

УДК 616.24-002.5-078:576.852.21 (575.2) (04)

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
РИФАМПИЦИН- И ИЗОНИАЗИДУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

Ж.Т. Исакова – канд. мед. наук

The article describes the prevalence and molecular characterization of rifampicin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from different regions of Kyrgyz Republic.

Одной из основных причин увеличения числа больных туберкулезом в Кыргызской Республике в настоящее время является широкое распространение *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), устойчивых к противотуберкулезным препаратам [1]. Наиболее опасными в клиническом и эпидемиологическом плане являются штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), характеризующиеся наличием одновременной лекарственной устойчивости к рифампицину (RIF) и изониазиду (INH) [2, 3].

В Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва, Россия) создан олигонуклеотидный “ТБ-Биочип”, позволяющий выявить дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) МБТ и параллельно регистрировать мутации в генах *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC*, ассоциированные с устойчивостью МБТ к RIF и INH в течение двух дней [4].

Тип и частота встречаемости определенных мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* достаточно стабильны среди микобактериальных штаммов, распространенных в различных географических районах. В то же время в ряде исследований была отмечена и определенная географическая вариабельность таких мутаций [5, 6].

Следить за распространенностью рифампицин- и изониазидустойчивых штаммов МБТ можно путем картографического монитори-

рования. Непрерывный эпидемиологический мониторинг поможет своевременно выявить очаги появления новых лекарственно-устойчивых штаммов МБТ в отдельных регионах республики, что позволит оперативно начать комплекс противоэпидемических и профилактических мероприятий, препятствующих их дальнейшему распространению.

Цель исследования – картографическое мониторирувание распространенности рифампицин- и изониазидустойчивых штаммов *M.tuberculosis* в различных регионах Кыргызской Республики.

Материалы и методы. Исследовали 940 образцов ДНК МБТ, полученных от больных с клинически, рентгенологически и микроскопически подтвержденным диагнозом легочного туберкулеза, находящихся на лечении в Национальном центре фтизиатрии (НЦФ). Все пациенты отнесены к впервые выявленным больным. Среди обследованных было 526 (56%) мужчин, женщин – 414 (44%).

Все пациенты были бактериовыделителями. Образцы мокроты для исследования были собраны согласно общепринятым методикам [5] в 1-й день поступления в стационар Национального центра фтизиатрии. Во всех случаях чувствительность МБТ к противотуберкулезным препаратам определяли в Референс-лаборатории НЦФ бактериологическим мето-

дом абсолютных концентраций и тест-системой “ТБ-Биочип”.

Исследование на биочипах заключалось в выделении ДНК МБТ из мокроты, проведении двух последовательных мультиплексных ПЦР со специфическими для IS6110, *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* праймерами, гибридизации продуктов амплификации второй стадии ПЦР с олигонуклеотидными зондами, установленными в ячейках биочипа. Результаты гибридизации регистрировали на портативном анализаторе биочипов “Чипдетектор-03” (ООО “Биочип-ИМБ”, Россия) с соответствующим программным обеспечением “Imageware”. Сопоставляя полученный флуоресцентный образец со схемой расположения олигонуклеотидов на микрочипе, определяли мутации, присутствующие в изучаемой последовательности ДНК, и делали заключение об устойчивости или чувствительности исследуемого образца к RIF или к INH. Результаты исследования тест-системой “ТБ-Биочип” учитывали по наличию устойчивости одновременно к двум препаратам (RIF, INH-штаммы с множественной лекарственной устойчивостью) и при выявлении устойчивости только к INH или только к RIF [6].

Результаты и обсуждение. С помощью тест-системы “ТБ-Биочип” у 47% (441 из 940) больных выявлены чувствительные к RIF и INH штаммы МБТ. Мутации в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* выявлены у 53% (499 из 940) больных. Монорезистентность к INH обнаружена у 20% (188 из 940) больных. Монорезистентность к R выявлена у 3% (29 из 940) пациентов. У 30% (282 из 940) больных выявлены штаммы МБТ, устойчивые одновременно к RIF и INH.

Таким образом, в структуре лекарственной устойчивости доминируют штаммы МБТ с множественной лекарственной устойчивостью.

Рифампицину-устойчивые штаммы МБТ отличаются друг от друга типом нуклеотидных замен в гене *groV*. В гене *groV* рифампицин-устойчивых штаммов МБТ, циркулирующих на территории Кыргызской Республики, выявлено 15 различных типов мутаций, локализованных в восьми кодонах гена *groV*: 531, 526, 516, 511, 522, 513, 512 и 513.

Картографическое распределение распространенности рифампицин-устойчивых штам-

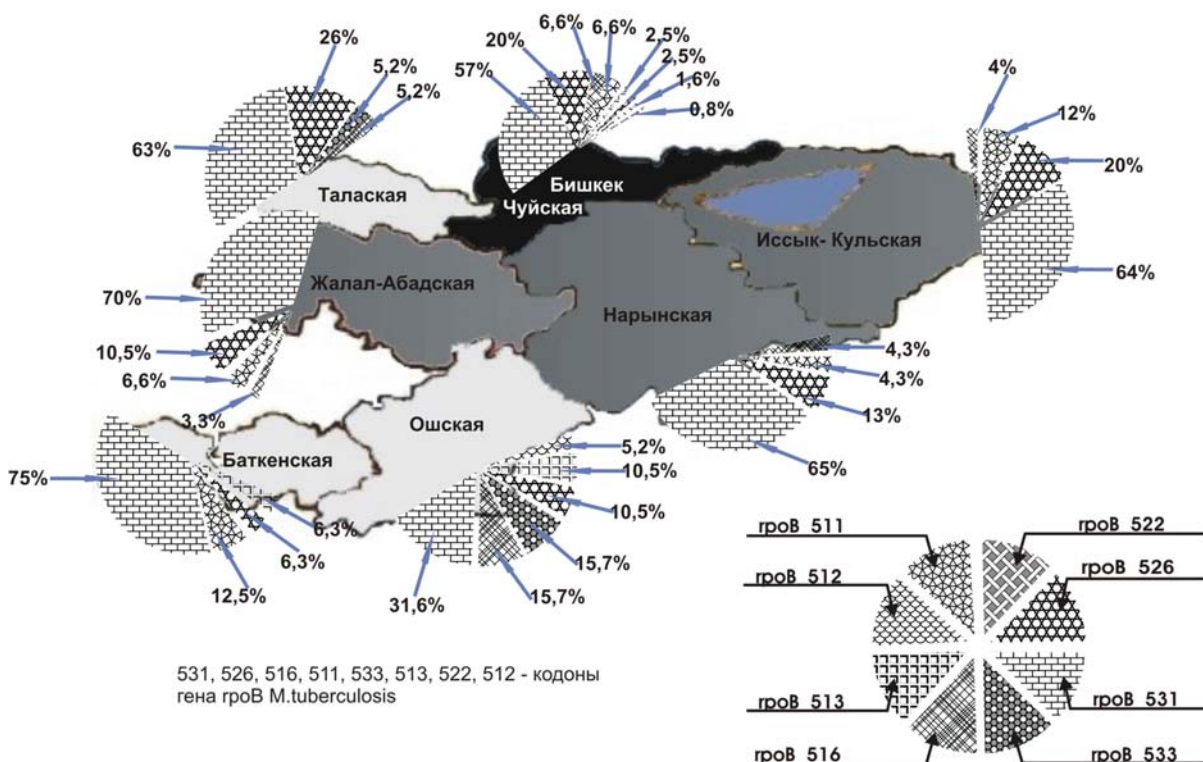
мов МБТ с различными типами мутаций, выявленных в гене *groV* МБТ, мы провели с учетом региона проживания больных туберкулезом.

У больных туберкулезом, проживающих в г. Бишкек и в Чуйской области, выделены штаммы МБТ с мутациями в 531, 526, 516, 511, 522, 513, 512 и 513 кодонах (см. рисунок). В Иссык-Кульской и Нарынской областях у больных выделены штаммы МБТ с мутациями в 531, 526, 516 и 511 кодонах. У больных туберкулезом из Таласской области выявлены штаммы МБТ с мутацией в трех кодонах: 531, 526 и 533. В Джалал-Абадской и Баткенской областях у больных туберкулезом, кроме штаммов МБТ с мутациями в 531 и 526 кодонах, найдены штаммы МБТ с мутациями 522 и 513 кодонах. Устойчивость к рифампицину у больных ТБ из Ошской области обусловлена мутацией в 531, 526, 516, 511 и 533 кодонах.

Как видно (см. рисунок), частота встречаемости МБТ с мутацией Ser531→Leu в 531 кодоне является доминирующей во всех регионах республики. Однако частота ее встречаемости в различных регионах разная и колеблется от 33% до 75%. МБТ с мутацией в 531 кодона больше всего выявлено у больных туберкулезом, проживающих в Баткенской области.

На втором месте по частоте встречаемости находятся МБТ с мутацией в 526 кодоне. Распространенность данной мутации среди всех рифампицин устойчивых штаммов составила в среднем 19,1%. У МБТ с мутацией в 526 кодоне выявлены пять различных нуклеотидных замен: His526→Tyr, His526→Asp, His526→Arg, His526→Leu и His526→Pro. Устойчивые к рифампицину штаммы МБТ с мутацией в 526 кодоне также выявлены у больных туберкулезом, проживающих во всех регионах республики. Распространенность МБТ с мутацией в 526 кодоне по отдельным регионам республики составила от 26 до 1,6%. Чаще всего МБТ с мутацией в 526 кодоне были выявлены у больных туберкулезом из г. Бишкек, Чуйской и Таласской областей.

Третьими по частоте встречаемости являются МБТ с мутацией в кодонах 516 (5,2%) и 511 (6,3%). Из двух мутаций, выявленных в



Распределение рифампицинрезистентных штаммов M.tuberculosis у больных туберкулезом, проживающих в различных регионах Кыргызской Республики.

516 кодоне, наиболее чаще встречается Asp516→Tyr. Мутация в 511 кодоне представлена в основном заменой Leu511→Pro. Штаммы МБТ с мутациями в 516 и 511 кодонах встречались в пяти регионах Кыргызстана, но не выявлены у больных туберкулезом, проживающих в Таласской, Джалал-Абадской и Баткенской областях.

Таким образом, на территории Кыргызской Республики циркулируют рифампицинрезистентные штаммы МБТ с мутацией 531, 526, 516, 511, 522, 533, 513 и 512 кодонах гена groV. МБТ с мутацией в 531, 526, 516 кодонах гена groV являются доминирующими во всех регионах республики. Мутация Ser531→Leu является основной причиной устойчивости МБТ к рифампицину.

Резистентность к изониазиду обусловлена мутациями в четырех основных генах: katG, inhA, ahpC и kasA.

Из 470 изониазидустойчивых штаммов мутации гена katG встречались в 91% случаев, inhA – 7% и ahpC – 2% случаев (см. таблицу).

В гене katG выявлены четыре различных типа мутаций: Ser315→Thr встречалась в 89%, Ser315→Asn – 2,3%, Ser315→Arg – 0,7%, Ser315→Gly – 0,7% и Ile335→Val – 0,7 % случаев. В гене inhA обнаружены нуклеотидные замены в положении -15 относительно сайта инициации трансляции (inhA T₋₁₅). В промоторном участке гена ahpC мутации идентифицированы в положениях -9 и -12 относительно сайта инициации транскрипции (ahpC-9 и ahpC-12).

В связи с тем, что устойчивость МБТ к INH в 91% случаев представлена в основном мутацией Ser315→Thr 315 кодона гена katG и частота встречаемости штаммов МБТ с этой мутацией одинакова во всех регионах республики, в картографическом моделировании

распространенности резистентности штаммов отражена только распространенность устойчивых к рифампицину штаммов МБТ.

Спектр мутаций, выявленных в генах *katG*, *inhA* и *ahpC* *M.tuberculosis*, выделенных в Кыргызской Республике

Ген	Кол-во образцов	Тип мутаций	Абс.
katG	427	Ser315→Thr	380
		Ser315→Asn	12
		Ser315→Arg	12
		Ser315→Gly	11
		Ile335→Val	12
inhA	33	inhA T15	33
ahpC	10	AhpC_9	5
		AhpC_12	5
Всего	470		

Таким образом, на территории Кыргызской Республики циркулируют штаммы МБТ с мутацией 531, 526, 516, 511, 522, 533, 513 и 512 кодонов гена *groV*. Среди всех рифампицинустойчивых штаммов доминируют МБТ с мутацией Ser531→Leu 531 кодона гена *groV*.

Среди изониазидустойчивых штаммов на территории Кыргызстана наиболее широко распространен штамм МБТ с мутацией Ser315→Thr гена *katG*.

У больных туберкулезом, проживающих в Кыргызской Республике, устойчивость МБТ к рифампицину и изониазиду обусловлена комбинацией мутаций Ser531→Leu 531 кодона гена *groV* и Ser315→Thr 315 кодона гена *katG*.

Следовательно, идентификация различных типов мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, ассоциированных с устойчивостью *M.tuberculosis* к основным противотуберкулезным препаратам первого ряда – рифампицину и изониазиду – имеет важное практическое значение, так как позволяет в ранние сроки лечения выбрать адекватную химиотерапию, что повышает эффективность лечения больного.

Литература

1. Бесерра М.С., Фармер П.Е., Ким Дж.И. Полирезистентный туберкулез – угроза человечеству. Гарвардская мед. школа. – М.: Ин-т Открытое общество, 2001. – 40 с.
2. Пресс-релиз ВОЗ/17. Женева, 16 марта 2004 г. Европейское региональное бюро ВОЗ.
3. Ramaswamy S., Musser J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Tubercle and Lung Disease*. – 1998. – №1. – P. 3–29.
4. Михайлович В.М., Лана С.А., Грядун Д.А. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТБ-микрочипе для обнаружения рифампицинрезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* – 2001. – №1. – С. 112–117.
5. Лабораторная диагностика туберкулеза / Под ред. В.И. Литвинова, А.М. Мороза; МНТПЦ борьбы с туберкулезом. – М.: Медицина и жизнь, 2006. – 170 с.
6. Mikhailovich V., Lapa S., Grydunov D. et al. Identification of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains by Hybridization, PCR, and Ligase Detection reaction on Oligonucleotide Microchips // *J. of Clinical Microbiology*. – 2001. – Vol. 39. – №7. – P. 2531–2540.