

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К РИФАМПИЦИНУ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *rpoB* НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Т. Ю. САЛИНА, ²Т. И. МОРОЗОВА

THE MOLECULAR GENETIC FEATURES OF RIFAMPICIN RESISTANCE AND THE PREVALENCE OF *rpoB* GENE MUTATIONS IN THE SARATOV REGION

¹T. YU. SALINA, ²T. I. MOROZOVA

¹Саратовский областной клинический противотуберкулезный диспансер,
²ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России

Исучали распространенность и спектр мутаций в гене *rpoB*, кодирующем лекарственную устойчивость к рифампицину, у 257 больных активным туберкулезом легких, проживающих на территории Саратовской области. Исследования проводили на биологических микрочипах с применением набора реагентов «ТБ-Биочип МДР», Россия. На данной территории с помощью молекулярно-генетического метода выявлена большая распространенность штаммов *M. tuberculosis*, имеющих лекарственную устойчивость к рифампицину, – 44,3%. Зарегистрировано 13 различных видов мутаций в 8 кодонах *rpoB* гена *M. tuberculosis*. Среди рифампицин-устойчивых штаммов установлен неблагоприятный спектр генетических мутаций, а именно: большое число мутаций Ser 531->Leu – 62,2%, что сопряжено с высоким уровнем лекарственной устойчивости к рифампицину. Выявлено достоверное преобладание данного вида мутации (70,7%) у больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя по сравнению с пациентами с изолированной устойчивостью к рифампицину – 25%, $p = 0,0013$. Полученные данные указывают на необходимость разработки дополнительных мер по ограничению распространения рифампицин-устойчивых штаммов.

Ключевые слова: туберкулез, лекарственная устойчивость, рифампицин, мутации в генах.

The prevalence and spectrum of mutations in the *rpoB* gene encoding for rifampicin resistance were studied in 257 active pulmonary tuberculosis patients living in the Saratov Region. Investigations were performed using a TB-Biochip MDR kit (Russia). A molecular genetic technique was used to reveal the high prevalence of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains (44.3%). Thirteen different types of mutations were recorded in 8 codons of the *M. tuberculosis rpoB* gene. Among the rifampicin-resistant strains, there was an unfavorable spectrum of gene mutations, namely: a large number of Ser 531->Leu mutations (62.2%), which was associated with the high level of rifampicin resistance. A significant predominance (70.7%) of this mutation type was found in patients with multidrug-resistant tuberculosis as compared to those with rifampicin resistance (25%); $p = 0.0013$. The findings show the need for elaborating additional measures to limit the spread of rifampicin-resistant strains.

Key words: tuberculosis, drug resistance, rifampicin, gene mutations.

Рифампицин (Rif) – основной химиопрепарат, воздействующий на активно размножающуюся популяцию микобактерий туберкулеза (МБТ), используемый на всех этапах лечения больных туберкулезом. Увеличение в последние годы распространения рифампицин-устойчивых штаммов МБТ делает проблему особенно актуальной [1]. Механизмы лекарственной устойчивости (ЛУ) к рифампицину достаточно хорошо изучены на молекулярно-генетическом уровне [5, 8, 13, 14]. Рифампицин блокирует процесс транскрипции, проникая через гидрофобную клеточную стенку и связываясь с ДНК-зависимой РНК-полимеразой, что приводит к торможению жизнедеятельности МБТ. В подавляющем большинстве случаев (97%) устойчивость к рифампицину обусловлена преимущественно точечными мутациями в коротком фрагменте (81 пара нуклеотидов) гена *rpoB*, кодирующего бета-субъединицу РНК-полимеразы *M. tuberculosis* [11, 13]. Для разных стран характерна различная частота встречаемости отдель-

ных мутаций гена *rpoB* [3, 4]. Представляется актуальным изучение регионально-географических особенностей распространения мутаций в гене *rpoB* на примере отдельной территории Саратовской области. Раннее выявление рифампицин-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* и спектра мутаций в генах, кодирующих эту устойчивость, позволяет выбрать адекватную схему лечения, своевременно провести коррекцию химиотерапии, повысить эффективность лечения и предотвратить дальнейшее распространение ЛУ.

Цель работы – изучить спектр и распространенность мутаций в гене *rpoB* в штаммах *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Саратовской области, с помощью метода биологических микрочипов.

Материалы и методы

Обследовано 257 больных активным туберкулезом легких [впервые выявленные – 247 (96,1%) человек, рецидивы – 10 (3,9%)], находившихся на

стационарном лечении в Саратовском областном клиническом противотуберкулезном диспансере (СОКПГД) в 2010-2012 гг. Из них мужчин было 174 (67,7%), женщин – 83 (32,3%), возраст от 18 до 70 лет. Клинические формы туберкулеза представлены преимущественно инфильтративным – 196 (76,3%) и диссеминированным туберкулезом – 32 (12,5%) человека. Другие формы туберкулеза наблюдали в единичных случаях [очаговый туберкулез – у 4 (1,6%) человек, казеозная пневмония – у 2 (0,78%), фиброзно-кавернозный туберкулез легких – у 4 (1,6%), туберкулемы – у 19 (7,4%)]. Бактериовыделение выявлено у 132 (51,4%) больных, деструктивные изменения в легких – у 118 (45,9%). У всех пациентов, наряду с традиционными методами микробиологической диагностики туберкулеза, выявление микобактерий туберкулезного комплекса, определение их ЛУ к изониазиду и рифампицину, а также изучение спектра генетических мутаций ДНК *M. tuberculosis* проводили в образцах мокроты с помощью метода биологических микрочипов с использованием набора реагентов «ТВ-биочип MDR». Технология проведения исследований, набор реагентов и оборудования разработаны сотрудниками института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (ООО «Биочип-ИМБ»), г. Москва. Результаты реакции регистрировали на портативном анализаторе биочипов «Чипдетектор-01» с соответствующим программным обеспечением «ImageWare», Россия. Базовая методология проведения исследований основана на выделении ДНК МБТ из мокроты обследуемых пациентов, выполнении двух последовательных мультиплексных ПЦР со специфическими для МБТ праймерами и гибридизации продуктов амплификации 2-й стадии ПЦР с олигонуклеотидными зондами, помещенными в ячейках микрочипа [5]. В случае обнаружения мутаций в гене *rpoB* штаммы *M. tuberculosis* относили к устойчивым к рифампицину, при отсутствии мутаций – к чувствительным, при наличии одновременно мутаций еще и в генах *katG*, *inhA*, *ahpC*, кодирующих ЛУ к изониазиду, – к множественно-лекарственно-устойчивым (МЛУ).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием компьютерных программ Microsoft® Excel для Windows XP® и Statistica 6.0. Для сравнения данных использовали определение «хи-квадрата». В качестве критического был принят уровень 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

В результате исследований ДНК микобактерий туберкулезного комплекса в количестве, достаточном для определения ЛУ, выделена из мокроты у 167 из 257 (64,9%) пациентов активным туберкулезом легких. Из них мутации в гене *rpoB*, кодирующие ЛУ к рифампицину обнаружены у 74 (44,3%), включая МЛУ у 58 (34,7%) и изолиро-

ванную устойчивость к рифампицину – у 16 (9,6%) пациентов. Среди 74 проанализированных рифампицин-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* выявлено 13 различных видов мутаций, локализованных в 8 (511-533) кодонах *rpoB* гена. Данные представлены в табл. 1. Наиболее часто встречались мутации в 531-м кодоне – в 53 (71,6%) случаев, при этом Ser531->Leu идентифицирована в 62,2% (46 из 74) случаев. Данный вид мутации представляет наибольший интерес, так как имеются научные работы [6], указывающие, что мутация Ser 531->Leu обуславливает устойчивость к рифампицину высокого уровня (> 50 мкг/мл), не нарушает жизнеспособность МБТ и чаще всего связана с наиболее опасным генотипом МБТ семейства *Beijing*. Кроме того, показано, что у пациентов с данным видом мутации возрастает риск возникновения устойчивости к другим препаратам первого ряда [3].

Таблица 1

Частота встречаемости мутаций в гене *rpoB*, кодирующем ЛУ к рифампицину

Кодоны <i>rpoB</i> гена	Частота встречаемости мутаций в гене <i>rpoB</i> (абс.%)
531	53 (71,6)
511	11 (14,9)
526	9 (12,2)
512	6 (8,1)
533	3 (4,1)
513	2 (2,7)
516	2 (2,7)

Второй по частоте встречаемости у обследованных пациентов являлась мутация в 511-м кодоне (Leu->Pro) – у 11 (14,9%) человек. Реже встречались мутации в 526-м кодоне – у 9 (12,2%) пациентов, они были представлены 3 видами мутаций His526->Leu, His526->Tyr, His526->Gln. Совсем редко встречались мутации в 512-м кодоне – у 6 (8,1%) человек, в 533-м кодоне – у 3 (4,1%), в 513-м кодоне – у 2 (2,7%), в 516-м кодоне – у 2 (2,7%). У 13 (17,6%) пациентов отмечали комбинацию 2 или 3 мутаций одновременно. В целом частота встречаемости мутаций в 531, 526, 533-м кодонах существенно не отличалась от результатов обследования в других регионах [3, 4, 11, 14], но имеются и некоторые территориальные особенности, характеризующиеся более высоким уровнем мутаций в 511-м и 512-м кодонах – 14,9 и 8,1% соответственно.

Из литературы известно, что минимальная ингибирующая концентрация (МИК) рифампицина, используемая при определении ЛУ с использованием метода абсолютных концентраций при посеве МБТ на твердые питательные среды, может быть разной в зависимости от типа имеющихся мутаций [4, 10]. Так, например, показано, что мутации в гене *rpoB*, приводящие к замене аминокислот (His->Leu) и (Ser->Leu) обеспечи-

вают высокий уровень устойчивости к рифампицину (70 мкг/мл и выше) [8-10], но низкий – к рифабутину (0,25-0,50 мкг/мл) [4]. Такие замены суммарно выявлены в 53 (71,6%) случаях. Аминокислотные замены в 516-м и 526-м кодонах, по данным Н. Ohno et al. (1996), также приводят к устойчивости к рифампицину высокого уровня. На данной территории, как видно из табл. 1, мутации в 526-м кодоне встречались в 9 (12,2%) случаях, а в 516-м кодоне – всего у 2 (2,7%) пациентов. В то же время мутации Leu511->Pro, Asp516->Tyr, по данным других исследователей [4], имеют низкий уровень перекрестной устойчивости к рифабутину. Мутации Leu511->Pro, Asp516->Tyr выявлены у 13 (17,6%) обследованных. Таким образом, анализ генетических мутаций важен для выбора оптимальной схемы химиотерапии и может помочь решить вопрос о целесообразности назначения больным рифампицина, рифабутину или необходимости полной замены рифампицина препаратами второго ряда.

Сравнили спектр генетических мутаций в образцах мокроты, имеющих изолированную устойчивость к рифампицину и МЛУ. Результаты представлены в табл. 2. Как следует из табл. 2, в группе пациентов с изолированной устойчивостью к рифампицину достоверно реже встречается мутация Ser531->Leu 4 (25%) по сравнению с группой пациентов с МЛУ 41 (70,7%), $p = 0,0013$. В отношении распространения других видов мутаций в обеих группах достоверных различий не получено.

Таблица 2

Распространенность наиболее часто встречающихся видов мутаций в гене *rpoB* у пациентов с МЛУ и изолированной устойчивостью к рифампицину

Виды мутаций	Изолированная устойчивость к Rif (n = 16) абс./%	МЛУ (n = 58) абс./%	p
Ser531->Leu	4/25	41/70,7	0,0013
His526->Leu	3/18,8	4/6,9	0,1534
Leu511->Pro	3/18,8	8/13,8	0,6223

Выводы

1. У обследованной группы пациентов активным, преимущественно впервые выявленным туберкулезом легких, проживающих на территории Саратовской области, установлен высокий уровень ЛУ к рифампицину – 44,3%, регистрируемый на уровне генетических мутаций.

2. На данной территории зарегистрировано 13 различных видов мутаций в 8 кодонах *rpoB* гена *M. tuberculosis*, отвечающих за устойчивость к рифампицину.

3. Среди рифампицин-устойчивых штаммов преобладали неблагоприятные виды мутации Ser531 – 71,6%, которые, по данным литературы,

ассоциируются с высоким уровнем ЛУ к рифампицину. Наиболее неблагоприятный вид мутации Ser531->Leu установлен у 62,2% пациентов.

4. Выявлено достоверное преобладание данного вида мутации Ser 531->Leu у больных 2-ой группы – 70,7%, имеющих одновременно мутации в гене *rpoB* и в генах *katG*, *inhA* и *ahpC* (МЛУ) по сравнению с пациентами, у которых обнаружена изолированная устойчивость к рифампицину – 25%, $p = 0,0013$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьева О. А. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза – современные взгляды на проблему // Сиб. мед. ж. – 2008. – № 2. – С. 5-8.
2. Исакова Ж. Т., Гончарова Э. К., Алдашев А. А. Характеристика спектра лекарственной устойчивости рифампицин-резистентных штаммов *M. tuberculosis* к другим противотуберкулезным препаратам 1-го ряда // Пробл. туб. – 2008. – № 11. – С. 39-41.
3. Исакова Ж. Т. Частота встречаемости и типы мутации в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изоиазиду у штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Кыргызской Республике // Молекул. генет., микробиол. и вирусол. – 2008. – № 4. – С. 36-38.
4. Исаева Е. Л. Генетические мутации микобактерий туберкулеза, ответственные за резистентность к рифампицину у больных туберкулезом: идентификация и характеристика: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002. – 103 с.
5. Михайлович В. М., Лапа С. А., Грядинов Д. А. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТВ-микрочипе для обнаружения рифампицин-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – № 1. – С.112-117.
6. Руководство по легочному и внелегочному туберкулезу / Под ред. Ю. Н. Левашова, Ю. М. Репина. – СПб.: ЭЛБИ, 2008. – 544 с.
7. Степанов Ю. Г., Степанова В. Н., Шемякин И. Г. Молекулярные механизмы устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам // Антибиот. и химиотерап. – 1999. – № 4. – С. 39-43.
8. Степанова В. Н., Панферцев Е. А., Митрофанова Г. Н. и др. Молекулярные механизмы устойчивости к рифампицину и изоиазиду клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* // Пробл. туб. – 2000. – № 1. – С. 32-36.
9. Bahrmand A. R., Titov L. P., Tasbiti A. H. et al. High-Level rifampicin resistance correlates with multiple mutations in the *rpoB* gene of pulmonary tuberculosis isolates from the pulmonary tuberculosis isolates from the Afghanistan border of Iran // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – P. 2744-2750.
10. Bodmer N., Zurcher G., Imboden I. et al. Mutation position and type of substitution in the beta-subunit of the RNA Polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // J. Antimicrob. Chemother. – 1995. – Vol.35. – P.345-348.
11. Luo T., Zhao M., Li X. et al. Selection of Mutations to detect multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Shaghai, China // Antimicrob. agents and Chemother. – 2010. – Vol. 54, № 3. – P. 1075-1081.

12. Ohno H., Koga H., Kohno S. et al. Relationship between rifampicin MISC for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan // *Antimicrob. Agents Chemoter.* – 1996. – Vol. 40 – P. 1053-1056.

13. Telenti A., Imboden P., Marchesi F. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // *Lancet.* – 1993. – Vol. 341 – P. 647-650.

14. Wu X., Zhang J., Zhuang Y. et al. He X. Molecular mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates // *Clin. Med. J.* – 1999. – Vol. 112, № 6. – P. 524-528.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Салина Татьяна Юрьевна

Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского,

доктор медицинских наук, доцент.

410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112.

Тел.: 8 (8452) 27-33-70, 51-15-32.

E-mail: medunic@sgmu.ru

Поступила 27.03.2013