

**ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАЦИЙ ГЕНА *rpoB*,
ВЫЗЫВАЮЩЕГО РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К РИФАМПИЦИНУ
НА ТЕРРИТОРИИ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**

А.Д. Адамбекова

Рассмотрены результаты исследований циркулирующего на территории Кыргызской Республики штамма комплекса *M. tuberculosis*. Представлены данные о мутации гена в пробах дикого типа *rpoB* WT8 и мутантного типа *rpoB* MUT3 и их сопряжение между собой.

Ключевые слова: GenoType MDRTBplus; *M. tuberculosis*; мутация; резистентность; ген *rpoB*.

Введение. Туберкулез остается угрозой человечеству. В 2010 г. в мире было зарегистрировано 8,8 млн случаев заболевания туберкулезом (ТБ) и около 1,1 млн – со смертельным исходом. По данным ВОЗ, около трети населения планеты – 2 млрд человек – инфицированы *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) и подвержены риску заболевания [1].

В Кыргызской Республике в 2011 г. было зарегистрировано 5535 впервые выявленных больных туберкулезом, заболеваемость при этом составила 101,1 случаев на 100 тыс. населения. Показатель смертности от ТБ по республике в 2011 г. составил 9,2 случая на 100 тыс. [2].

Несмотря на то, что в последние годы общее число случаев ТБ в Кыргызстане снижается, проблема осложняется распространением лекарственно-устойчивого туберкулеза и туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией [3]. По результатам исследования распространенности лекарственной устойчивости в Кыргызской Республике, проведенного в 2010–2011 гг. Республиканской референс-лабораторией Национального центра фтизиатрии (НЦФ) при поддержке CDC (Атланта, США), проекта ХОУП в Кыргызской Республике и Супра-Национальной референс-лаборатории

(г. Мюнхен, Германия), бремя лекарственной устойчивости в Кыргызстане чрезвычайно высоко. Так, ТБ со множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ ТБ) среди новых случаев ТБ составил 26,4 % и среди ранее леченных – 51,6 % [4, 5].

Если диагноз МЛУ ТБ не подтвержден, применение неадекватного и, следовательно, неэффективного лечения антибиотиками может привести к дальнейшему распространению устойчивых форм бактерий и нарастанию устойчивости. Поэтому ускоренная диагностика и идентификация МЛУ ТБ – необходимое условие для подбора соответствующего лечения [6].

Внедрение молекулярно-биологических методов в широкую клиническую практику должно привести к повышению эффективности диагностики и правильному выбору тактики лечения, позволит в перспективе осуществить динамическое наблюдение за путями переноса возбудителя туберкулеза, улучшить контроль эффективности лечения и улучшить систему эпидемиологического надзора за туберкулезом [7].

В основе тест-систем GenoType®MTBDRplus, производства Hain Lifescience GmbH, Negren, Germany лежит ПЦР. Тест-система основана на уни-

кальной DNA•Strip® технологии (гибридизация с ДНК-зондами) и позволяет проведение молекулярно-генетической идентификации комплекса МБТ и его устойчивости к рифампицину и/или изониазиду в культивированных образцах или в положительных клинических образцах мокроты. В комплекс *M.tuberculosis* входят следующие микобактерии, вызывающие ТБ: *M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.bovis* подвид *bovis*, *M.bovis* подвид *caprae*, *M.bovis* BCG, *M.canettii* и *M.pinnipedii*. Быстрое получение результатов является главным преимуществом данной тест-системы. Получение окончательного результата минимум через 4–6 часов и максимум в течение двух рабочих дней.

Определение наличия резистентности к рифампицину возможно при детекции наиболее значимых мутаций гена *rpoB*, (кодирующего бета субъединицу РНК полимеразы) [8–10].

Целью нашего исследования явилось изучение характера мутаций в гене *rpoB*, ведущего к развитию резистентности МБТ к рифампицину, на территории Кыргызской Республики.

Материал и методы. Проводилась идентификация комплекса *M. tuberculosis*, определялась резистентность к рифампицину и/или к изониазиду в мокроте с положительным мазком и культуре с помощью тест-систем GenoType® MTBDRplus в РРЛ НЦФ. Процедура проведения теста подразделяется на три этапа: выделения ДНК из культивируемого материала (плотная/жидкая среда) или из клинических образцов (деконтаминированные положительные образцы мокроты), амплификации и гибридации.

В ходе проводимых реакций, происходит достоверное распознавание нескольких вариантов последовательностей в тестируемой области гена. Как конечный результат получается окрашенная форма, видимая на мембране стрипов, как цветной преципитат. Простая и быстрая оценка полученных дан-

ных проводится с помощью прилагаемого шаблона/эталоны. На каждой стрипе 27 зон реакции.

Аналізу подверглись частота мутаций в локусе *rpoB*. Оценивались следующие зоны реакции *rpoB*:

- контроль Локуса *rpoB*;
- 8 проб дикого типа:
 - rpoB* проба дикого типа 1 (*rpoBWT1*);
 - rpoB* проба дикого типа 2 (*rpoBWT2*);
 - rpoB* проба дикого типа 3 (*rpoBWT3*);
 - rpoB* проба дикого типа 4 (*rpoBWT4*);
 - rpoB* проба дикого типа 5 (*rpoBWT5*);
 - rpoB* проба дикого типа 6 (*rpoBWT6*);
 - rpoB* проба дикого типа 7 (*rpoBWT7*);
 - rpoB* проба дикого типа 8 (*rpoBWT8*).

Также оценивались мутантные пробы: мутантная проба 1 (*rpoBMUT1*), мутантная проба 2А (*rpoBMUT2A*), мутантная проба 2В (*rpoBMUT2B*) и мутантная проба 3 (*rpoBMUT3*).

Полученные стрипы подклеивали к специальной форме протокола, приложенного к набору. Хранение протоколов осуществляли в сухом, защищенном от света месте.

Работа с культурами и инфекционными материалами велась в шкафу биологической безопасности с ламинарным потоком воздуха в соответствии с требованиями биологической безопасности.

Полученные данные обработаны общепринятыми методами медико-биологической статистики.

Результаты исследования. За исследуемый период времени было проведено 597 анализов с использованием тест-систем GenoType® MTBDRplus. Из этих данных были проанализированы 378 проб с различными мутациями гена *rpoB*.

Пробы дикого типа охватывают важнейшие участки устойчивости каждого гена. Если все пробы дикого типа одного гена показывают положительный сигнал, значит в нуклеотидной последовательности не зафиксировано ни одной мута-

Таблица 1 – Характеристика мутаций в гене *rpoB*, ведущая к развитию резистентности к рифампицину

Виды мутантных проб	Виды диких проб								Всего мутаций в MUT
	<i>rpoB</i> WT1	<i>rpoB</i> WT2	<i>rpoB</i> WT3	<i>rpoB</i> WT4	<i>rpoB</i> WT5	<i>rpoB</i> WT6	<i>rpoB</i> WT7	<i>rpoB</i> WT8	
<i>rpoB</i> MUT1	1	1	2	2	-	-	-	-	6
<i>rpoB</i> MUT2A	-	-	-	-	-	-	9	-	9
<i>rpoB</i> MUT2B	-	-	-	-	-	-	3	-	3
<i>rpoB</i> MUT3	-	1	-	-	-	-	3	155	159
Мутации в WT, не сопряженные с MUT	-	12	20	15	2	2	35	26	112
Всего мутаций в WT	1	14	22	17	2	2	50	181	289

Примечание: * – расшифровку аббревиатур см. в тексте.

ции. Это свидетельствует о том, что тестируемый штамм чувствителен к антибиотикам.

Итак, как видно из таблицы 1, наибольшее количество мутаций гена *rpoB* выявлено в пробах дикого типа *rpoB* WT8 – 181. Мутации в данной дикой пробе сопровождались мутациями в *rpoB* MUT3 в 155 случаях. И в 26 случаях мутации пробы не были сопряжены с изменением нуклеотидной последовательности мутантных проб. В 50 случаях тестируемые штаммы показали наличие мутации в *rpoB* WT7, в большинстве – 35 образцов – не сопровождались наличием мутаций в *rpoB* MUT пробах. Также отмечены мутации в диких пробах: в *rpoB*WT1 – 1; *rpoB*WT2 – 14; *rpoB*WT3 – 22; *rpoB*WT4 – 17; *rpoB*WT5 и *rpoB*WT6 по 2 мутации.

Мутантные пробы выявляют наиболее часто встречающиеся мутации, вызывающие устойчивость. Каждая полоска, отличающаяся от полосок дикого типа, указывает на устойчивость тестируемого штамма. В случае мутации ампликоны не могут связаться с соответствующими пробами диких типов. Отсутствие сигнала, даже в одной пробе дикого типа указывает на устойчивость тестируемого штамма к соответствующим антибиотикам.

Так, в наших исследованиях определено наибольшее количество изменений нуклеотидной последовательности в пробе мутантного типа *rpoB*MUT3 – 159, большая часть которых – 155 случаев – сопряжена, как упоминалось выше, с мутациями дикой пробы *rpoB* WT8. Также выявлены мутации в *rpoB*MUT1, в *rpoB*MUT2A и в *rpoB*MUT2B, по 6, 9 и 3 соответственно.

Итак, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что циркулирующий на территории Кыргызской Республики штамм комплекса *M. tuberculosis* имеет мутации гена в пробе дикого типа *rpoB* WT8 – 181; в пробе мутантного типа *rpoB*MUT3 – 159 и в 155 случаях данные мутации сопряжены между собой.

Литература

- World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. World Health Organization, Geneva, Switzerland 2011.
- Аналитическая справка НЦФ по реализации противотуберкулезных мероприятий за 2011 г. и Закона КР “О защите населения от туберкулеза” № 65 от 5 мая 1998 года. Бишкек, 2011.
- WHO (World Health Organisation). Global tuberculosis control – epidemiology, strategy, financing. Geneva, WHO, 2009 (WHO/HTM/TB/2009.411).
- Review of the laboratory network of the Kyrgyz Republic. 9–29 April 2012. Dr. Harald Hoffmann & Dr. Vladzimir Antonenka, TB Laboratory Experts, IML red GmbH, Germany.
- Исакова Ж.Т. Эффективность применения биочип-анализа для быстрого молекулярно-генетического определения мульти-резистентных штаммов *M.tuberculosis* / Ж.Т. Исакова, З.К. Гончарова, Э.У. Юсупова и др. // Молекулярная медицина. 2008. № 1. С. 51–55.
- GenoType® MTBDRplus.. Руководство к использованию. IFU-304A-02. Молекулярно-генетическое исследование для идентификации комплекса *M.tuberculosis* и определение его устойчивости к Рифампицину и Изониазиду в клинических образцах и культивированных образцах. 02.2012.
- Alonso M., Palacios J.J., Herranz M., Penedo A., Menendez A., Bouza E., Garcia de Viedma D. Isolation of Mycobacterium tuberculosis strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category // J Clin Microbiol. 2011; 49: 2688–2690.
- Crudu V., Stratan E., Romanenco E., Allerheiligen V., Hillemann A., Moraru N. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as RMP and INH resistances // J Clin Microbiol. 2012; Epub ahead of print, doi: 10.1128/JCM.05903–11.
- Telenti A., Imbonden P., Marshesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Sclipper K., Bodmer T. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. Lancet 1993, 341: 647–650.
- Zhang Y, Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *M.tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13: 1320–1330.