

Ж.Т.Исакова¹, О.А.Пак¹, Э.У.Юсупова¹, З.А.Гончарова², А.Ф.Тумашова², М.Д.Кожомкулов², Д.К.Кожомкулов², Т.Ч.Чубаков², А.Ш.Алишеров², J.Friedland³, А.А.Алдашев¹

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 Минздраве КР, г. Бишкек, Кыргызстан;

2 — Национальный центр фтизиатрии при Минздраве КР, г. Бишкек, Кыргызстан;

3 — Hammersmith Hospital, Лондон, Великобритания

Zh.T.Isakova, O.A.Pak, E.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 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* vary considerably according to 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 the distribution of mutations of rpoB gene of *M. tuberculosis* in Kyrgyz Republic. A total of 380 rifampicin-sensitive and 225 rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* samples were analyzed for identification and characterization of mutations of rpoB gene by biological microchip assay. The biochip test demonstrated 18 different types of mutations in 8 codons among the rifampicin-resistant samples in the study. The majority of mutations (180 of 225, or 80 %) were in two codons: 531 and 526, mainly in the codon 531 (137 of 225; 60.8 %). The Ser531>Leu (134 of 225; 59.4 %) mutation being 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. There were: His526@Tyr-4.9 %, His526@Asp-4.9 %, His526@Arg-4.0 %, His526@Leu-3.5 %, and His526@Pro-1.8 %. The third most 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. These mutations found with a very low frequency comprised about 1.8 % of the total mutations of the 225 rifampicin-resistant samples.

Резюме

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

Введение

Проблема распространения штаммов микобактерий туберкулеза (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 ЛУ к основным противотуберкулезным препаратам — изо-

ниазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу, пипразинамиду 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, 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, 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 Российской Федерации [6, 7, 8], в Латвии [8], в Бразилии [9] и в странах Юго-Восточной Азии (Китай, Япония, Корея, Тайвань) [10] 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 [11]. Так, в Нью-Йорке, Техасе, Нью-Мексико и 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 [12] превалирует мутация в 516-м кодоне, а в Греции [13] 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 обследовано 605 образцов ДНК МБТ. Из 605 клинических штаммов 225 были рифампицин устойчивые штаммы: в том числе из г. Бишкека ($n = 64$), Чуйской области ($n = 64$), Иссык-кульской области ($n = 17$), Нарынской области ($n = 22$), Таласской области ($n = 12$), Ошской области ($n = 12$), Джалал-Абадской области ($n = 23$) и Баткенской области ($n = 11$).

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, которые приводят к возникновению устойчивости к рифампицину. На 1-й стадии полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификацию фрагмента гена *groV* МБТ, длиной 193 пар олигонуклеотидов, проводили с парой праймеров F105 и R273 на амплификаторе "Hybaid" (Англия). Далее, 2-ю 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, двух стадийный ПЦР анализ, ДНК-гибридизацию, визуализацию результатов гибридизации на "Чипдетекторе-03" проводили в НИИ молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии Минздрава 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 приведены 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 ЛУ 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 регионах республики. Возможно, высо-

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

Регион	Кол-во образцов	% от общего кол-ва
Бишкек	64	28,5
Чуй	64	28,5
Иссык-Куль	17	7,5
Нарын	22	9,8
Талас	12	5,3
Ош	12	5,3
Джала-Абад	23	10,3
Баткен	11	4,9
Всего	225	100

кий 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. [14], заболеваемость туберкулезом среди заключенных превысила 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 выявлено 18 различных типов мутаций, затрагивающих 8 кодонов гена *groV*, из которых 15 — единичные нуклеотидные замены и 3 двойные мутации (табл. 2).

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

Кодон	Общее кол-во (%)	Типы мутаций	Общее кол-во (%)
531	137 (60,8)	Ser531@Leu	134 (59,4)
		Ser531@Trp	3 (1,4)
		His526@Tyr	11 (4,9)
		His526@Asp	11 (4,9)
526	43 (19,1)	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			
531	2 (0,8)	Ser531@Leu	2 (0,8)
511		Leu511@Arg	
531	1 (0,8)	Ser531@Leu	1 (0,4)
516		Asp516@Thr	
513	1 (0,8)	Gln513@Gly	1 (0,4)
526		His526@Cys	
Всего	225 (100)	Всего	225 (100)

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 составила от 33,5 % до 73 %. Наиболее часто (73 %) данная мутация обнаружена у больных туберкулезом из Баткенского региона. Это связано с тем, что в Национальный центр фтизиатрии (г. Бишкек) из регионов направляются, 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 показал, что мутация His526>Tyr встречалась в 4,9 %; His526>Asp в 4,9 %; His526>Arg в 4 %; His526>Leu в 3,5 %; His526>Pro в 1,8 % случаев. Штаммы МБТ с мутацией в 526-м кодоне встречались у больных туберкулезом со всех 8 регионов республики.

На 3-м месте по частоте встречаемости находятся мутации в кодонах 516-м (5,2 %) и 511 (6,3 %). Из двух мутаций, выявленных нами в 516-м кодоне, наиболее чаще встречается Asp516@Tyr. Мутация в 511-м кодоне представлено в основном заменой Leu511@Pro. Штаммы МБТ с мутациями в 516-м и 511-м кодонах встречались в 5 регионах Кыргызстана, но отсутствовали в Таласском, Джалал-Абадском и Баткенском регионах.

По литературным данным мутации в 533, 522, 513, 512-м кодонах являются редкими [15]. В нашем исследовании частота встречаемости каждой из мутаций в 533, 513, 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 в Чуйской области (табл. 3). В этих двух регионах циркулируют МБТ с мутацией в 531, 526, 522, 516, 513, 512, 511-м кодонах. Одной из причин широкого распространения различных мутантных штаммов МБТ в этих регионах является высокий уровень внутренней миграции. Мигранты со всей республики стремятся осесть в г. Бишкеке или вокруг него. Они имеют временную прописку, или вообще прописки не имеют, и часто меняют место жительства. Как правило, многие из них, получив лечение толь-

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

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

ко 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 в 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 нам 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 Российской Федерации, на Украине и в Казахстане. Географическая близость, а также резко возросшая в последние годы миграция населения способствуют переносу и распространению лекарственно-устойчивых 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 Кыргызстана наиболее неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по туберкулезу наблюдается 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 штаммам 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. 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.
4. 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. экспер. биол.* 2001; 1: 112–117.
5. 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.
6. Скотникова О.И., Михайлович В.М., Носова Е.Ю. и др. Новые технологии определения лекарственной чувствительности *Mycobacterium Tuberculosis*. *Пробл. туб.* 2004; 6: 40–43.
7. Генерозов Э.В., Альтишлер М.Л., Говорун В.М. и др. Детекция и характеристика мутаций в гене *groV* резистентных к рифампицину клинических штаммов *M. tuberculosis*. *Бюл. экспер. биол.* 1999; 2: 39–42.
8. Tracavska T., Jansone I., Broka L. et al. Mutations in the *groV* and *katG* genes leading to drug resistance in

- Mycobacterium tuberculosis* in Latvia. J.Clin. Microbiol. 2002; 40 (12): 3789–3792.
9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Иманалиев М.Д., Гончарова З.К. Туберкулез в пенитенциарных учреждениях Кыргызской Республики. В кн.: Туберкулез: Научные труды и материалы Международной конф. "Контроль над туберкулезом в странах Центрально-Азиатского региона", Чолпон-Ата, 22–25 мая 2003 г. Бишкек; 2003. 38–42.
 15. 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.

Поступила 27.04.05
© Коллектив авторов, 2006
УДК 579.852.21.044:615.33