

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *M. TUBERCULOSIS*, КОДИРУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ К ИЗОНИАЗИДУ И РИФАМПИЦИНУ, СРЕДИ ГОРОДСКОГО И СЕЛЬСКОГО НАСЕЛЕНИЯ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Т. Ю. САЛИНА², Т. И. МОРОЗОВА², А. Н. ДАНИЛОВ²

PREVALENCE OF MUTATIONS IN THE GENES OF *M. TUBERCULOSIS* CODING THE DRUG RESISTANCE TO ISONIAZID AND RIFAMPYCIN AMONG URBAN AND RURAL POPULATIONS OF SARATOV REGION

T. YU. SALINA², T. I. MOROZOVA², A. N. DANILOV²

¹Саратовский областной клинический противотуберкулезный диспансер, г. Саратов

²ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского МЗ РФ, г. Саратов

¹Saratov Regional Clinical TB Dispensary, Saratov, RF

²V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, Saratov, RF

У 261 больного активным, преимущественно впервые выявленным туберкулезом легких проведено сравнительное изучение спектра и распространенности мутаций в генах *katG*, *inhA*, *ahpC* и *rpoB* *M. tuberculosis* среди городских и сельских жителей. Исследования проводили на биологических микрочипах с применением набора реагентов «ТБ-биочип MDR», Россия. Установлено, что у больных туберкулезом, постоянно проживающих в городах, достоверно чаще по сравнению с больными из сельской местности регистрируется множественная лекарственная устойчивость – 38,6% против 23,2% соответственно, выявляются неблагоприятный спектр мутаций в генах *katG* и *rpoB*, преобладание множественных и сочетанных мутаций в 2-3 генах одновременно. Это требует разработки дополнительных мер контроля за распространением лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* среди городского населения.

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

261 tuberculosis patients mainly suffering from the pulmonary forms were enrolled into the comparative study of the pattern and prevalence of mutations in the genes of *katG*, *inhA*, *ahpC* and *rpoB* *M. tuberculosis* among urban and rural population. The testing was conducted with use of biological microchips and the set of reagents TB-Biochip, Russia. It has been found out that among tuberculosis patients constantly living in urban settings the multiple drug resistance is registered confidently more often compared to rural citizens – 38.6% against 23.2% respectively and the unfavorable pattern of mutations is detected in the genes of *katG* and *rpoB*, simultaneous multiple and concurrent mutations in 2-3 genes prevail. This requires development of additional measures of control over transmission of drug resistant strains of *M. tuberculosis* among urban population.

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

Современная эпидемическая ситуация по туберкулезу в России и в мире характеризуется непрекращающимся ростом распространенности туберкулеза с множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) [2, 4, 5, 10], что представляет серьезную угрозу национальным программам борьбы с этим грозным заболеванием [4]. Туберкулез с ШЛУ возбудителя в 2013 г. был зарегистрирован уже в 84 странах [4]. Механизмы лекарственной устойчивости (ЛУ) к основным противотуберкулезным препаратам [изониазиду (INH) и рифампицину (Rif)] достаточно хорошо изучены на молекулярно-генетическом уровне [1, 3, 6, 10]. В основе ЛУ микобактерий туберкулеза (МБТ) лежат хромосомные мутации в генах, амплификация которых под действием неадекватной терапии противотуберкулезными препаратами приводит к формированию лекарственно-устойчивых форм туберкулеза. Резистентность к INH кодируется в генах *katG*, *inhA*, *ahpC* [1, 3, 6, 10].

Устойчивость к Rif в подавляющем большинстве случаев (97%) обусловлена точечными мутациями в коротком фрагменте (81 пара нуклеотидов) гена *rpoB*, кодирующего бета-субъединицу РНК-полимеразы *M. tuberculosis* [7, 8].

В Саратовской области, несмотря на положительную тенденцию, характеризующуюся снижением основных эпидемиологических показателей по туберкулезу, сохраняется высокий уровень первичной ЛУ МБТ к основным антибактериальным препаратам (INH и Rif), включая МЛУ и ШЛУ. Заболеваемость городского населения в Саратовской области выше, чем сельского. В связи с этим представляется актуальным провести анализ региональных особенностей распространения лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* среди больных, постоянно проживающих на территории городов и в сельской местности.

Цель работы – изучить в сравнительном аспекте спектр и распространенность мутаций в генах *katG*,

inhA, *ahpC* и *rpoB* *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Саратовской области, у городского и сельского населения.

Материалы и методы

Обследован 261 пациент с активным туберкулезом легких [впервые выявленные – 250 (95,8%), рецидивы – 11 (4,2%)], находившийся на стационарном лечении в Саратовском областном клиническом противотуберкулезном диспансере (СОКПТД) в 2006-2013 гг. Из них мужчин было 171 (65,5%), женщин – 90 (34,5%) человек в возрасте от 18 до 78 лет. Клинические формы туберкулеза представлены преимущественно инфильтративным – 206 (78,9%) и диссеминированным туберкулезом – 27 (10,4%) человек. Другие формы туберкулеза наблюдались в единичных случаях. Бактериовыделение выявлено у 144 (55,2%) больных, деструктивные изменения в легких – у 163 (62,5%) человек. В зависимости от места постоянного проживания пациенты были распределены на 2 группы. Группу 1 составили 133 человека, постоянно проживающих в 7 городах Саратовской области (Саратов, Маркс, Пугачев, Аткарск, Красноармейск, Новоузенск, Петровск). Группу 2 – 128 человек, жителей сел и 18 районов Саратовской области. Пациенты обеих групп были сопоставимы по полу, возрасту и клиническим формам туберкулеза. У всех больных, наряду с традиционными методами микробиологической диагностики туберкулеза, выявление микобактерий туберкулезного комплекса, определение их лекарственной чувствительности к INH и Rif, а также изучение спектра генетических мутаций ДНК *M. tuberculosis* проводили в образцах мокроты методом 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»), Москва. Результаты реакции регистрировали на портативном анализаторе биочипов

«Чипдетектор-01» с соответствующим программным обеспечением Imageware, Россия.

В случае обнаружения изолированных мутаций в генах *katG*, *inhA*, *ahpC* штаммы *M. tuberculosis* относили к устойчивым к INH, при наличии мутаций в гене *rpoB* и отсутствии в генах *katG*, *inhA*, *ahpC* – к устойчивым к Rif, при наличии одновременно мутаций хотя бы в одном гене, кодирующем устойчивость к INH, и наличии мутации в гене *rpoB* – к МЛУ.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием компьютерных программ Microsoft® Excel для Windows XP® и Statistica 6.0. Для сравнения достоверности различий в двух группах использовали χ^2 -тест. В качестве критического уровня достоверности был принят критерий 0,05.

Результаты исследования

В результате исследований ДНК *M. tuberculosis* в количестве, достаточном для определения ЛУ, была выделена из мокроты у 101 (75,9%) пациента группы 1 и у 95 (74,3%) человек группы 2. Мутации в генах *katG*, *inhA*, *ahpC*, кодирующие ЛУ к INH, включая МЛУ, чаще регистрировались у пациентов группы 1 – 64 (63,4%) по сравнению с группой 2 – 51 (53,7%) пациент, но различия не достигают достоверных величин. Распространенность мутаций в различных генах, кодирующих ЛУ к INH, в обеих группах представлена в табл. 1. Как следует из табл. 1, наиболее часто в обеих группах наблюдались мутации в гене *katG* по сравнению с другими генами. Однако в группе 1 число мутаций в гене *katG* было достоверно больше – 55 (54,5%), включая изолированные ($n = 32$) и сочетанные мутации ($n = 23$), по сравнению с группой 2 – 31 (32,6%), $p = 0,0014$. Изолированные мутации в гене *inhA* чаще регистрировали у пациентов, проживающих в сельской местности. В клинических изолятах, полученных от пациентов группы 1, выявлено достоверно большее число сочетанных мутаций в двух и трех генах одновременно – 23 (22,8%), включая

Таблица 1

Распространенность одиночных и множественных мутаций в генах, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду, среди городских и сельских жителей

Гены, кодирующие лекарственную устойчивость к INH	Частота мутаций в генах		
	Группа 1 ($n = 101$) абс. /%	Группа 2 ($n = 95$) абс. /%	p
<i>katG</i>	32 (31,7)	30 (31,6)	$> 0,05$
Сочетанные мутации: <i>katG + inhA</i> <i>katG + ahpC</i> <i>katG + inhA + ahpC</i>	23 (22,8)	1 (1,1)	$< 0,0001$
<i>inhA</i>	9 (8,9)	20 (21,1)	0,0191
Всего	64 (63,4)	51 (53,7)	0,1562

katG + inhA – у 18 (17,8%), *katG + ahpC* – у 2 (1,9%), *katG + inhA + ahpC* – у 3 (2,9%) по сравнению с группой 2 – 1 (1,1%) *katG + inhA*, $p < 0,0001$. По данным литературы [6, 10], сочетание мутаций в генах *katG + inhA* имеет кумулятивный эффект и приводит к повышению уровня устойчивости к INH. Изолированных мутаций в гене *ahpC* в обеих группах не выявлено. Спектр установленных мутаций в генах *katG*, *inhA*, *ahpC* представлен в табл. 2. Из всех обнаруженных мутаций, кодирующих устойчивость к INH, наиболее часто в обеих группах встречались мутации в гене *katG* ser315- > Thr1, которые являются неблагоприятными, так как сопряжены с высоким уровнем ЛУ к INH, а также обладают наибольшим потенциалом широкого распространения в качестве изолятов МЛУ. Данный вид мутаций был зарегистрирован у 35 (34,7%) пациентов группы 1 и у 21 (22,1%) пациента группы 2, $p = 0,0457$.

Мутации в гене *rpoB*, кодирующие ЛУ к Rif, обнаружены в группе 1 у 51 (50,5%) пациента и у 45 (47,4%) больных группы 2, $p = 0,5762$. Однако в группе 1 чаще встречались множественные мутации в гене *rpoB* (от 2 до 4) – у 14 (13,9%) по сравнению с группой 2 – 5 (5,3%), $p = 0,0341$. Данные представлены в табл. 3. Спектр основных мутаций в гене *rpoB*, выявленный в обеих группах, приведен в табл. 4. Среди устойчивых к рифампицину штаммов МБТ обеих групп доминирующим видом мутаций являлась мутация Ser531- > Leu. Данный вид мутации представляет наибольший интерес, так как имеются научные работы, указывающие, что мутация Ser531- > 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*. Мутации одновременно в генах,

Таблица 2

Спектр мутаций в генах *katG*, *inhA*, *ahpC*, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду, у городских и сельских жителей

Мутации в генах	Группа 1 (n = 101) абс. (%)	Группа 2 (n = 95) абс. (%)	p
1. <i>katG</i>	55 (54,5)	30 (31,6)	0,0014
1.1 ser 315- > Thr1	35 (34,7)	21 (22,1)	0,0457
1.2 ser 315- > Arg1	9 (8,9)	7 (7,4)	0,8023
1.3 ser 315- > Gly1	5 (4,9)	2 (2,1)	0,4153
1.4 редкие виды	6 (5,9)	0	
2. <i>inhA</i>	30 (29,7)	20 (21)	0,1984
2.1. <i>inhA</i> -T15	17 (16,8)	11 (11,6)	0,3227
2.2. <i>inhA</i> -A8	3 (2,9)	2 (2,1)	0,6555
2.3. <i>inhA</i> -G16	2 (1,9)	2 (2,1)	0,5636
2.4. редкие виды	8 (7,9)	5 (5,2)	0,3971
3. <i>ahpC</i>	5 (4,95)	0	

Таблица 3

Сравнительная распространенность одиночных и комбинированных мутаций в гене *rpoB* у городских и сельских жителей

Мутации в гене <i>rpoB</i>	Группа 1 (n = 101) абс. (%)	Группа 2 (n = 95) абс. (%)	p
Одиночные	37 (36,6)	40 (42,1)	0,4749
Множественные (от 2 до 4)	14 (13,9)	5 (5,3)	0,0341
Всего	51 (50,5)	45 (47,4)	0,5762

Таблица 4

Распространенность наиболее часто встречающихся видов мутаций в гене *rpoB* у городских и сельских жителей

Виды мутаций	Группа 1 (n = 101) абс. (%)	Группа 2 (n = 95) абс. (%)	p
Ser531- > Leu	27 (26,7)	16 (16,8)	0,0936
His526- > Leu	6 (5,9)	3 (3,2)	0,3149
Leu511- > Pro	3 (2,9)	1 (1,1)	0,3224
Leu511- > Arg	6 (5,9)	3 (3,2)	0,3149

кодирующих ЛУ к INH и Rif (МЛУ), обнаружены у 39 (38,6%) пациентов группы 1 и 22 (23,2%) человек группы 2, $p = 0,0166$.

Выводы

1. У пациентов с активным, преимущественно впервые выявленным туберкулезом легких, постоянных жителей городов Саратовской области, методом биологических микрочипов выявлен достоверно более высокий уровень МЛУ – 38,6% – по сравнению с пациентами из сельской местности – 23,2%, $p = 0,0166$.

2. Среди клинических изолятов МБТ, полученных от пациентов, постоянно проживающих в городах Саратовской области, зарегистрирован и более неблагоприятный спектр генетических мутаций, кодирующих ЛУ к INH. У пациентов этой категории выявлены большее количество штаммов МБТ, имеющих мутации в гене *katG* (54,5% против 32,6%), преобладание сочетанных мутаций в двух и трех генах одновременно (22,8% против 1,1%), преобладание мутаций *ser315- > Thr 1* (34,7% против 22,1%) по сравнению с больными из сельской местности.

3. Неблагоприятный спектр мутаций МБТ среди жителей городов был также установлен и в гене *groV*, кодирующим ЛУ к Rif, у них достоверно чаще регистрировались множественные (от 2 до 4) мутации – 13,9% против 5,3% по сравнению с пациентами из сельской местности, $p = 0,0341$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коровкин В. С. Молекулярные основы лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза // Мед. новости. – 2003. – № 9. – С. 8-13.
2. Нечаева О. Б. Мониторинг и оценка изменений эпидемиологических показателей по туберкулезу в Российской Федерации // Туб. – 2012. – № 8. – С. 15-22.
3. Степаншин Ю. Г., Степаншина В. Н., Шемякин И. Г. Молекулярные механизмы устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам // Антибиот. и химиотерап. – 1999. – № 4. – С. 39-43.
4. Abubakar I., Zignol M., Falzon D. et al. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership // Lancet Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13, Issue 6. – P. 529-539.
5. Acosta C. D., Dadu A., Ramsay A., Dara M. Drug-resistant tuberculosis in Eastern Europe: challenges and ways forward // Intern. Union Against Tuberculosis and Lung Disease. – 2014. – Vol. 4, suppl. 2 – P. 3-12.
6. Heym B., Alzari P. M., Honore N. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Mol. Microbiol. – 1995. – Vol. 15. – P. 235-245.

7. Luo T., Zhao M., Li X. et al. Selection of Mutations to detect multidrug-resistant *mycobacterium tuberculosis* Strains in Shaghai, China // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54, № 3. – P. 1075-1081.
8. Telenti A., Imboden P., Marchesi F. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* // Lancet. – 1993. – Vol. 341. – P. 647-650.
9. Vareldzis B. P., Grosset J., de Kantor I. et al. Drug-resistant tuberculosis laboratory issues. World Health Organization recommendations // Tubercle Lung Dis. – 1994. – Vol. 75. – P. 1-7.
10. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13. – P. 1320-1330.

REFERENCES

1. Korovyakin V.S. Molecular basis of drug resistance of tuberculous mycobacteria. *Med. Novosti*. 2003, no. 9, pp. 8-13. (In Russ.)
2. Nechaeva O.B. Monitoring and evaluation of changes in tuberculosis epidemiological rates in the Russian Federation. *Tub.*, 2012, no. 8, pp. 15-22. (In Russ.)
3. Stepanshin Yu.G., Stepanshina V.N., Shemyakin I.G. Molecular mechanisms of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiot. i Khimioterap.*, 1999, no. 4, pp. 39-43. (In Russ.)
4. Abubakar I., Zignol M., Falzon D. et al. Drug-resistant tuberculosis: time for visionary political leadership. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, vol. 13, issue 6, pp. 529-539.
5. Acosta C.D., Dadu A., Ramsay A., Dara M. Drug-resistant tuberculosis in Eastern Europe: challenges and ways forward. *Intern. Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, 2014, vol. 4, suppl. 2, pp. 3-12.
6. Heym B., Alzari P.M., Honore N. Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 15, pp. 235-245.
7. Luo T., Zhao M., Li X. et al. Selection of Mutations to detect multidrug-resistant *mycobacterium tuberculosis* Strains in Shaghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, vol. 54, no. 3, pp. 1075-1081.
8. Telenti A., Imboden P., Marchesi F. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 1993, vol. 341, pp. 647-650.
9. Vareldzis B.P., Grosset J., de Kantor I. et al. Drug-resistant tuberculosis laboratory issues. World Health Organization recommendations. *Tubercle Lung Dis.*, 1994, vol. 75, pp. 1-7.
10. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2009, vol. 13, pp. 1320-1330.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Салина Татьяна Юрьевна

ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского» Минздрава России, доктор медицинских наук, доцент.

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

E-mail: medunic@sgmu.ru

Поступила 10.11.2014

КОМБИНИРОВАННЫЕ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ПРОИЗВОДСТВА ОАО «АКРИХИН»

ИЗОКОМБ®

1 таблетка Изокомб® содержит:

Изониазид	60 мг
Рифампицин	120 мг
Пиразинамид	300 мг
Этамбутола гидрохлорид	225 мг
Пиридоксина гидрохлорид	20 мг



ФТИЗОПИРАМ® В6

1 таблетка Фтизопирам® В6 содержит:

Изониазид	150 мг
Пиразинамид	500 мг
Пиридоксина гидрохлорид	15 мг

ФТИЗОЭТАМ® В6

1 таблетка Фтизоэтам® В6 содержит:

Изониазид	150 мг
Этамбутола гидрохлорид	400 мг
Пиридоксина гидрохлорид	15 мг



NB!

В состав препаратов входит пиридоксина гидрохлорид!
Пиридоксина гидрохлорид – витаминное средство, участвует в обмене веществ, снижает риск развития токсического действия противотуберкулезных препаратов на центральную и периферическую нервные системы.