

Биологические микрочипы в экспресс-идентификации штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью у больных туберкулезом в Республике Кыргызстан

1 – Институт молекулярной биологии и медицины, Бишкек, Кыргызстан;

2 – Национальный центр фтизиатрии при МЗ КР, Бишкек, Кыргызстан

J.T.Isakova, Z.K.Goncharova, A.A.Aldashev

Biological microchips for detection of multiple drug resistant *M. tuberculosis* strains isolated in Kyrgyz Republic

Summary

The aim of the study was to estimate spread of primary and secondary multiple drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MBT) and to characterize *rpoB*, *katG*, *inhA*, and *ahpC* gene mutations of rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) resistant MBT strains isolated from tuberculosis patients in Kyrgyz. We obtained 493 specimens from patients with pulmonary tuberculosis which were diagnosed based on clinical, X-ray, and bacteriological examination. Among them, newly diagnosed pulmonary tuberculosis was in 445 patients (90.2 %), and 48 of the patients (9.8 %) have already been treated for tuberculosis. Mutations of *rpoB*, *KatG*, *inhA*, and *ahpC* genes associated with RIF and INH resistance were detected by biological chip test. Sensitive MBT strains were detected in 47 % and resistant strains were in 53 % of the newly diagnosed patients. Single-drug resistance to RIF only was detected in 3 % of cases; resistance to INH was found in 20 %, resistance to both the drugs was detected in 30 % of the patients. In pre-treated patients single-drug resistance to RIF was defined in 4 % of cases, resistance to INH was in 8 %, resistance to both the drugs was estimated in 75 % of the patients. Therefore, we suppose that there is a high prevalence of multi-drug resistant MBT in Kyrgyz Republic: 30 % among newly diagnosed patients and 75 % among pre-treated patients. The main cause of RIF-resistance of MBT is Ser531→Leu mutation of *rpoB* gene, and the main cause of INH-resistance is Ser315→Thr mutation of *katG* gene.

Резюме

Целью работы было изучить частоту встречаемости штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) с множественной лекарственной устойчивостью среди впервые выявленных и ранее пролеченных больных туберкулезом. Обследовано 493 больных (275 мужчин и 218 женщин) с клинически подтвержденным диагнозом легочного туберкулеза; 445 (90,2 %) пациентов относились к впервые выявленным больным и 48 (9,8 %) человек ранее получали лечение. Мутации в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, обуславливающих устойчивость МБТ к рифампицину и изониазиду, определяли методом биологических микрочипов. Обнаружено, что 47 % впервые выявленных больных были инфицированы лекарственно чувствительными и 53 % – лекарственно устойчивыми штаммами МБТ. При этом монорезистентность только к рифампицину определена у 3 % больных, монорезистентность к изониазиду – у 20 %. Мультирезистентные штаммы у впервые выявленных больных выявлены в 30 % случаев. Среди ранее пролеченных больных лекарственно чувствительные штаммы выявлены у 13 %, лекарственно устойчивые штаммы – у 87 % больных. Монорезистентность к рифампицину определена у 4 %, монорезистентность к изониазиду – у 8 % больных. МБТ с мультирезистентностью выявлены у 75 % обследованных. Таким образом, в Республике Кыргызстан отмечается высокий удельный вес туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью как среди впервые выявленных (30 %), так и среди пациентов, ранее получавших лечение (75 %). Устойчивость МБТ к рифампицину чаще всего обусловлена мутацией Ser531→Leu 531 кодона гена *rpoB*. Устойчивость МБТ к изониазиду в основном обусловлена мутацией Ser315→Thr 315 кодона гена *katG*.

Современное состояние проблемы туберкулеза характеризуется ростом числа пациентов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) среди как впервые выявленных, так и ранее лечившихся больных [1]. Основными причинами широкого распространения туберкулеза с МЛУ является запоздалое выявление заболевания и неадекватное применение лекарств, при котором против генетически различных разновидностей возбудителя туберкулеза применяются не соответствующие им типы лекарственных препаратов.

Одним из экспресс-методов быстрого определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) является разработанная в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН (Москва) экспресс-тест-система "ТВ-биочип MDR",

идентифицирующая точечные мутации в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, обуславливающие устойчивость МБТ к рифампицину (R) и изониазиду (H) [2].

Цель настоящего исследования – изучить распространенность первичной и приобретенной множественной лекарственной устойчивости МБТ у стационарных больных в Республике Кыргызстан, охарактеризовать типы мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, обуславливающих резистентность МБТ к R и H.

Материалы и методы

Всего обследованы 493 больных с клинически подтвержденным диагнозом легочного туберкулеза. Среди них было 275 (55,8 %) мужчин и 218 (44,2 %)

женщин; 445 (90,2 %) пациентов относились к впервые выявленным и 48 (9,8 %) больных получали лечение ранее.

Согласно требованию международных экспертов [3] резистентность МБТ у пациентов с туберкулезом, ранее получавших лечение, мы расценивали как приобретенную. Устойчивость МБТ у впервые выявленных больных расценивали как первичную лекарственную устойчивость.

Классификация случаев туберкулеза проводилась в соответствии с Рекомендациями для национальных программ ВОЗ [4]. Всем больным помимо традиционных методов диагностики туберкулеза (рентгенография органов грудной клетки, микроскопия мазка мокроты и посев мокроты на выделение МБТ) на базе Института молекулярной биологии и медицины (Бишкек, Кыргызстан) проводилась биочип-диагностика лекарственной устойчивости МБТ к рифампицину и изониазиду. Образцы мокроты больных для исследования были собраны согласно общепринятым методикам [5].

У всех 493 пациентов при поступлении в клинику были обнаружены МБТ методом микроскопии. Бактериологическое исследование культур МБТ на чувствительность к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда проводили методом абсолютных концентраций. В 493 случаях устойчивость МБТ к R и H проводили посредством тест-системы "ТБ-Биочип MDR", разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН [6]. Данное исследование заключалось в выделении ДНК МБТ из мокроты, проведении 2 последовательных мультиплексных полимеразных цепных реакций (ПЦР) со специфическими для IS6110, *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* праймерами, гибридизации продуктов амплификации 2-й 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 о чувствительности исследуемого образца к рифампицину или изониазиду [6].

Результаты и обсуждение

Мутации в генах *groV*, *katG*, *inhA*, *ahpC* выявляли на биочипах, и при отсутствии мутаций относили МБТ к чувствительным к R и H, при наличии мутаций – к устойчивым к R или H.

Молекулярно-генетический анализ МБТ показал, что 211 (47 %) из 445 впервые выявленных больных были инфицированы чувствительными к R и H штаммами МБТ, как показано на рисунке. В группе ранее пролеченных пациентов чувствительные к R и H МБТ определены в 13 % случаев (у 6 из 48 человек).

Мутации в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* были отмечены в 87 % случаев в группе ранее пролеченных и в 53 % – в группе впервые выявленных больных. Достоверно больше МБТ с мультирезистентностью обнаруживались у ранее пролеченных пациентов – в 75 % случаев (36 из 48 человек). МБТ с МЛУ были выделены у 135 из 445 (30 %) впервые выявленных больных.

Первичная устойчивость только к H определена в 20 % (88 из 445), 3 % (11 из 445) составили больные с первичной устойчивостью только к R. Приобретенная монорезистентность к H выявлена у 8 % (4 из 48), к R – у 4 % (2 из 48) больных.

Таким образом, проведенный нами анализ свидетельствует, что в Республике Кыргызстан отмечается высокий удельный вес туберкулеза с МЛУ как среди впервые выявленных, так и среди ранее получавших лечение больных, что создает реальную угрозу биологической безопасности населения.

Анализ посредством биочипов спектра мутаций МБТ, выделенных у больных разных категорий, показал, что в гене *groV* рифампицин-резистентных штаммов МБТ чаще всего встречались мутации в 531, 526, 516 и 511-м кодонах. Мутации в 533, 522, 513 и 512-м кодонах обнаруживались редко. В гене *groV* чаще всего выявлялась мутация Ser531→Leu (61 %) (табл. 1, 2).

Среди изониазид-резистентных штаммов, обнаруженных у впервые выявленных и ранее пролеченных больных, мутации гена *katG* встречались в 95,3 % случаев, *inhA* – в 4,1 % и *ahpC* – 1,17 % случаев. В гене *katG* чаще всего встречалась мутация Ser315→Thr (94,7 %) (табл.1, 2).

Мутации одновременно в 2 генах МБТ, обуславливающих устойчивость к изониазиду, были идентифицированы в 10 образцах мокроты. Преобладали сочетанные мутации в генах *katG* и *inhA*: *katG_Ser315→Thr*, *AGC→ACC inhA_T(15)* (табл. 3). Мутации одновременно в 2 кодонах гена *groV* МБТ, ответственного за устойчивость к рифампицину, были детектированы в 7 образцах мокроты (табл. 3). Мутации кодонах в *Asp516→Tyr* и *Leu511→Pro* выявлены в 3 образцах. В 2 случаях были зарегистрированы мутации в кодонах *Asp516→Tyr* и *Met515→Ile*.

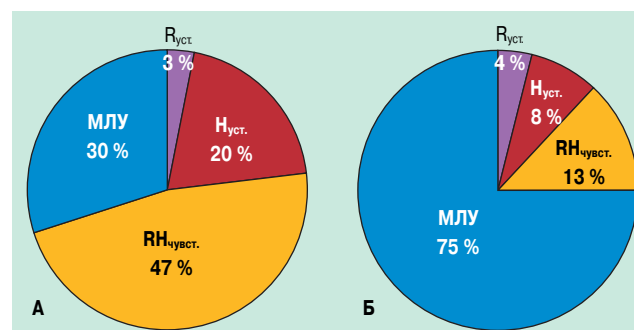


Рисунок. Частота распространенности лекарственно чувствительных / устойчивых штаммов МБТ среди впервые выявленных и ранее пролеченных больных по результатам биочип-анализа А – первичная, Б – приобретенная лекарственная устойчивость. Примечание: R_{уст.} – рифампицин-устойчивые штаммы; H_{уст.} – изониазид-устойчивые штаммы; RH_{чувст.} – рифампицин- и изониазид-чувствительные штаммы; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость.

Таблица 1
Распространенность мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* МБТ у впервые выявленных больных туберкулезом

Гены МБТ, ответственные за резистентность к R и H			Абс. (%)
ген <i>groB</i>	ген <i>katG</i>	ген <i>inhA</i>	
Ser531→Leu	Ser315→Thr		78 (58)
Ser531→Trp	Ser315→Thr		3 (2,2)
Ser531→Leu	Ser315→Asn		1 (0,75)
Ser531→Leu	Ser315→Arg		1 (0,75)
His526→Arg	Ser315→Thr		6 (4,5)
His526→Asp	Ser315→Thr		6 (4,5)
His526→Tyr	Ser315→Thr		4 (3,0)
His526→Leu	Ser315→Thr		1 (0,75)
His526→Leu		InhA_T15	1 (0,75)
His526→Pro		inhA_G8	1 (0,75)
His526→Asn		inhA_T15	1 (0,75)
Asp516→Tyr	Ser315→Thr		11 (8,3)
Asp516→Val	Ser315→Thr		2 (1,5)
Leu511→Pro	Ser315→Thr		11 (8,3)
Leu533→Pro	Ser315→Thr		8 (6,0)
Всего			135 (100)

Кроме того, было зарегистрировано по 1 случаю мутаций в кодонах His526→Arg и Leu511→Pro и Ser531→Leu и Ser522→Leu.

В 15 (94 %) случаях из 19 МБТ с комбинированной мутацией были обнаружены у впервые выявленных больных и в 4 случаях (21 %) – у ранее пролеченных больных.

Таким образом, в обеих группах пациентов чаще встречались МБТ с мутацией 315-го кодона гена *katG* (Ser315→Thr) и 531-го кодона гена *groB* Ser531→Leu.

Таблица 2
Частота встречаемости мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA*, *ahpC* МБТ в группе ранее пролеченных больных

Гены МБТ, ответственные за резистентность к R и H			Абс. (%)
ген <i>groB</i>	ген <i>katG</i>	ген <i>inhA</i>	
Ser531→Leu	Ser315→Thr		23 (64)
Ser531→Leu		ahpC_6	2 (5,5)
Ser531→Leu		InhA_T15	2 (5,5)
His526→Arg	Ser315→Thr		2 (5,5)
His526→Asp	Ser315→Thr		1 (2,8)
His526→Tyr	Ser315→Thr	InhA_T15	2 (5,5)
His526→Leu	Ser315→Thr		1 (2,8)
Ser522→Leu	Ser315→Thr		1 (2,8)
Asp516→Asn	Ser315→Thr		1 (2,8)
Gln513→Gly	Ser315→Thr		1 (2,8)
Всего			36 (100)

Таблица 3
Частота встречаемости комбинированной мутации в генах *groB*, *katG* и *inhA* МБТ, ответственных за резистентность к рифампицину и изониазиду

Гены МБТ, ответственные за резистентность к R и H			Абс. (%)
ген <i>groB</i>	ген <i>katG</i>	ген <i>inhA</i>	
Asp516→Tyr, Leu511→Pro	Ser315→Thr		3 (15,7)
Asp516→Tyr, Met515→Ile	Ser315→Thr		2 (10,5)
Leu511→Pro, His526→Arg	Ser315→Thr		1 (6,25)
Ser522→Leu, Ser531→Leu	Ser315→Thr		1 (6,25)
His526→Leu	Ser315→Thr	inhA_T15	7 (36)
His526→Tyr	Ser315→Thr	inhA_T15	2 (10,5)
Ser531→Leu	Ser315→Thr	inhA_T15	1 (5,2)
Ser531→Leu		inhA_T15	1 (5,2)
Ser531→Leu	Ile335→Val, Ser315→Thr		1 (5,2)
Всего			19 (100)

Заключение

1. В Республике Кыргызстан отмечается высокий уровень туберкулезной инфекции с множественной лекарственной устойчивостью как среди впервые выявленных (30,3 %), так и ранее получавших лечение больных (75 %). Множественная лекарственная устойчивость МБТ, циркулирующих на территории Республики Кыргызстан, обусловлена мутацией 531-го кодона гена *groB* (Ser53→Leu), формирующей устойчивость к R, и мутацией 315-го кодона гена *katG* (Ser315→Thr), отвечающей за устойчивость к H.
2. Тест-система "ТБ-Биочип MDR" позволяет выявить ДНК МБТ и определить чувствительность / устойчивость МБТ к R и H на основе анализа мутаций в гене *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* в течение 3 дней.

Литература

1. Фармер П.Е., Кононец Ф.С., Борисов С.Е. и др. Полирезистентный туберкулез: угроза человечеству. М.; 1999.
2. Михайлович В.М., Лапа С.А., Грядун Д.А. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТБ-микрочипе для обнаружения рифампицин резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Бюл. эксп. биол. 2001; 1: 112–117.
3. Crofton J., Chaulet P., Maher D. Guidelines for the Management of Drug-Resistant Tuberculosis. Geneva; 1997.
4. Пресс-релиз ВОЗ/17. Европейское региональное бюро ВОЗ. Женева; 2004.
5. Maher D., Chaulet P., Spinaci S., Harries A. Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes. 2nd ed. Geneva: World Health Organisation; 1997.
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. Clin. Microbiol. 2001; 39: 2531–2540.

Поступила 01.11.07
© Коллектив авторов, 2008
УДК 616.24-002.5-078(575.2)