

**УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ
НАРОДОВ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

УДК 616.248: 57.083.32:616.155.2:616.155.3

ВАСИЛЕНКО НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

**КЛИНИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ
РАЦИОНАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ
ЛЕГКИХ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.00.26 – фтизиатрия

ВИТЕБСК, 2008

Работа выполнена в учреждении образования «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»

Научный руководитель:

Семенов Валерий Михайлович. доктор
медицинских наук, профессор, декан лечеб-
ного факультета учреждения образования
«Витебский государственный ордена Друж-
бы народов медицинский университет»

Официальные оппоненты:

Жаворонок Сергей Владимирович. доктор
медицинских наук, профессор кафедры ин-
фекционных болезней учреждения образо-
вания «Белорусская медицинская академия
постдипломного образования»;

Кривонос Павел Степанович, кандидат
медицинских наук, доцент, зав. кафедрой
фтизиопульмонологии учреждения образо-
вания «Белорусский государственный меди-
цинский университет»

Библиотека ВГМУ



Оппонирующая организация:

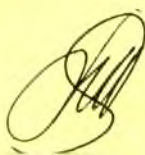
Учреждение образования «Гродненский Го-
сударственный медицинский университет»

Защита диссертации состоится 20 марта 2008 года в 12⁰⁰ часов
на заседании Совета по защите диссертаций Д 03.16.01 при учреждении образо-
вания «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский уни-
верситет» по адресу: 210023, г. Витебск, проспект Фрунзе 27а, ЛТК ауд. 503,
тел. 37-00-30.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Витебский государст-
венный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Автореферат разослан "19" *сентября* 2008 года.

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций,
доктор медицинских наук



М.М. Сачек

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение

Актуальность тематики туберкулеза обусловлена тем, что в Республике Беларусь, как и во многих других странах мира, наблюдается неуклонный рост распространенности лекарственно-резистентных штаммов микобактерий, с чем связана нестабильная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в мире [Мишин В.Ю., 2002; Гуревич Г.Л., 2007; Суркова Л.К., 2007, Нарвская О.В., 2002; Bifani P.J., 2002]. Многочисленные исследования описали клинические особенности туберкулеза органов дыхания, вызванного лекарственно-устойчивыми *M.tuberculosis*, обуславливающие низкую эффективность лечения таких больных и высокую летальность [Мишин В.Ю., 2002; Гуревич Г.Л., 2007]. Одной из главных причин развития лекарственной устойчивости, в особенности множественной, является неправильное лечение больных на этапе отсутствия данных о лекарственной чувствительности возбудителя.

В последнее время предложено множество режимов и схем полихимиотерапии туберкулеза, вызванного лекарственно-резистентными *M.tuberculosis*, однако отсутствуют бесспорные доказательства преимуществ какой-либо из предложенных схем. При этом длительность противотуберкулезной терапии таких больных возрастает до 24 месяцев, увеличивая частоту развития побочных эффектов противотуберкулезной терапии. Возрастает также в десятки раз и стоимость лечения таких больных, связанная как с использованием дорогих противотуберкулезных препаратов резервного ряда, так и с купированием осложнений противотуберкулезной терапии.

Современный уровень микробиологических исследований и неблагоприятная эпидемическая ситуация требует новых подходов к мониторингу структуры популяции *M.tuberculosis* и слежению за распространением наиболее эпидемиологически значимых штаммов, что позволит повысить эффективность противотуберкулезных мероприятий и эпидемиологического надзора за туберкулезом. Многочисленные исследования генетической структуры популяции [О.В. Нарвская и др., 2002; И.Ю. Иванов и др., 2004; M.Y. Chan et al., 2001; J.A. Caminero et al., 2001; Dahle U.R. et al., 2001; I.Filliol et al., 2003; J.R. Glynn et al., 2002; N. González et al., 2004], проводимые в различных странах мира, позволили создать международный компьютерный банк генотипов *M. tuberculosis*, являющийся основой изучения глобальной эпидемиологии туберкулеза и филогении возбудителя.

До настоящего времени отсутствуют как единые взгляды на роль различных генотипов *M. tuberculosis* в возникновении и распространении лекарственно-резистентных штаммов возбудителя на отдельной географической террито-

рии, так и на роль различных генотипов *M. tuberculosis* на течение и клинические проявления специфического процесса.

Разработка стандартизованных режимов полихимиотерапии больных туберкулезом с высоким риском лекарственной устойчивости возбудителя для проведения эффективной противотуберкулезной терапии в период отсутствия лабораторных данных о лекарственной чувствительности возбудителя должна быть основана на результатах изучения фенотипических и генетических вариантов лекарственно-резистентных *M.tuberculosis* в Беларуси с помощью фенотипических и молекулярно-генетических методов, что обеспечит проведение противотуберкулезных мероприятий с наибольшей эффективностью.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертация является частью плана НИР УО «Витебский государственный медицинский университет по теме: «Клинико-иммунологическая характеристика течения туберкулеза легких при воздействии на организм внутренних и внешних факторов» (номер госрегистрации № 20012869). Исследования также являются частью проекта «Генотипирование лекарственно-резистентных микобактерий туберкулеза на территории Республики Беларусь», проводимого Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (Договор №Б04М-190 от 3 мая 2004 года, номер госрегистрации 20053721).

Цель исследования. Клинико-микробиологическое обоснование эффективных схем стартовой антибактериальной терапии больных туберкулезом с высоким риском лекарственной устойчивости возбудителя.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить фенотипические варианты резистентности к антибактериальным препаратам штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Беларусь.
2. Выявить генотипы лекарственно-резистентных *M.tuberculosis* и охарактеризовать генетическую структуру популяции *M.tuberculosis*, распространенной на территории Республики Беларусь.
3. Разработать критерии предполагаемой лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* у больных туберкулезом органов дыхания.
4. Обосновать и изучить эффективность эмпирического режима полихимиотерапии на начальном этапе лечения у больных с высоким риском лекарственной устойчивости возбудителя.

Объектом исследования явились больные различными клиническими формами лекарственно-устойчивого туберкулеза органов дыхания.

Предмет исследования – результаты фенотипических и молекулярно-генетических исследований лекарственно-резистентных штаммов *M.tuberculosis*.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. В Республике Беларусь имеет место генетическая неоднородность лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis*, которые входят в состав пяти генетических семейств: Beijing, LAM, T, Haarlem, X. Преобладают штаммы, принадлежащие к споллиготипам R0/1 (генотип Beijing) и R27/266. Впервые установлена циркуляция в Беларуси *M.tuberculosis* новых споллиготипов R143, R144 и R145, незарегистрированных в международном банке данных SpolDB4.0.
2. Возбудитель туберкулеза на территории различных областей Беларуси характеризуется разнообразием фенотипических вариантов резистентности с преобладанием штаммов с одновременной устойчивостью к трем противотуберкулезным препаратам (изониазиду, рифампицину и стрептомицину). Структура фенотипических вариантов лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* изменяется в динамике: снижается частота встречаемости монорезистентных штаммов с одновременным возрастанием числа штаммов с устойчивостью к четырем препаратам (изониазиду, рифампицину, стрептомицину и канамицину).
3. Стартовый режим полихимиотерапии больных туберкулезом с высоким риском лекарственной устойчивости возбудителя, включающий не менее 5 - 6 противотуберкулезных препаратов, в том числе 1 – 2 резервных, должен определяться с учетом мониторинга изменений фенотипических и генетических вариантов *M.tuberculosis*, что позволяет повысить эффективность лечения больных туберкулезом легких.

Личный вклад соискателя. Настоящая работа выполнена автором самостоятельно, включая подбор групп больных для обследования, их клиническое и лабораторное обследование, бактериоскопическое и бактериологическое выделение возбудителя туберкулеза и определение лекарственной устойчивости методом абсолютных концентраций, выделение ДНК лекарственно-резистентных штаммов *M.tuberculosis*, анализ и интерпретация полученных результатов. Соискателем изучены структура фенотипических вариантов лекарственной резистентности *M.tuberculosis* в различных регионах Беларуси, прогностические критерии развития устойчивости возбудителя и особенности клинического течения лекарственно-резистентного туберкулеза органов дыхания, эффективность режима полихимиотерапии больных с индивидуальными факторами риска развития резистентности на начальном этапе лечения. Молекулярно-генетические исследования проводили совместно в лаборатории молекулярной микробиологии (руководитель - д.м.н. О. В. Нарвская) Федерального

государственного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора».

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований и основные положения диссертации доложены и обсуждены на Пленуме Белорусского научного общества фтизиатров «Совершенствование диспансерного наблюдения и лечения больных туберкулезом» (Витебск, 2001); Международной научно-практической конференции «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Минск, 2003); V съезде инфекционистов Республики Беларусь «Инфекционные болезни человека» (Минск, 2003); 56-ой, 57-ой, 58-ой, 59-ой, 60-ой, 62-ой научной сессии ВГМУ (Витебск, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2007); Международной научно-практической конференции «Студенческая медицинская наука XXI века» (Витебск, 2004), областном семинаре «Инфекционные поражения дыхательных путей» (Витебск, 2005); Республиканской научно-практической конференции «Особенности диагностики и лечения мультирезистентного туберкулеза» (Минск, 2006), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика инфекционных болезней» (Минск, 2007).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы, с общим количеством страниц 30, в том числе: 4 статьи в реферируемых научных журналах, 14 статей в сборниках научных трудов, 5 – в тезисах докладов съездов, научных конференций, конгрессов и семинаров, из них: 1 - зарубежная публикация.

28.04.06. МЗ РБ утверждена инструкция «Эмпирические режимы полихимиотерапии больных туберкулезом органов дыхания с высоким риском развития резистентности возбудителя заболевания на начальном этапе лечения».

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, выводов, практических рекомендаций и списка используемых источников. Объем диссертации - 148 страниц машинописного текста. Основные положения диссертации, исключая таблицы, рисунки и приложения, изложены на 90 страницах. Работа иллюстрирована 15 таблицами, 23 рисунками. Библиография содержит 208 источников, из которых 77 работ русскоязычных авторов и 131 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В исследование по определению чувствительности к противотуберкулезным препаратам было включено 170 клинических изолятов *M tuberculosis*, вы-

деленных от больных активным туберкулезом, находившихся на лечении в Витебском, Гродненском, Могилевском, Брестском областных противотуберкулезных диспансерах в период с февраля 2000 по март 2002 года и 197 клинических изолятов *M.tuberculosis*, выделенных от больных активным туберкулезом в Витебской, Гродненской, Минской, Могилевской и Брестской областях в период с ноября 2004 по март 2005 года, 194 из которых были впоследствии изучены с помощью двух молекулярно-генетических методов.

Первый - метод обнаружения полиморфизма DR-области хромосомной ДНК *M.tuberculosis*, позволяющий определить сполиготип выделенных штаммов, второй метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов IS6110 ДНК *M.tuberculosis*. В совокупности избранные методы геноидентификации позволяют выявить спектр генотипов лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Беларуси и заложить основу генетического маркирования возбудителя туберкулеза в Республике Беларусь с целью выявления наиболее эпидемически значимых штаммов и выявления среди населения групп риска, в которых распространение подобных штаммов наиболее значимо.

Данные, полученные в результате проведенных исследований, обрабатывались статистически и оценивались на основе общепринятых критериев (среднеквадратичное отклонение и его ошибка, кластерный анализ и др.) с применением пакета компьютерных программ Statgrafics Plus 2.1 for Windows, а также пакета анализа статистических данных, встроенного в MS Excel.

Фрагменты работы выполнены совместно с О.В. Нарвской, Е.В. Лимещенко и А.А. Вязовой (Санкт-Петербургский НИИЭМ имени Пастера).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

В ходе работы установлено, что для Беларуси характерно разнообразие фенотипических вариантов лекарственной резистентности *M.tuberculosis* с преобладанием штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Наиболее распространенными фенотипическими вариантами резистентности во всех исследованных областях Республики Беларусь являются: устойчивость *M.tuberculosis* к комбинации изониазида с рифампицином и стрептомицином ($10,4 \pm 3,5$), а также устойчивость *M.tuberculosis* к комбинации изониазида с рифампицином, стрептомицином и канамицином ($7,6 \pm 5,0$). Анализ исследуемых штаммов лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis* показал тенденцию нарастания лекарственной резистентности в течение последних пяти лет: снижается частота встречаемости монорезистентных штаммов с одновременным нарастанием штаммов с устойчивостью к четырем противотуберкулезным препаратам (таблица 1).

Таблица 1 - Сравнительная характеристика структуры фенотипической резистентности *M.tuberculosis* в 2001 - 2002 г.г. (n=170) и 2004 - 2005 г.г (n=197)

Фенотипическая резистентность	Число лекарственно-устойчивых штаммов МБТ (M - ср. знач.)		U-тест Манна-Уитни
	2001 - 2002г.г.	2004 - 2005г.г.	
S	3,75	2,0	p<0,04
R	1,75	0,2	p=0,14
H	4,25	2,0	p<0,05
SH	3,25	2,8	p<0,5
HR/M	1,50	2,2	p<0,5
SR/M	3,75	2,0	p<0,18
SHR/M	15,00	10,4	p<0,5
SRK	1,00	1,4	p<0,3
SHK	0,25	0,6	p<0,18
HSK	0,50	0,6	p<0,6
SHRK/K	2,50	2,6	p<0,04

Установлено, что наиболее часто развивается лекарственная устойчивость к стрептомицину (79,2 – 85,1%), что ограничивает возможность его использования для лечения больных с предполагаемой лекарственной устойчивостью на всех этапах лечения. В тоже время среди впервые выявленных больных установлен низкий уровень устойчивости к канамицину – 5,5%. Это, в свою очередь, дает основание рекомендовать использование данного антибиотика на начальных этапах лечения больных туберкулезом с высоким риском развития резистентности возбудителя. Сохранение у подавляющего большинства лекарственно-устойчивых штаммов *M.tuberculosis* чувствительности к ПАСК даст возможность рекомендовать его использование у больных с предполагаемой лекарственной устойчивостью на первоначальных этапах лечения.

Проведено генотипирование 194 лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* методом полимеразной цепной реакции, которое выявило принадлежность 85 (43,8%) из 194 штаммов *M. tuberculosis* к генетическому семейству Beijing. В дальнейшем, у всех штаммов «не-Beijing» и 23 штаммов Beijing была изучена генетическая однородность по DR-локусу хромосомы методом сподиготипирования, основанным на выявлении полиморфизма DR локуса хромосомы, который содержит короткие прямые повторы нуклеотидов размером 36 пар оснований, разделенные вариабельными по протяженности участками – спейсерами.

В результате сподиготипирования 132 штаммов *M. tuberculosis* выявлено 22 варианта профилей сподиготипирования (сподиготипов), которые представлены на рисунке 1 в виде схематических профилей гибридизации амплифицированного участка ДНК с набором из 43 стандартных спейсерных олигонуклеотидов.

Сполиготип		Профиль гибридизации	Число штаммов (n=132)	Генетическое семейство
Russia	SpolDB4			
R0	1		23	Beijing
R2	53		2	T1
R9	50		1	H3
R23	237		3	U (H3)
R136	46		1	U (H)
R11	42		14	LAM-9
R137	39		1	34-(CEU1)
R24	1254		1	X1
R124	150		2	LAM1
R30	254		6	15 RUS1
R139			2	
R127	444		1	H
R16	35		1	H4
R144			1	
R138			7	
R142	875		1	I2
R14	252		5	LAM-9
R17	266		55	T1
R19	262		2	H4
R145			1	
R143			1	
R141			1	

и – наличие гибридизации; п – отсутствие гибридизации.

Рисунок 1 - Сполиготипы лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* в Республике Беларусь

Профили сполиготипирования штаммов *M. tuberculosis* сравнивали с имеющимися в базе данных ФГУН СПбНИИЭМ Пастера Роспотребнадзора и SpolDB4. Большинство профилей сполиготипирования имели аналоги в существующих базах данных: 88,6% - в Российской (см. выше) и 90,2% (119 штаммов) — в SpolDB4. 23 штамма *M. tuberculosis* генетического семейства Beijing имели сполиготип R0/1, который характеризует отсутствие 1-34 сигналов в профиле гибридизации. По данным Brudey et al. (2006), сполиготип 1, генотипа Beijing, выявленный у 11% изолятов *M. tuberculosis* различного географического происхождения, является одним из наиболее распространенных в мире.

Установлено, что 108 (99,1%) из 109 штаммов *M. tuberculosis*, не принадлежавших к генотипу Beijing, имели сходные профили гибридизации, характерной чертой которых было отсутствие спейсеров 33-36 (Рис. 1). Среди них наиболее распространенными оказались штаммы сполиготипа R27/266, характеризующиеся одновременным отсутствием 21-24 и 33 – 36 сигналов в профиле гибридизации (Рис. 1). Доля штаммов этого сполиготипа составила 28,4% (55 из 194). Сполиготип R27/266 относят к подсемейству T1 генетического семейства T, наиболее распространенного в Европе. Возможно, сполиготип R27/266 является эндемическим для Беларуси. Вместе с тем, столь широкая циркуляция

штаммов этого спорогиппа на изучаемой территории требует углубленного изучения эпидемиологических особенностей его распространения.

Доля штаммов различных генотипов в популяции лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* на территории изученных областей Беларуси представлена на рисунке 2.

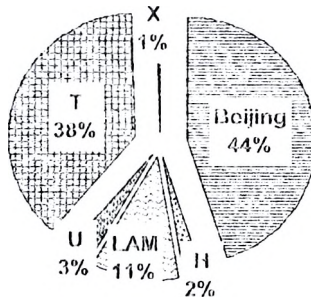


Рисунок 2 – Доля штаммов различных генотипов в популяции лекарственно-устойчивых *M. tuberculosis* на территории Республики Беларусь

Учитывая тот факт, что изменения генома *M. tuberculosis*, возникающие за счет транспозиций IS6110 происходят независимо от изменений структуры DR-локуса (Van Embden, 2000), у 85 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в Витебской, Могилевской, Минской, Брестской и Гродненской областях, и отнесенных по результатам ПЦР к генотипу Beijing, был изучен полиморфизм по маркеру IS6110.

У 80 изученных штаммов лекарственно устойчивых *M. tuberculosis* было определено 6 типов профилей IS6110-RFLP. В целом, обнаруженные профили различались по числу (от 15 до 19) и по молекулярной массе фрагментов рестрикции хромосомной ДНК, содержащей участок IS6110. Двадцать пять (31,3%) из 80 штаммов *M. tuberculosis* имели индивидуальные (т.е. обнаруженные лишь у одного штамма) варианты профилей IS6110-RFLP, остальные штаммы представляли 4 кластера, в состав которых входили от 2 до 35 штаммов *M. tuberculosis* с идентичными (коэффициент сходства $\geq 95\%$) вариантами профилей IS6110-RFLP. В состав двух кластеров B38 и C31 входило по два штамма *M. tuberculosis*. Два других кластера являлись значительно более многочисленными, в их состав входило: в кластер A0 - 13 штаммов и в кластер B0 - 35 штаммов *M. tuberculosis*. Наибольшую эпидемическую опасность представляют собой штаммы *M. tuberculosis* A0 и B0 генотипа Beijing, представленные на изу-

ченной территории наибольшим числом штаммов - 60,0 % (n= 48). Так, кластер А0 включал 13 штаммов, из которых 11 были получены от впервые выявленных больных. Из всех 35 штаммов, входящих в кластер В0, 15 были получены от впервые выявленных больных туберкулезом органов дыхания. Причем между заболеваниями не было установлено связей при традиционном эпидемиологическом исследовании. Такое относительно высокое число кластеризованных штаммов *M.tuberculosis* генотипа Beijing в Республике Беларусь подтверждают имеющиеся в литературе данные о высокой трансмиссивности и контагиозности штаммов этого генетического семейства, в особенности профилей А0 и В0.

В результате изучения клинических особенностей туберкулеза, вызванного лекарственно-резистентными штаммами *M.tuberculosis*, выявлены прогностические критерии возникновения лекарственно-резистентного туберкулеза органов дыхания. Их можно разделить на две группы: социальные и медицинские (анамнестические, клинические, рентгенологические, бактериологические и лабораторные). К *социальным* признакам возникновения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких могут быть отнесены: отсутствие семьи и трудовой занятости, злоупотребление алкоголем, пребывание в учреждениях пенитенциарной системы. *Анамнестические* прогностические признаки лекарственной устойчивости включают: наличие в анамнезе контакта с больным открытой формой туберкулеза с выделением лекарственно-резистентных *M.tuberculosis*, проведение в прошлом операции по поводу туберкулеза органов дыхания с кратковременным курсом послеоперационного лечения, длительное течение туберкулезного процесса, наличие сопутствующих заболеваний органов дыхания и злоупотребление алкоголем. *Клинически* лекарственно-устойчивые формы характеризуются наличием в течение длительного времени выраженных симптомов интоксикации с высокой температурой тела, потерей массы тела более 10% от исходной, наличием бронхообструктивного синдрома. *Рентгенологические* прогностические критерии включают: наличие значительного суммарного размера полостей распада, наличие множественных средних и крупных размеров каверн в легочной ткани, распространенное поражение легочной ткани. *Бактериологические* прогностические критерии характеризуются: наличием обильного бактериовыделения при бактериоскопическом методе исследования мокроты, а также выявлением вторичной патогенной бронхолегочной инфекции. К *лабораторным* прогностическим критериям относятся: СОЭ более 30 мм/ч – при поступлении, уровень лейкоцитов в крови более $9,07 \pm 0,55 \times 10^9 / \text{л}$, гематологический показатель интоксикации более $4,77 \pm 0,81$.

Исследование индивидуальных факторов риска развития (прогностических критериев) лекарственной устойчивости у впервые выявленных больных позволяет выделить дополнительную лечебную категорию: больные туберкулезом органов дыхания с предполагаемой лекарственной устойчивостью.

Исследования эффективности и переносимости индивидуализированного режима полихимиотерапии пятью противотуберкулезными препаратами (комбинации изониазида, рифампицина, канамицина, пиразинамида и ПАСК) на начальном этапе лечения проведены у 43 больных с различными клиническими формами туберкулеза легких, имеющих индивидуальные факторы риска развития лекарственной устойчивости (1 группа), в возрасте от 19 до 50 лет, из них 33 мужчин и 10 женщин. Особенности предлагаемого режима полихимиотерапии является исключение из схемы лечения больных с индивидуальными факторами риска развития резистентности *M.tuberculosis* стрептомицина, ввиду широкого распространения устойчивости к данному препарату у больных туберкулезом и замена его канамицином (или амикацином), а также включение в схему лечения ПАСК в качестве пятого противотуберкулезного препарата на первоначальных этапах лечения. Контрольную группу составили 40 аналогичных больных, имеющих индивидуальные факторы риска развития лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза (2 группа), однако получавших лечение стандартными схемами полихимиотерапии, соответствующими ДOTS. Обе группы были сопоставимы по полу, возрасту и клиническим формам заболевания.

Впервые выявленным больным туберкулезом с деструктивными, распространенными и остро прогрессирующими процессами в легких, а так же больным с рецидивами туберкулеза и в случае повторного лечения с перерывом 2 и более месяца с предполагаемой лекарственной устойчивостью, т.е. имеющим прогностические критерии развития лекарственной резистентности возбудителя на начальном эмпирическом этапе **в течение первых 2 месяцев лечения**, требующихся для лабораторного определения лекарственной чувствительности возбудителя, назначали 5 противотуберкулезных препаратов: изониазид 10% - 5,0 внутримышечно ежедневно (или внутривенно - при распространенных и остро прогрессирующих формах туберкулеза), рифампицин 0,45 на 5% растворе глюкозы по 300 мл внутривенно капельно ежедневно, канамицин 1,0 внутримышечно ежедневно № 60 (или амикацин 1,0 внутримышечно ежедневно № 60), пиразинамид 2,0 перорально ежедневно, ПАСК 10,0 - 12,0 перорально ежедневно однократно в сутки, запивая молоком.

В результате лечения нормализация температуры тела через два месяца лечения была достигнута у 89,4±4,8% больных 1-ой группы и 80,2±5,3% больных 2-ой группы.

Значительно быстрее на фоне применения стартового режима происходило рассасывание инфильтрации и уменьшение площади поражения легочной ткани. Так, у больных 1-ой группы этот показатель составлял через 2 месяца - 72,7±5,2% ($p<0,05$), через 3 месяца - 94,1±4,8%, тогда как у больных 2-ой группы - 60,1±5,7% и 85,9±5,6% соответственно.

Убедительные данные были получены при сравнении показателей снижения и прекращения бактериовыделения. Так, через 2 месяца у больных 1-ой группы они составили – $45,4 \pm 4,9\%$, через 3 месяца – $82,2 \pm 4,4\%$. У больных 2-ой группы через 2 месяца этот показатель был на уровне $30,0 \pm 4,6\%$, через 3 месяца – $74,1 \pm 5,1\%$.

Уменьшение в размерах и закрытие полостей распада у больных, получавших стартовый режим полихимиотерапии (1 группа) через 2 месяца было отмечено у $36,2 \pm 4,5\%$ ($p < 0,05$), через 3 месяца – $77,8 \pm 4,3\%$ ($p < 0,05$). Показатели больных 2-ой группы составили: $25,6 \pm 4,3\%$ (2 мес.), $66,9 \pm 4,6\%$ (3 мес.).

Проведенные нами исследования показали, что используемый режим полихимиотерапии больных туберкулезом органов дыхания с прогностическими критериями резистентности возбудителя по предлагаемой нами методике лечения повышает эффективность лечения и сокращает сроки пребывания больных в стационаре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Для Республики Беларусь характерен фенотипический полиморфизм популяции лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis* с преобладанием штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Наиболее распространенными фенотипическими вариантами резистентности во всех исследованных областях Республики Беларусь являются: устойчивость *M.tuberculosis* к комбинации изониазида с рифампицином и стрептомицином ($10,4 \pm 3,5$), а также устойчивость *M.tuberculosis* к комбинации изониазида с рифампицином, стрептомицином и канамицином ($7,6 \pm 5,0$). Анализ исследуемых штаммов лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis* показал тенденцию нарастания лекарственной резистентности в течение последних пяти лет: снижается частота встречаемости монорезистентных штаммов с одновременным нарастанием штаммов с устойчивостью к трем, четырем и более противотуберкулезным препаратам. Установлено, что наиболее часто развивается лекарственная устойчивость к стрептомицину ($79,2 - 85,1\%$), что ограничивает возможность его использования для лечения больных с предполагаемой лекарственной устойчивостью на всех этапах лечения, в особенности на начальном этапе [3-А, 5-А, 6-А, 8-А, 9-А, 10-А, 12-А, 14-А, 19-А, 20-А, 21-А, 23-А].
2. Установлена генетическая неоднородность лекарственно-устойчивых, в том числе мультирезистентных, штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих в большинстве областей Беларуси с преобладанием штаммов, принадлежащих к сполиготипам R0/I (генотип Beijing) и R27/266. В целом, изученная популяция лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis* была неоднородна по DR-локусу хромосомы и включала представителей пяти глобально распростра-

- ненных в мире генетических семейств: Beijing, LAM, T, Haarlem, X. Суммарная доля штаммов, входящих в эти генетические семейства, составила 90,6%. Установлено, что *M.tuberculosis* сполиготипов R143, R144 и R145, обнаруженные в единичных случаях в некоторых областях Беларуси, не зарегистрированы в международном банке данных SpolDB4.0. Наибольшую эпидемическую опасность представляют собой штаммы *M.tuberculosis* A0 и B0 генотипа Beijing, представленные на изученной территории наибольшим числом штаммов - 60,0 % (n= 48). Высокое число кластеризованных штаммов *M.tuberculosis* генотипа Beijing в Республике Беларусь подтверждают имеющиеся в литературе данные о высокой трансмиссивности и контагиозности штаммов этого генетического семейства, в особенности профилей A0 и B0 [4-А, 15-А, 17-А].
3. Установлены прогностические критерии лекарственной устойчивости у больных туберкулезом: 1) наличие в анамнезе контакта с больным открытой формой туберкулеза с выделением лекарственно-резистентных *M.tuberculosis*; 2) наличие сведений о пребывании ранее пациента в учреждениях пенитенциарной системы (ИТУ или СИЗО); 3) предыдущее лечение противотуберкулезными препаратами (все случаи рецидивов туберкулеза; все случаи повторного лечения, в том числе, больные, прервавшие противотуберкулезное лечение более чем на два месяца); 4) остро прогрессирующее течение и распространенные формы туберкулеза органов дыхания [1-А, 7-А, 11-А, 18-А].
 4. Больным туберкулезом I группы учета с деструктивными, распространенными и остро прогрессирующими процессами в легких, имеющим прогностические критерии развития лекарственной резистентности возбудителя, в фазе интенсивной терапии, проводимой в условиях стационара, в течение первых 2 месяцев лечения, требующихся для лабораторного определения лекарственной чувствительности возбудителя, назначается не менее 5 - 6 противотуберкулезных препаратов с преобладанием парентеральных методов введения и назначением 1 – 2 резервных противотуберкулезных препаратов [2-А, 13-А, 16-А, 18-А, 22-А].
 5. Своевременная коррекция стандартных режимов химиотерапии повышает эффективность лечения больных туберкулезом с индивидуальными факторами риска лекарственной устойчивости возбудителя [2-А, 13-А, 16-А, 18-А, 22-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

28.04.06. МЗ РБ утверждена инструкция «Эмпирические режимы полихимиотерапии больных туберкулезом органов дыхания с высоким риском развития резистентности возбудителя заболевания на начальном этапе лечения». Предложенная в инструкции методика внедрена в работу Витебского, Могилев-

ского, Брестского областных противотуберкулезных диспансеров, республиканской туберкулезной больницы «Сосновка».

Для повышения эффективности лечения и предупреждения распространения туберкулеза, вызванного лекарственно-резистентными штаммами *M.tuberculosis*, целесообразно:

- у больных туберкулезом легких с высоким риском лекарственной устойчивости применять стартовые режимы полихимиотерапии, разработанные на основе комплексного мониторинга фенотипической и генетической резистентности *M.tuberculosis*;

- создать систему динамического слежения за возбудителем туберкулеза в стране на основе единого компьютерного банка профилей сполниотипирования и RFLP-456110 циркулирующих штаммов *M.tuberculosis*.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах

1-А. Горбач, Л.А. Прогностические критерии лекарственно-резистентного туберкулеза органов дыхания / Л.А. Горбач, Н.В. Василенко // Медицинские новости. – 2002. – №9 (24). – С. 27–28.

2-А. Василенко, Н.В. Особенности начального этапа лечения больных туберкулезом с индивидуальными факторами риска развития резистентности возбудителя / Н.В. Василенко, В.С. Самцов, В.М. Семенов // Медицинская панорама. – 2005. – № 10. – С. 53–55.

3-А. Василенко, Н.В. Лекарственная устойчивость штаммов *M.tuberculosis* в различных областях Республики Беларусь // Н.В. Василенко // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2006. – Том 5, № 3. – С. 68–74.

4-А. Сполниотипирование лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* циркулирующих на территории Беларуси / Н.В. Василенко, А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, Е.В. Лимешенко, В.М. Семенов, О.В. Нарвская // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2006. – № 4. – С. 70–74.

Статьи в сборниках научных трудов

5-А. Василенко, Н.В. Резистентность *M.tuberculosis* к антибактериальным препаратам у больных туберкулезом легких в Витебской, Могилевской, Брестской и Гродненской областях / Н.В. Василенко, В.М. Семенов, В.С.

Самцов // Инфекционные болезни человека: материалы V съезда инфекционистов Республики Беларусь / Бел. о-во инфекционистов; редкол.: В.М. Семенов (гл. ред.) [и др.]. – Минск: ООО «ДокторДизайн», 2003. – С. 183 – 185.

6-А. Василенко, Н.В. Фенотипы резистентности *M.tuberculosis* в некоторых областях Республики Беларусь / Н.В. Василенко, В.М. Семенов // Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 27–28 мая 2003 г. / Мин-во здравоохранения Республики Беларусь, ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РБ, Калифорн. ун., ОО «Бел. науч.-мед. общ. эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»; ред. совет: Л.П. Титов [и др.]. – Минск, 2003. – С. 105–107.

7-А. Горбач, Л.А. Прогностические признаки излечения туберкулеза органов дыхания / Л.А. Горбач, Н.В. Василенко // Актуальные проблемы фтизиатрии и пульмонологии: сб. науч. тр. юбилейной науч.-практ. конф. к 75-летию НИИ пульмонологии и фтизиатрии Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Минск, 16 – окт. 2003 г. / НИИ пульмонологии и фтизиатрии; редкол.: В.В. Боршевский [и др.]. – Минск, 2003. – С. 224–226.

8-А. Василенко, Н.В. Частота и структура лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза у впервые выявленных и ранее леченных больных / Н.В. Василенко, В.С. Самцов, В.М. Семенов // Проблемы туберкулеза в условиях реформирования здравоохранения: сб. науч. работ Респ. Пленум о-ва фтизиатров. Науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию Гродн. облтубдиспансера, Гродно, 2004 г. / Гродн. гос. мед. ун-т; редкол.: В.В. Боршевский [и др.]. – Гродно, 2004. – С. 88–92.

9-А. Василенко, Н.В. Первичная и вторичная лекарственная устойчивость *M. tuberculosis* в Витебской области / Н.В. Василенко, В.С. Самцов, В.М. Семенов // Студенческая медицинская наука XXI века: материалы IV междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 28 – 29 окт. 2004 г. / Витебский. гос. мед. ун-т; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2004. – С. 194–195.

10-А. Василенко, Н.В. Первичная лекарственная устойчивость у впервые выявленных больных инфильтративным туберкулезом легких / Н.В. Василенко, А.М. Будрицкий // Студенческая медицинская наука XXI века: материалы IV междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 28 – 29 окт. 2004 г. / Витебский. гос. мед. ун-т; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2004. – С. 193–194.

11-А. Василенко, Н.В. Факторы развития лекарственной устойчивости у больных туберкулезом органов дыхания / Н.В. Василенко, А.М. Будрицкий, П.Н. Клемятенко // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 57 итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых

ВГМУ, Витебск, 21 – 22 апр. 2005 г. / Витебский. гос. мед. ун-т; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2005. – С. 106–108.

12-А. Лекарственная устойчивость возбудителя у больных туберкулезом в отдельном регионе Республики Беларусь / Н.В. Василенко, В.С. Самцов, В.М. Семенов, А.М. Будрицкий // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы науч.-практ. конф., посвящ 60-летию Победы в Великой Отечественной войне, Витебск / Витебский. гос. мед. ун-т; редкол.: А.Н. Косинец [и др.]. – Витебск, 2005. – С. 136–139.

13-А. Василенко, Н.В. Эмпирические режимы полихимиотерапии больных туберкулезом органов дыхания с высоким риском развития резистентности возбудителя заболевания на начальном этапе лечения: регистрационный № 100-0905 от 28 апреля 2006 года / Н.В. Василенко, В.М.Семенов, В.С. Самцов // Современные методы д-ки, л. и п-ки заболеваний: сб. инструктивно-метод. док. (официз.д.). – ГУ РНМБ; редкол.: В.И. Жарко. – Минск, 2006. – Т.1-7. – Вып.7. Т.4: Ревматология. Пульмонология. Туберкулез. Инфекционные болезни. Психиатрия. Психотерапия. – С. 33 – 42.

14-А. Василенко, Н.В. Микробиологическая характеристика совокупной лекарственной устойчивости у больных туберкулезом легких / Н.В. Василенко, Ю.Н. Казакова, В.С. Самцов // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: материалы 58 итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 26 – 27 апр. 2006 г. / Витебский. гос. мед. ун-т; редкол.: А.П. Солодков [и др.]. – Витебск, 2006. – С. 283–284.

15-А. Спוליготипирование лекарственно-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Беларуси / Н.В. Василенко, А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, Е.В. Лимешенко, В.М. Семенов, О.В. Нарвская // Особенности диагностики и лечения мультирезистентного туберкулеза: материалы респ. науч.-практ. конф., Минск, 15 дек. 2006 г. / ГУ «НИИ пульмонологии и фтизиатрии»; редкол.: Г.Л. Гуревич [и др.]. – Минск, 2007. – С. 56–60.

16-А. Стартовые режимы полихимиотерапии больных туберкулезом легких с высоким риском развития лекарственной резистентности возбудителя заболевания / Н.В. Василенко, В.С. Самцов, В.М. Семенов // Особенности диагностики и лечения мультирезистентного туберкулеза: материалы респ. науч.-практ. конф., Минск, 15 дек. 2006 г. / ГУ «НИИ пульмонологии и фтизиатрии»; редкол.: Г.Л. Гуревич [и др.]. – Минск, 2007. – С. 30–35.

17-А. Характеристика лекарственно-резистентных штаммов *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории Беларуси методом спוליго-типирования / Н.В. Василенко, А.А. Вязовая, И.В. Мокроусов, Е.В. Лимешенко, В.М. Семенов, О.В. Нарвская // Молекулярная диагностика инфекционных болезней: материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 17–18 мая

2007 г. / ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РБ, ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора Минздрава РФ; ред. совет: Л.П. Титов [и др.]. – Минск, 2007. – С. 119–121.

18-А. Самцов, В.С. Особенности химиотерапии больных туберкулезом с предполагаемой лекарственной устойчивостью возбудителя / В.С. Самцов, Н.В. Василенко, В.М. Семенов // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: материалы 62-й научной сессии университета Витебск 22-23 марта 2007 г. / Витебский. гос. мед. ун-т; редкол.: В.П. Дейкало [и др.]. – Витебск, 2007. – С. 169–171.

Тезисы конференций

19-А. Региональный спектр лекарственной устойчивости к химиопрепаратам МБТ, выделенных на территории Витебской области / Г.В. Волосевич, Р.В. Романовский, В.С. Самцов, Н.В. Василенко // Совершенствование диспансерного наблюдения и лечения больных туберкулезом: тезисы докладов пленума Бел. науч. о-ва фтизиатров 31 мая – 1 июня 2001 г. / Издательство ВГМУ; редкол.: В.В. Борщевский (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2001. – С. 66–67.

20-А. Василенко, Н.В. Сравнительная оценка структуры резистентности и клинических форм лекарственноустойчивого туберкулеза легких в Витебской и Могилевской областях / Н.В. Василенко, В.С. Самцов, Р.В. Романовский // Фундаментальные науки и достижения клинической медицины и фармации: тез. докл. 57-ой науч. сессии ВГМУ 26 – 27 февр. 2002 г. – Витебск: ВГМУ, 2002. - С. 147-148.

21-А. Василенко, Н.В. Региональный спектр лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* в некоторых областях Республики Беларусь / Н.В. Василенко // Фундаментальные науки и достижения клинической медицины и фармации: тез. докл. 58-ой науч. сессии ВГМУ, 26 – 27 февр. 2003 г. – Витебск: ВГМУ, 2003. - С.153-154.

22-А. Василенко, Н.В. Фармакоэкономический анализ в оценке стоимости лекарственно-устойчивого туберкулеза органов дыхания / Н.В. Василенко, В.С. Самцов, А.М. Будрицкий // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации: тез. докл. 59-ой науч. сессии ун-та, посвященной 70-летию ВГМУ 26 – 27 февр. 2004 г. - Витебск: ВГМУ, 2004.- С. 120-121.

23-А. Василенко, Н.В. Мониторинг лекарственной резистентности микобактерий туберкулеза на территории Республики Беларусь / Н.В. Василенко // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Том 7, № 2, прил. 1. – С. 17. – (Антимикробная терапия: тезисы VII междунар. МАКМАХ/ESCMID, Москва, 24 – 26 мая 2005 г.)

РЭЗЮМЭ

Васіленка Наталля Уладзіміраўна

Клінічныя і мікрабіялагічныя крытэрыі рацыянальнай хіміятэрапіі хворых туберкулезам лёгкіх

Ключавыя словы: лекавая устойлівасць, *M.tuberculosis*, RFLP IS6110, Beijing, спалігатыпіраванне, лячэнне туберкулеза.

Мэта даследавання: Клініка-эпідэміялагічная характарыстыка фарміравання лекавай устойлівасці *M.tuberculosis* у Рэспубліцы Беларусь і стварэнне эфектыўных схем стартавай антыбактэрыяльнай тэрапіі.

Метады даследавання: клінічныя, рэнтгеналагічныя, бактэрыялагічны (метад абсалютных канцэнтрацый на ічыльным пажыўным асяроддзі), малекулярна-генетычныя (спалігатыпіраванне, RFLP IS6110), статыстычныя.

Атрыманні вынікі: прадстаўлена характарыстыка фенатыпічных варыянтаў лекавай рэзістэннасці ўзбуджальніка туберкулеза ў розных абласнях Беларусі, праведзена ацэнка зменаў у дынаміцы фенатыпічных варыянтаў рэзістэннасці за пяцігадовы перыяд, упершыню ўстаноўлены генатыпы і распаўсюджанасць розных генетычных сям'яў лекава-устойлівых *M.tuberculosis*, якія цыркулююць на тэрыторыі краіны. На аснове праведзенага фенатыпічнага і малекулярна-генетычнага маніторынга прапанаваны стартавыя схемы хіміятэрапіі хворых туберкулезам з высокай рызыкай развіцця лекавай рэзістэннасці ўзбуджальніка туберкулеза на этапе адсутнасці дадзеных аб лекавай устойлівасці.

Рэкамендацыі па лячэнню: практычныя рэкамендацыі і вывады, якія выцякаюць з вынікаў даследавання, могуць быць выкарыстаны пры правядзенні маніторынга лекавай рэзістэннасці мікабактэрыі туберкулеза ў Беларусі, пры выбары схем стартавай тэрапіі хворых туберкулезам з высокай рызыкай лекавай устойлівасці ўзбуджальніка.

Ключавыя словы: супрацьтуберкулезныя установы Міністэрства аховы здароўя Рэспублікі Беларусь.

РЕЗЮМЕ

Василенко Наталья Владимировна

Клинические и микробиологические критерии рациональной химиотерапии больных туберкулезом легких

Ключевые слова: лекарственная устойчивость, *M.tuberculosis*, RFLP IS6110, Beijing, споліготи́пирование, лечение туберкулеза.

Цель исследования: Клинико-эпидемиологическая характеристика формирования лекарственной устойчивости *M.tuberculosis* в Республике Беларусь и создание эффективных схем стартовой антибактериальной терапии.

Методы исследования: клинические, рентгенологические, бактериологический (метод абсолютных концентраций на плотных питательных средах), молекулярно-генетические (споліготи́пирование, RFLP IS6110), статистические.

Полученные результаты: представлена характеристика фенотипических вариантов лекарственной резистентности возбудителя туберкулеза в различных областях Беларуси, проведена оценка динамических изменений фенотипических вариантов резистентности за пятилетний период, впервые установлены генотипы и распространенность различных генетических семейств лекарственно-устойчивых *M.tuberculosis*, циркулирующих на территории страны. На основе проведенного фенотипического и молекулярно-генетического мониторинга предложены стартовые схемы химиотерапии больных туберкулезом с высоким риском развития лекарственной резистентности возбудителя туберкулеза на этапе отсутствия данных о лекарственной чувствительности.

Рекомендации по лечению: практические рекомендации и выводы, вытекающие из результатов исследования, могут быть использованы при проведении мониторинга лекарственной резистентности микобактерий туберкулеза в Беларуси, при подборе схем стартовой терапии больных туберкулезом с высоким риском лекарственной устойчивости возбудителя.

Область применения: противотуберкулезные учреждения Министерства здравоохранения Республики Беларусь.

SUMMARY

Vasilenka Natallia

Clinical and microbiological criteria of rational chemotherapy of lungs sick of a tuberculosis

Key words: drug resistens, M.tuberculosis, RFLP IS6110, Beijing, spoligotyping, treatment of a tuberculosis.

The aim of the research: clinical and epidemiological characteristic of formation of drug resistance M.tuberculosis in Byelorussia and creation of effective schemes of starting antibacterial therapy.

The research methods: clinical, roentgenological, bacteriological (a method absolute concentration on dense nutrient mediums), molecular-genetics methods (spoligotyping, RFLP IS6110), statistical.

The obtained results: The characteristic fenotypical variants of drug resistency of the activator of a tuberculosis in various areas of Belarus is presented, the estimation of dynamic changes fenotypical variants of resistency for the five years period is lead, for the first time genotypes and prevalence of various genetic families drug resistens M.tuberculosis, circulating on territory of the country are established. On the basis of lead fenotypical and molecular-genetic monitoring starting schemes of chemotherapy sick by a tuberculosis with high risk of development of drug resistency of the activator of a tuberculosis at a stage of absence of data about medicinal sensitivity are offered.

Recommendations on treatment: Practical recommendations and the conclusions following from results of research, can be used at carrying out of monitoring of drug resistency M.tuberculosis in Belarus, at selection of schemes of starting therapy sick by a tuberculosis with high risk of drug resistency of the activator.

Scope: antitubercular establishments of Ministry of Health of Byelorussia.





Подписано в печать 12.02.08 г. Формат 64x84 1/16

Бумага типографская №2. Гарнитура Times New Roman. Усл.печ.л. 140

Тираж 60 экз. Заказ № 140

Издательство УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

ЛИ № 02330/0133209 от 30.04.04 г.

Отпечатано на ризографе УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27