L.S., Diem L., Monson T. et al. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States //J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 688-695.
- 54 Allix C., Supply P., Fauville-Dufaux M. Utility of fast Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat genotyping in mycobacteriological analysis //Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 39. – P. 783-789.
- 55 Sola C., Horgen L., Maisetti J. et al. Spoligotyping followed by double-repetitive PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis //J. Clin. Microbiol. - 1998. - Vol.36. - P. 1122-1124.
- 56 Шопаева Г.А. Полиморфизм гена IL1 $\beta$  у больных туберкулезом легких в Казахстане // Вестник Казахского национального медицинского университета.- 2007.- С.105-108.
- 57 Шопаева Г.А., Филиппенко М.Л., Воронина Е.Н., Муминов Т.А., Бейсембаева Ш.А. Изучение полиморфизма гена SLC11A1 (NRAMP1) у больных туберкулезом легких в Казахстане // Терапевтический вестник.- 2010.- №1.- С.27-29.

58 Шопаева Г.А. Клинико-патогенетические особенности хронических вирусных гепатитов В и/или С у больных туберкулезом легких: автореф. ...доктор мед.наук.- Алматы, 2010. -47 с.

59 Maxine Caws, Guy Thwaites, Sarah Dunstan et al. The Influence of Host and Bacterial Genotype on the Development of Disseminated Disease with *Mycobacterium tuberculosis*// [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org)

60 Murugesan V. S. Rajaram, Michelle N. Brooks, Jessica D. Morris, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Linking Mannose Receptor Recognition to Regulation of Immune Responses // *J Immunol.* 2010 July 15; 185(2): 929–942. doi:10.4049/jimmunol.1000866.

61 Christina L. Lancioni, Qing Li, Jeremy J. Thomas et al. *Mycobacterium tuberculosis* Lipoproteins Directly Regulate Human Memory CD4<sub>+</sub> T Cell Activation via Toll-Like Receptors 1 and 2 // *INFECTION AND IMMUNITY*, Feb. 2011, p. 663–673 Vol. 79, No. 2

62 Alison A Motsinger-Reif<sup>1</sup>, Paulo RZ Antas<sup>2</sup>, Noffisat O Oki<sup>1</sup> et al. Polymorphisms in IL-1b, vitamin D receptor Fok1, and Toll-like receptor 2 are associated with extrapulmonary tuberculosis <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/37>

63 Yung-Che Chen, Chang-Chun Hsiao, Chung-Jen Chen et al. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms, pulmonary tuberculosis, and natural killer cell counts <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/11/17>

64 Pedro O. Flores-Villanueva, Jorge A. Ruiz-Morales, Chang-Hwa Song et al. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis// *J. of Experimental Medicine* Vol. 202, No. 12, December 19, 2005 1649–1658