

Ж.Т.Исакова<sup>1</sup>, О.А.Пак<sup>1</sup>, Э.У.Юсупова<sup>1</sup>, З.А.Гончарова<sup>2</sup>, А.Ф.Тумашова<sup>2</sup>, М.Д.Кожомкулов<sup>2</sup>,  
Д.К.Кожомкулов<sup>2</sup>, Т.Ч.Чубаков<sup>2</sup>, А.Ш.Алишеров<sup>2</sup>, Дж.Фридленд<sup>3</sup>, А.А.Алдашев<sup>1</sup>

## Молекулярно-эпидемиологический анализ рифампицин-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на территории Кыргызской Республики

1 – Институт молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии при МЗ КР, г. Бишкек, Кыргызстан

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

3 – Hammersmith Hospital, г. Лондон, Великобритания

G.T.Isakova, O.A.Pak, A.U.Yusupova, Z.A.Goncharova, A.F.Tumashova, M.D.Kozhomkulov, D.K.Kozhomkulov,  
T.Ch.Chubakov, A.Sh.Alisherov, J.Friedland, A.A.Aldashev

## Molecular and epidemiological characterization of rpoB mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyz Republic

### Summary

The nature and frequency of mutations in the rpoB gene of *M. tuberculosis* (MBT) vary considerably in various geographical locations. There is no information on the prevalence of specific mutations in the rpoB gene of MBT isolated from patients in Kyrgyz Republic. In this work, we analyzed a distribution of the rpoB gene mutations in Kyrgyz Republic. A total of 380 rifampicin-sensitive and 225 rifampicin-resistant MBT cultures were analyzed to identify and to characterize mutations in the rpoB gene using a biological microchip assay. The biochip test determined 18 different mutation types in 8 codons of the rifampicin-resistant samples. The majority of mutations (180 of 225, or 80 %) were in the codons 531 and 526, mainly in the codon 531 (137 of 225, 60.8 %). The Ser531>Leu mutation (134 of 225, 59.4 %) was by far the most common. Another group of mutations were in the codon 526 (43 of 225, 19.1 %). Five different types of mutations were found in the codon 526 which were: His526@Tyr (4.9 %), His 526@Asp (4.9 %), His526@Arg (4.0 %), His526@Leu (3.5 %), and His526@Pro (1.8 %). The third group of common mutations were Leu511@Pro (6.3 %) and Asp516@Tyr (4.4 %). Other mutations found in the codons 533, 522, 513, and 512 were less frequent and had a very low rate comprising about 1.8 % of the total mutation number among 225 rifampicin-resistant samples.

### Резюме

Для разных стран характерна разная частота встречаемости отдельных мутаций гена rpoB *Mycobacterium tuberculosis*. Учитывая регионально-географические особенности распространения мутаций в гене rpoB, обуславливающих резистентность к рифампицину, мы изучили спектр мутаций гена rpoB МБТ, циркулирующих на территории Кыргызской Республики. Исследовано 605 образцов ДНК МБТ, выделенных от больных туберкулезом, проживающих в 8 регионах Кыргызской Республики. Устойчивость МБТ к рифампицину идентифицировали методом биологических микрочипов. Методом биологических микрочипов выявлено 380 (62,8 %) чувствительных и 225 (37,2 %) рифампицин-устойчивых штаммов МБТ. Среди проанализированных рифампицин-устойчивых штаммов МБТ нам удалось выявить 18 различных типов мутаций, локализованных в 8 кодонах гена rpoB. При этом мутации в 531 и 526 кодонах встречались наиболее часто и обуславливали устойчивость к рифампицину в 80,0 % случаев. Среди всех рифампицин-устойчивых штаммов у 137 из 225 (60,8 %) образцов обнаружена мутация в 531 кодоне, при этом Ser531@Leu идентифицирована в 59,4 % (134 из 225) случаев. Второй по частоте встречаемости является мутация в 526 кодоне 19,1 % (43 из 225). В 526 кодоне выявлено 5 различных типов мутаций, в том числе His526@Tyr – 4,9 %; His526@Asp – 4,9 %; His526@Arg – 4,0 %; His526@Leu – 3,5 %; His526@Pro – 1,8 %. Третьими по частоте встречаемости являются мутации в 516 и 511 кодонах. В 516 кодоне выявлено Asp516@Tyr – 4,4 % и Asp516@Val – 0,8 % случаев. В 511 кодоне основной мутацией является Leu511@Pro – 6,3%. Мутации в 533, 522, 513 и 512 кодонах встречались редко. Частота встречаемости каждой из мутаций в 533, 522 и 513 кодонах среди всех рифампицин-устойчивых штаммов составила всего 1,8 %, а мутация в 512 кодоне встречалась в 1,4 % случаев.

### Введение

Проблема распространения штаммов *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ), резистентных и полирезистентных к специфическим химиопрепаратам, является общепризнанной, а необходимость определения лекарственной устойчивости (ЛУ) в виду важности таких данных для успешного лечения больного не вызывает сомнений. В настоящее время известны гены МБТ, ответственные за формирование лекарственной устойчивости к основным противотуберкулез-

ным препаратам – изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу, пиперазину и фторхинолонам [1]. Рифампицин является одним из ключевых препаратов, используемых в противотуберкулезной терапии, что обуславливает появления большого процента резистентных к нему штаммов. Устойчивость МБТ к рифампицину в 95 % случаев связана с мутациями в сравнительно небольшом фрагменте В-субъединицы РНК-полимеразы. Размер указан-

ного фрагмента составляет 81 пар оснований (27 кодонов) [2].

Мутации в отдельных кодонах различаются по своему значению. Мутации в 531, 526 и 513-м кодонах обеспечивают высокий уровень резистентности к рифампицину [2, 3]. Больных, имеющих МБТ с подобными мутациями, рекомендуется лечить препаратами резервного ряда. Мутации в кодонах 522, 518, 516 и 511-м сопровождаются низким уровнем устойчивости к рифампицину [4], поэтому для больных с этими мутациями рифампицин, несмотря на наличие мутации *groV*-гена, можно рассматривать как препарат выбора.

Современные методы генодиагностики резистентности к рифампицину основаны на детекции таких мутаций, большая часть которых компактно локализована в высоко консервативной области гена *groV* с 507-го по 533-й кодоны [5]. Более 90 % рифампицин-устойчивых штаммов, устойчивы также и к изониазиду, что позволяет рифампицин-резистентные штаммы считать своеобразным индикатором множественной ЛУ.

Анализ данных литературы по определению типов мутаций, ответственных за резистентность к рифампицину показал, что для разных стран характерна своя частота встречаемости отдельных мутаций.

В РФ [6, 7], в Латвии [7], в Бразилии [8] и в странах Юго-Восточной Азии (Китай, Япония, Корея, Тайвань) [9] преобладают мутации в 531-м кодоне. В этих странах наиболее часто обнаруживаются мутации, приводящие к замене серина на лейцин в 531-м кодоне. В США отмечается определенная географическая вариабельность мутаций в *groV* гене МБТ [10]. Так, в г. Нью-Йорке, Техасе, г. Нью-Мексико и г. Лос-Анджелесе выше частота мутаций в 526-м кодоне, причем большую часть составляют мутации, приводящие к замене гистидина на тирозин в 526-м кодоне. В штате Пенсильвания, преобладает мутация в 531-м кодоне. В Венгрии [11] преобладает мутация в 516-м кодоне, а в Греции [12] мутация в 508-м кодоне встречается чаще, чем в других европейских странах.

Таким образом, определение спектра мутаций в гене *groV* МБТ представляет не только клинический, но и определенный эпидемиологический интерес. Поскольку в разных географических областях распространены микобактериальные штаммы, несущие разные мутации, то для создания ДНК банка МБТ с различными мутациями в гене *groV*, обуславливающих резистентность к рифампицину, необходимо исследовать ДНК "местных" штаммов МБТ.

Выявление закономерностей изменений мутаций в гене *groV* МБТ позволит в перспективе прогнозировать распространение мутантных форм МБТ и поможет улучшить систему эпидемиологического надзора за туберкулезной инфекцией.

Цель настоящей работы – определить спектр мутаций в гене *groV* МБТ, выделенных от больных туберкулезом, проживающих в разных регионах КР.

## Материал и методы

Всего на ЛУ к рифампицину обследованы 605 образцов ДНК МБТ. Из 605 клинических штаммов 225 были рифампицин-устойчивые штаммы: в том числе из г. Бишкека ( $n = 64$ ), Чуйской ( $n = 64$ ), Иссык-кульской ( $n = 17$ ), Нарынской ( $n = 22$ ), Таласской ( $n = 12$ ), Ошской ( $n = 12$ ), Джалал-Абадской ( $n = 23$ ) и Баткенской ( $n = 11$ ) областей.

Выявление рифампицин-резистентных штаммов МБТ проводили с помощью метода биологических микрочипов, разработанного в институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгарта. Метод включал двухэтапную амплификацию участка гена *groV*, мутации, в которых приводят к возникновению устойчивости к рифампицину. На 1-й стадии ПЦР амплификацию фрагмента гена *groV* МБТ длиной 193 пар олигонуклеотидов проводили с парой праймеров F105 и R273 на амплификаторе "Hybaid" (Англия). Вторую стадию ПЦР проводили с праймерами R1398 и F1272, меченными флуоресцентным красителем Cy-5. Контроль результатов 1-й и 2-й стадии ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, с последующей визуализацией на транслюминаторе "Fluor-S MultiImager" фирмы "Bio-Rad" (США). Полученные меченные ампликоны гибридизировали с иммобилизованными на микрочипе олигонуклеотидами в течение 16 часов при температуре 37 °С. Результаты гибридизации регистрировали на портативном анализаторе биочипов с соответствующим программным обеспечением (Биочип-ИМБ, Россия).

Выделение ДНК из микобактерий туберкулеза, двухстадийный ПЦР анализ, ДНК-гибридизацию, визуализацию результатов гибридизации на "Чипдетекторе-03" проводили в научно-исследовательском институте молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии МЗ КР.

Клинические штаммы МБТ получены от больных, находящихся на стационарном лечении в Национальном центре фтизиатрии, в Чуйском областном противотуберкулезном стационаре, а также от больных, поступивших на обследование в городской противотуберкулезный диспансер г. Бишкека. На стационарное лечение в Национальный центр фтизиатрии поступают больные со всех регионов КР.

## Результаты и обсуждение

Данные о частоте встречаемости рифампицин-устойчивых штаммов МБТ приведена в табл. 1. У больных туберкулезом из разных регионов Кыргызстана частота встречаемости МБТ с ЛУ к рифампицину разная и колеблется от 4,9 % до 28,5 %. Из всех регионов Кыргызстана самый высокий показатель лекарственной устойчивости МБТ к рифампицину был отмечен в Чуйской области и в г. Бишкеке и составил 28,5 %. Это в 5-6 раз больше, чем в других

**Таблица 1**  
**Частота встречаемости рифампицин-устойчивых штаммов МБТ в различных регионах КР**

Регионы	Количество образцов	% от общего кол-ва
1 г. Бишкек	64	28,5
2 Чуй	64	28,5
3 Иссык-Куль	17	7,5
4 Нарын	22	9,8
5 Талас	12	5,3
6 Ош	12	5,3
7 Джала-Абад	23	10,3
8 Баткен	11	4,9
<b>Всего</b>	<b>225</b>	<b>100</b>

регионах республики. Возможно, высокий уровень рифампицин-устойчивости связан с концентрацией в столице республики и прилегающей к ней Чуйской области внутренних и внешних мигрантов, более высокой плотностью населения, наличием учреждений пенитенциарной системы. По данным 2002 г. [13], заболеваемость туберкулезом среди заключенных превысил республиканский показатель в 30 раз (3 829,9 на 100 тыс.), а ЛУ МБТ среди данной категории больных составляет 60,2 %.

ЛУ к рифампицину обусловлена мутацией в гене *groV* МБТ. Кодоны, в которых обнаружены мутации к рифампицину, представлены в табл. 2. Всего в исследованной нами выборке выявлены 18 различных типов мутаций, затрагивающих 8 кодонов гена *groV*, из которых 15 единичные нуклеотидные замены и три двойные мутации (табл. 2). Доминирующей является мутация в 531-м кодоне, она выявлена у 137 из 225 (60,8 %) образцов МБТ, устойчивых к рифампицину. В 531-м кодоне наиболее часто встречается мутация, приводящая к замене Ser531>Leu (59,4 %). Штаммы МБТ с мутацией в 531-м кодоне встречались у больных туберкулезом, проживающих во всех регионах Кыргызстана, однако распространенность данной мутации в различных регионах сильно варьировала и составляла от 33,5 % до 73,0 %. Наиболее часто (73,0 %) данная мутация обнаружена у больных туберкулезом из Баткенского региона. Это связано с тем, что в Национальный центр фтизиатрии (г. Бишкек) направляются из регионов, в основном, наиболее тяжелые больные с хроническим течением заболевания и неудачным лечением в прошлом. Неадекватное лечение индуцирует мутации МБТ, что приводит к возникновению приобретенной ЛУ. Действительно, 60 % больных туберкулезом из Баткенского региона имели хроническое течение заболевания и ранее уже лечились противотуберкулезными препаратами.

На 2-м месте по частоте встречаемости находятся мутации в 526-м кодоне. Распространенность данной мутации среди всех рифампицин-устойчивых штаммов составила в среднем 19,1 % (43 из 225). Анализ распределения мутаций в 526-м кодоне по-

казал, что мутация His526>Tyr встречалась в 4,9 %; His526>Asp – в 4,9 %; His526>Arg – в 4,0 %; His526>Leu – в 3,5 %; His526>Pro – в 1,8 % случаев. Штаммы МБТ с мутацией в 526-м кодоне встречались у больных туберкулезом во всех 8 регионах республики.

Третьими по частоте встречаемости являются мутации в кодонах 516-м (5,2 %) и 511-м (6,3 %). Из двух мутаций, выявленных нами в 516-м кодоне, наиболее часто встречается Asp516@Tyr. Мутация в 511-м кодоне представлена в основном заменой Leu511@Pro. Штаммы МБТ с мутациями в 516-м и 511-м кодонах встречались в 5 регионах Кыргызстана, но отсутствовали в Таласской, Джалал-Абадской и Баткенском регионах.

По литературным данным мутации в 533, 522, 513 и 512-м кодонах являются редкими [14]. В нашем исследовании частота встречаемости каждой из мутаций в 533, 513 и 512-м кодонах среди всех рифампицин-устойчивых штаммов составила всего 1,8 %, а мутации в 522-м кодоне встречались в 1,4 % случаев.

Значительная часть мутаций в гене *groV* идентифицирована в штаммах МБТ, выделенных от больных туберкулезом, проживающих в г. Бишкеке и Чуйской области (табл. 3). В этих двух регионах циркулируют МБТ с мутацией в 531, 526, 522, 516, 513, 512 и 511-м кодонах. Одна из причин широкого распространения различных мутантных штаммов МБТ в этих регионах связана с высоким уровнем внутренней миграции. Мигранты со всей республики стремятся осесть в г. Бишкеке или вокруг него. Они имеют временную прописку, или не имеют про-

**Таблица 2**  
**Спектр мутаций в гене *groV* МБТ и их распространенность на территории КР**

Кодоны	n (%)	Типы мутаций	n (%)
531	137 (60,8)	Ser531@Leu	134 (59,4)
		Ser531@Trp	3 (1,4)
526	43 (19,1)	His526@Tyr	11 (4,9)
		His526@Asp	11 (4,9)
		His526@Leu	8 (3,5)
		His526@Arg	9 (4,0)
		His526@Pro	4 (1,8)
511	14 (6,3)	Leu511@Pro	14 (6,3)
516	12 (5,2)	Asp516@Val	2 (0,8)
		Asp516@Tyr	10 (4,4)
512	4 (1,8)	Ser512>Thr	4 (1,8)
513	4 (1,8)	Gln513>Leu	1 (0,4)
		Gln513>Gly	3 (1,4)
533	4 (1,8)	Leu533>Pro	4 (1,8)
522	3 (1,4)	Ser522@Leu	3 (1,4)

Двойные мутации			
531511	2 (0,8)	Ser531@LeuLeu511@Arg	2 (0,8)
531516	1 (0,8)	Ser531@LeuAsp516@Thr	1 (0,4)
513526	1 (0,8)	Gln513@GlyHis526@Cys	1 (0,4)
<b>Всего</b>	<b>225 (100)</b>	<b>Всего</b>	<b>225 (100)</b>

писки вовсе, и часто меняют место жительства. Как правило, многие из них, получив лечение только в интенсивной фазе, возвращаются к месту своего постоянного проживания. Скученность населения и резко возросшая в последние годы внутренняя миграция населения в г. Бишкек и в Чуйскую область способствуют распространению туберкулезной инфекции в этих регионах. Больные туберкулезом интенсивно перемещаясь в процессе своей жизнедеятельности, активизируют интенсивность передачи туберкулезной инфекции и увеличивают число новых ее источников и очагов. Кроме того, высокая плотность населения в г. Бишкеке и Чуйской области и продолжающиеся миграционные процессы способствуют быстрому распространению МБТ с различными видами мутаций.

Таким образом, данное исследование позволило выявить типы мутаций в гене *groV* МБТ у больных туберкулезом, проживающих в различных регионах КР. Среди проанализированных рифампицин-устойчивых штаммов МБТ нам удалось выявить 18 различных типов мутаций, локализованных в 8 кодонах гена *groV*, что позволило создать базы данных штаммов МБТ с известными типами мутаций. Создание в Кыргызстане базы данных по мутациям в гене *groV* МБТ позволит улучшить контроль над распространением рифампицин-устойчивых штаммов МБТ в различных регионах и в масштабе всей республики.

Профиль мутаций гена *groV* МБТ, выявленных в Кыргызстане имеет сходство по частоте и спектру мутаций гена *groV* МБТ в РФ, Украине и Казахстане. Географическая близость, а также резко возросшая в последние годы миграция населения способствуют переносу и распространению ЛУ штаммов МБТ на территории государств СНГ.

## Заключение

Туберкулезная инфекция, обусловленная рифампицин-устойчивыми штаммами, растет в разных регионах Кыргызстана разными темпами, соответствующими специфике современных демографических и социальных процессов. Из всех регионов Кыргыз-

стана наиболее неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу сложилась в Чуйской области и в г. Бишкеке. В этих двух регионах по результатам проведенного биочип-анализа устойчивость МБТ к рифампицину составляет 28,5 %.

Определение ЛУ МБТ по мутациям в геноме (метод биологических микрочипов) позволит своевременно сделать правильный выбор лекарственных препаратов, улучшить исход лечения у таких больных и поможет пресечь дальнейшее распространение ЛУ штаммом МБТ.

Внедрение молекулярной эпидемиологии в практическую фтизиатрию Кыргызстана позволит по новому оценить и прогнозировать эпидемиологические модели возможных направлений распространения рифампицин-устойчивых штаммов МБТ на территории КР.

## Литература

1. Gillespie S.H. Evolution of drug resistance in mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46 (2): 267–274.
2. Ramaswamy S., Musser J.M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Tubercle Lung Dis.* 1998; 79 (1): 3–29.
3. Taniguchi H., Aramaki H., Nikaido Y. et al. Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in Mycobacterium tuberculosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996; 144: 103–108.
4. Bodmer T., Zurcher G., Imboden P., et al. Mutation position and type of substitution in the B subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995; 35: 345–348.
5. Михайлович В.М., Лана С.А., Грядунов Д.А., и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТБ-микрочипе для обнаружения рифампицин резистентных штаммов Mycobacterium tuberculosis. *Бюл. exper. биол. мед.* 2001; 1: 112–117.
6. Drobnienski F. A., Wilson S.M. The rapid diagnosis of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis – a molecular story. *J. Med. Microbiol.* 1998; 47: 189–196.
7. Скотникова О.И., Михайлович В.М., Носова Е.Ю. и др. Новые технологии определения лекарственной чувствительности Mycobacterium tuberculosis. *Пробл. туб.* 2004; 6: 40–43.

Таблица 3  
Типы и частота встречаемости мутаций гена *groV* МБТ, выявленных в различных регионах КР

Регионы	Количество образцов	Кодоны гена <i>groV</i> МБТ							
		531	526	516	511	513	512	522	533
1 г. Бишкек	n = 64	64 %	15,6 %	4,6 %	7,8	3,2	3,2	–	–
2 Чуйская обл.	n = 64	56,3	25,0 %	6,25	4,7	–	3,1	3,2	–
3 Иссык-Кульская обл.	n = 17	52,9	23,5 %	6,0	17,6	–	–	–	–
4 Нарынская обл.	n = 22	68,2	13,6	4,6	4,6	–	–	–	9,0
5 Таласская обл.	n = 12	66,6	25,1	–	–	–	–	–	8,3
6 Ошская обл.	n = 12	33,5	8,3	16,7	8,3	8,3	–	–	8,3
7 Джалал-Абадская обл.	n = 23	69,6	26,0	–	–	–	–	4,4	–
8 Баткенская обл.	n = 11	73,0	9,0	–	–	9,0	–	–	9,0

8. Генерозов Э.В., Альтшулер М.Л., Говорун В.М. и др. Детекция и характеристика мутаций в гене *rpoB* резистентных к рифампицину клинических штаммов *M. tuberculosis*. Бюл. exper. Биол. 1999; 2: 39–42.
9. Tracevska T., Jansone I., Broka L. et al. Mutations in the *rpoB* and *katG* genes leading to drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. J.Clin. Microbiol. 2002; 40 (10): 3789–3792.
10. Valim A.M., Rossettu M.R., Ribeiro M.O. et al. Mutations in the *rpoB* Gene of Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brazil. J.Clin. Microbiol. 2000; 38 (8): 3119–3122.
11. Qian L., Abe C., Lin T., et al. *rpoB* genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from East Asian Countries. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (3): 1091–1094.
12. Kapur V., Li L.L., Iordanescu S., et al. Characterization by automated DNA sequencing of mutation in the gene (*rpoB*) encoding the RNA polymerase B subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 1095–1098.
13. Bartfai Z., Soomskovi A., Kodmon C., et al. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. J. Clin. Microbiol. 2001; 39 (10): 3736–3739.
14. Matsiota-Bernard P., Vrioni G., Marinis E. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. J. Clin. Microbiol. 1998; 36 (1): 20–23.
15. Иманалиев М.Д., Гончарова З.К. Туберкулез в пенитенциарных учреждениях Кыргызской Республики. В кн.: Туберкулез: Научные труды и материалы Международной конференции "Контроль над туберкулезом в странах Центрально-Азиатского региона", Чолпон-Ата, 22–25 мая 2003 г. Бишкек; 2003. 38–42.

Поступила 27.04.05  
© Коллектив авторов, 2007  
**УДК 579.873.21.044**