

УДК 616-002.5-078:579-036.2

**КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ****Т.Ю. Салина¹, Т.И. Морозова²**, ¹Саратовский областной клинический противотуберкулезный диспансер,
²ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет»*Салина Татьяна Юрьевна – e-mail: SalinaTU@rambler.ru*

С целью повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулеза проводилось изучение лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза (МБТ) к изониазиду, рифампицину и фторхинолонам с помощью биологических микрочипов. Обследовано 211 больных туберкулезом легких, из них за периоды 2006–2008 гг. – 72 и в 2009–2010 гг. – 139 человек. Метод биочипов разработан сотрудниками института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва). Установлено, уменьшение МЛУ МБТ в 2009–2010 гг. до 29% против 38,9% в предыдущие годы. Спектр генетических мутаций ДНК МБТ, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду, не изменился. Так, в 2006–2008 гг. мутации в гене *kat G* встречались у 74,4%, в гене *inhA* – у 39,5%, в гене *ahpS* – у 4,7% пациентов против 79,3%, 27,6% и 6,9% соответственно в 2009–2010 гг. Однако наблюдалось расширение спектра мутаций в гене *ropB*, кодирующих лекарственную устойчивость к рифампицину, что, вероятно, приведет к дальнейшему росту рифампицин-устойчивых штаммов. Не получено достоверных различий в спектре генетических мутаций МБТ у пациентов с тяжелыми, прогрессирующими формами туберкулеза по сравнению с пациентами с ограниченным и благоприятно протекающим туберкулезом.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), ТВ-биочип.

To improvement the effectiveness of microbiological diagnosis of tuberculosis was conducted study the drug sensitivity of Mycobacterium tuberculosis (MBT) to isoniazid, rifampicin and fluoroquinolones using the method of biological microchips. Investigated 211 patients with pulmonary tuberculosis (TB), of the periods 2006-2008 - 72, of the periods 2009-2010 - 139 people. The method of biological microchips developed by employees of the Institute of Molecular Biology behalf of the V.A. Engelhardt, RAS (Moscow). It was revealed reduction MDR MBT in 2009-2010 to 29% versus 38,9% in previous years. Spectrum of genetic mutations in the DNA of Mycobacterium tuberculosis, which determines resistance to isoniazid not changed. In 2006-2008, the mutations in *kat G* gene were found in 74,4%, in *inhA* gene in 39,5%, in the gene *ahpS* in 4,7% of cases vs. 79,3%, 27,6%, and 6,9% respectively in 2009-2010 years. However, the observed expansion of the range of mutations in the gene *ropB*, which determines drug resistance to rifampicin, what is likely to lead to further growth of rifampin-resistant strains. Not received significant difference in the spectrum of genetic mutations DNA MBT in patients with severe forms of tuberculosis compared to patients with limited and favorable tuberculosis forms.

Key words: Mycobacterium tuberculosis, multidrug resistance (MDR), TB-biochip.

Туберкулез легких – одна из острых медицинских и социально-экономических проблем как в России, так и во всем мире. Особенно неблагоприятной тенденцией в эпидемиологии туберкулеза в последние годы является рост больных, выделяющих микобактерии туберкулеза (МБТ) с множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) [1]. За период с 1999 по 2008 г. частота регистрации МЛУ туберкулеза выросла с 6,7 до 10,7% в группе впервые выявленных больных [1]. Формы туберкулеза с МЛУ

и ШЛУ отличаются тяжелым течением, низкой эффективностью проводимой терапии и высокой летальностью. Такие пациенты на протяжении длительного времени являются эпидемиологически наиболее опасными, способствуя распространению инфекции. В настоящее время методами молекулярной генетики было доказано, что в основе лекарственной устойчивости МБТ лежат мутации, детерминирующие устойчивость клинических штаммов *M. tuberculosis* к антибиотикам [2, 3, 4, 5]. При неправильно подобранной

комбинации химиопрепаратов происходит селекция антибиотикоустойчивых штаммов и их преимущественный рост, что ведет к распространению лекарственно-устойчивого туберкулеза [6, 8]. Существующие традиционные методы микробиологической диагностики туберкулеза и определения лекарственной устойчивости отличаются недостаточной чувствительностью и долговременностью получения результатов (более 3 месяцев). Быстрое определение лекарственной устойчивости МБТ стало возможным после разработки высокотехнологичного метода определения генных вариантов на биологических микрочипах [7]. Разработка и внедрение в работу противотуберкулезных учреждений ускоренных методов определения лекарственной чувствительности МБТ является решающим фактором для выбора оптимальной химиотерапии, прогноза и своевременной коррекции лечения [8, 9], что представляет собой актуальную проблему фтизиатрии.

Цель исследования: повышение эффективности микробиологической диагностики туберкулеза на основе оценки характера мутаций ДНК *M. tuberculosis* с помощью метода биологических микрочипов. Для реализации цели были поставлены следующие задачи: 1. определить частоту МЛУ и спектр генетических мутаций *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Саратовской области в последние годы; 2. изучить динамику спектра генетических мутаций *M. tuberculosis* за период 2006–2008 и 2009–2010 гг. и оценить их эпидемиологическое значение; 3. проанализировать спектр генетических мутаций *M. tuberculosis* у больных с разным типом течения туберкулезного процесса и оценить их клиническое значение.

Материалы и методы

Для решения первой задачи обследовано 139 больных активным впервые выявленным туберкулезом легких, находившихся на стационарном лечении в Саратовском областном клиническом противотуберкулезном диспансере (СОКПТД) в 2009–2010 гг. Из них мужчин было 87 (62,6%), женщин – 52 (37,4%) человека, в возрасте от 18 до 70 лет. Клинические формы туберкулеза представлены преимущественно инфильтративным – 104 (74,8%) и диссеминированным туберкулезом – 23 (16,6%) человека. Другие формы туберкулеза наблюдались в единичных случаях (казеозная пневмония – у 2 (1,4%) человек, фиброзно-кавернозный туберкулез легких – у 2 (1,4%), туберкулемы – у 8 (5,8%) пациентов). У 89 (64%) больных наблюдалось бактериовыделение, у 101 (72,7%) – деструктивные изменения в легких. Для решения второй задачи проводилось сравнение результатов обследования вышеуказанных пациентов с обследованием 72 больных активным впервые выявленным туберкулезом легких, получавших стационарное лечение в СОКПТД в предыдущие годы (2006–2008 гг.). Распределение больных по полу, возрасту и клиническим формам туберкулеза было аналогичным. Для реализации третьей задачи из всех ранее обследованных пациентов (2006–2010 гг.) выделено 117 больных (39 женщин, 78 мужчин) с наиболее различающимся характером течения туберкулезного процесса. Пациенты были распределены на 2 группы. Группу 1 составили 34 больных с тяжелым, распространенным, прогрессирующим и осложненным течением туберкулеза. Из них диссеминированный туберкулез легких диагностирован у 19 (55,9%) человек, казеозная пневмония – у 4 (11,8%),

фиброзно-кавернозный туберкулез – у 5 (14,7%) человек, тяжелый инфильтративный туберкулез – у 6 (17,6%) человек. У всех пациентов этой группы наблюдались осложнения процесса в виде кахексии, легочно-сердечной и дыхательной недостаточности, туберкулеза гортани и бронхов. В группу 2 были включены 83 пациента с ограниченным (1–2 сегмента) туберкулезным процессом с нерезко выраженным интоксикационным и бронхолегочным синдромом, при отсутствии осложнений. Из них инфильтративный туберкулез легких был диагностирован у 71 (85,5%) человека, туберкулемы легких – у 12 (14,5%) человек.

У всех пациентов наряду с традиционными методами микробиологической диагностики туберкулеза выявление микобактерий туберкулезного комплекса, определение их лекарственной чувствительности к рифампицину и изониазиду, а также изучение спектра генетических мутаций ДНК *M. tuberculosis* проводили в образцах мокроты методом биологических микрочипов с использованием набора реагентов «ТВ-BICHIP-I» и дополнительно у 27 пациентов, с установленной методом биочипов МЛУ, проводили определение лекарственной чувствительности МБТ к фторхинолонам с использованием набора реагентов «ТВ-BICHIP-II». Результаты реакции учитывали с помощью специального оборудования, представляющего собой аппаратно-программный комплекс «Чипдетектор-01». Технология проведения исследований, набор реагентов и оборудования разработаны сотрудниками института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (ООО «Биочип-ИМБ», Москва). Базовая методология проведения исследований основана на выделении ДНК микобактерий туберкулеза из мокроты обследуемых пациентов, проведения 2 последовательных мультиплексных ПЦР со специфическими для микобактерий туберкулеза праймерами и гибридизации продуктов амплификации 2-й стадии ПЦР с олигонуклеотидными зондами, помещенными в ячейках микрочипа. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием компьютерных программ Microsoft® Excel для Windows xp® и Statistica на персональном компьютере. Для сравнения достоверности различий в двух группах использовали непараметрический критерий – тест Манна-Уитни. В качестве критического уровня достоверности был принят критерий 0,05.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных исследований ДНК микобактерий туберкулезного комплекса была выделена из мокроты у 93 из 139 (66,9%) пациентов активным впервые выявленным туберкулезом легких. Из них генетические мутации, кодирующие МЛУ, обнаружены у 27 (29%) человек, изолированные мутации, кодирующие устойчивость к изониазиду, установлены у 16 (17,2%) человек, к рифампицину – у 10 (10,8%) пациентов. У больных с выявленной устойчивостью одновременно к изониазиду и рифампицину преобладали мутации в гене *kat G* (ser 315-Thr) – у 18 (66,7%) и *gro B* в гене (ser 531->Leu) – у 13 (48,2%) пациентов. Клинические изоляты *M. tuberculosis*, устойчивые только к изониазиду, характеризовались мутациями в гене *kat G* (ser 315-Thr) значительно реже и зарегистрированы только в 6 (37,5%) случаях ($p=0,0376$). По данным литературы [10, 11] мутация в гене *kat G* (ser 315->Thr 1) представляет наибольший интерес, так как изониазид-устойчивые штаммы с этой мутацией сохраняют

полную вирулентность и обладают наибольшим потенциалом широкого распространения в качестве изолятов МЛУ. При изолированной устойчивости к рифампицину мутации в гене *groV* ser 531 наблюдались только в 4 (40%) образцах мокроты, остальные мутации выявлены в *groV* гене (ser 512, His 526, Gln 513 и другие). Имеются научные работы [5, 8], указывающие на то, что мутации в 531 кодоне *groV* гена наиболее распространены среди устойчивых к рифампицину штаммов МБТ. Мутация ser 531->Leu чаще всего связана с наиболее опасным генотипом МБТ (Beijing) и обуславливает устойчивость к рифампицину высокого уровня [8]. Дополнительно у 27 пациентов с выявленной МЛУ проводилось определение лекарственной устойчивости МБТ к фторхинолонам. Мутации в гене *gyrA*, кодирующие лекарственную устойчивость к фторхинолонам, были обнаружены у 9 (33,3%) человек и представлены преимущественно заменами в 94 и 91 кодонах. У 18 (66,7%) пациентов выявлена лекарственная чувствительность к фторхинолонам, из них у 7 (25,9%) человек зарегистрирован естественный полиморфизм гена *gyrA* (Ser95-Thr), который не приводит к возникновению устойчивости.

Изучение лекарственной устойчивости МБТ в динамике за пятилетний период наблюдения показало, что доля штаммов МБТ с множественной лекарственной устойчивостью в 2009–2010 гг. уменьшилась и составила 29% против 38,9% в 2006–2008 гг. Спектр генетических мутаций ДНК МБТ, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду, практически не изменился. Данные представлены в таблице 1. Как следует из таблицы 1, резистентность к изониазиду преимущественно связана с мутациями в трёх основных генах: *katG*, *inhA*, *ahpC*. Как и в предыдущие годы, наиболее часто встречаются мутации в гене *katG*, кодирующем каталазу-пероксидазу (более чем в 70% клинических изолятов МБТ, устойчивых к изониазиду). Мутации в гене *inhA*, кодирующим редуктазу белка-переносчика еноил-ацильного радикала, встречаются реже (у 27,6% МБТ в 2006–2008 гг. и 39,5% в последние годы), имеется тенденция к нарастанию мутаций в этом гене, однако различия не достоверны. Мутации в гене *ahpC* встречаются в единичных случаях, считается, что они являются компенсаторной реакцией на снижение каталазно-пероксидазной активности, контролируемой генами *katG*, *inhA*.

ТАБЛИЦА 1.

Динамика спектра генетических мутаций изониазид-устойчивых штаммов M. tuberculosis за период 2006–2010 гг.

Мутации гена	Периоды наблюдения 2006-2008 гг. (абс./%) (n=29)	Период наблюдения 2009-2010 гг. (абс./%) (n=43)	p
<i>katG</i>	23 (79,3)	32 (74,4)	0,6478
<i>inhA</i>	8 (27,6)	17 (39,5)	0,368
<i>ahpC</i>	2 (6,9)	2 (4,7)	0,7137

Примечание: у некоторых пациентов наблюдалась комбинация нескольких видов мутаций.

В отличие от преимущественно стабильной картины генетических мутаций к изониазиду, в последние годы наблюдается тенденция к расширению спектра мутаций в гене *groV*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы МБТ и определяющей лекарственную устойчивость к рифампицину. Данные представлены в таблице 2. Как следует из таблицы, наряду с наиболее часто встречающимися мутациями в

531 кодоне в 55,2% и 48,6% случаев (соответственно), в последние годы достоверно повысилось число мутаций Leu 511->Arg (27,0%) и появились новые виды мутации (Asp516->Glu, Met 515->Ile).

ТАБЛИЦА 2.

Динамика спектра генетических мутаций рифампицин-устойчивых штаммов M. tuberculosis за период 2006–2010 гг.

Мутации в гене <i>groV</i>	Периоды наблюдения 2006-2008 гг. абс./% (n=29)	Периоды наблюдения 2009-2010 гг. абс./% (n=37)	p
Ser 531->Leu	16 (55,2)	18 (48,6)	0,63
Ser 526->Arg	5 (17,3)	1 (2,7)	0,0449
Ser 512->Thr	1 (3,4)	5 (13,5)	0,1659
Gln 513->Leu	5 (17,3)	1 (2,7)	0,04
Leo 533->Pro	1 (3,5)	4 (10,8)	0,2629
Leo 511->Arg	1 (3,5)	10 (20,7)	0,0113
Asp 516->Glu	0	3 (8,1)	
His 526-> Leu	6 (20,7)	7 (18,9)	0,8405
Met 515->Ile	0	2 (5,4)	

Примечание: у некоторых пациентов наблюдалась комбинация нескольких видов мутаций.

ТАБЛИЦА 3.

Характеристика спектра генетических мутаций M. tuberculosis у больных с разным типом течения туберкулезного процесса

Характеристика мутаций M. tuberculosis	Тяжелые прогрессирующие формы туберкулеза (n=34) абс./%	Ограниченные формы туберкулеза без симптомов интоксикации (n=83) абс./%	p
Мутации в генах, кодирующие лекарственную устойчивость к изониазиду			
<i>katG</i>	12 (35,3)	27 (32,5)	0,94
<i>inhA</i>	5 (14,7)	11 (13,3)	0,9378
<i>ahpC</i>	1 (2,9)	1 (1,2)	0,5716
Отсутствие мутаций	16 (47,1)	44 (53,0)	0,5567
Мутации в генах, кодирующие лекарственную устойчивость к рифампицину			
Ser 531->Leu	8 (23,5)	21 (25,3)	0,9095
Leo 511->Arg	6 (17,7)	8 (9,6)	0,2075
Gln 513->Leu	2 (5,9)	2 (2,4)	0,346
His 526->Leu	0	6 (7,2)	
Leo 533->Pro	1 (2,9)	1 (1,2)	0,5189
Ser 512->Arg	1 (2,9)	1 (1,2)	0,5189
Отсутствие мутаций	16 (47,1)	44 (53,0)	0,5567

Примечание: у некоторых пациентов наблюдалась комбинация нескольких видов.

При анализе лекарственной чувствительности МБТ у пациентов с разным типом течения туберкулезного процесса установлено, что у пациентов группы 1 (n=34) с тяжелым, прогрессирующим и осложненным течением туберкулеза МЛУ выявлена у 11 (32,4%) пациентов, изолированная устойчивость к изониазиду – у 7 (20,6%), моноустойчивость к рифампицину не обнаружена ни в одном случае. Чувствительность к изониазиду и рифампицину наблюдалась у 16 (47%) больных. Эти результаты практически не отличались от обследования пациентов группы 2 ($p > 0,005$) за исключением изолированной устойчивости к рифампицину. Так, у пациентов с ограниченным туберкулезным процессом с незначительно выраженными симптомами интоксикации и благоприятным течением процесса (n=83) МЛУ

установлена у 23 (27,7%), устойчивость к изониазиду – у 16 (19,3%) пациентов, моноустойчивость к рифампицину – у 8 (9,6%), чувствительность к изониазиду и рифампицину – у 36 (43,4%) пациентов.

При анализе спектра генетических мутаций ДНК МБТ в обеих группах также существенных различий не получено (таблица 3).

Выводы

1. На территории Саратовской области в 2009–2010 гг. среди впервые выявленных больных преимущественно с бактериовыделением сохраняется высокий уровень МЛУ микобактерий туберкулеза (29%), регистрируемый на уровне генетических мутаций.

2. Среди пациентов с МЛУ микобактерий в 33,3% случаев регистрируется генетическая устойчивость к фторхинолонам, что значительно затрудняет лечение таких пациентов.

3. У больных с выявленной устойчивостью одновременно к изониазиду и рифампицину преобладают мутации в гене *kat G* (ser 315-Thr) – 66,7% и про В гене (ser 531->Leu) – 48,2% пациентов, что является неблагоприятным фактором, так как определяет ЛУ высокого уровня.

4. Доля штаммов *M. tuberculosis* с МЛУ в 2009–2010 гг. уменьшилась до 29% по сравнению с предыдущими годами – 38,9% (в 2006–2008 гг.). Спектр генетических мутаций ДНК МБТ, кодирующих лекарственную устойчивость к изониазиду, за эти годы практически не изменился, однако отмечается расширение спектра мутаций в гене проВ, кодирующем лекарственную устойчивость к рифампицину, что, вероятно, приведет к дальнейшему росту рифампицин-устойчивых штаммов.

5. Не получено достоверных различий в спектре генетических мутаций МБТ у пациентов с разным типом течения туберкулезного процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пузанов В.А., Васильева И.А., Эргешов А.Э. и др. Мониторинг распространенности MDR и XDR-штаммов *M. tuberculosis*. Мат-лы Всерос. науч.-практ. конференции с международ. участием. Под ред. проф. П.К. Яблонского, член-кор. РАМН, проф. Ю.Н. Левашова. 2010 окт. 21-23. С. -Пб.
2. Telenti A. Genetics of drug resistance in tuberculosis. *Clin. Chest Med.* 1997. № 18. P. 55-64.
3. Степаншин Ю.Г., Степаншина В.Н., Шемякин И.Г. Молекулярные механизмы устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к лекарственным препаратам. Антибиотики и химиотерапия. 1999. № 4. С. 39-43.
4. Самойлова А.Г., Марьяндышев А.О. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза - актуальная проблема фтизиатрии (обзор литературы). *Пробл. туб.* 2005. №7. С. 3-8.
5. Исакова Ж.Т., Гончарова З.К., Алдашев А.А. Характеристика спектра лекарственной устойчивости рифампицин - резистентных штаммов *M. tuberculosis* к другим противотуберкулезным препаратам первого ряда. *Пробл. туб.* 2008. № 1. С. 39-41.
6. Мишин В.Ю. Оптимизация лечения впервые выявленных больных туберкулезом легких на основе принципов доказательной медицины. В кн.: Химиотерапия туберкулеза в современных эпидемиологических условиях. М. 2008. С. 53-68.
7. Михайлович В.М., Лапа С.Н., Грядунов Д.А. и др. Использование методов гибридизации и ПЦР на специализированном ТВ микрочипе для обнаружения рифампицин-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. *Бюл. Эксп. Биол.* 2001. №1. С. 112-117.
8. Руководство по легочному и внелегочному туберкулезу. Под ред. Ю.Н. Левашова, Ю.М. Репина. СПб.: ЭЛБИ, 2006. 544 с.
9. Лиманская О.Ю., Мухина Т.Н., Степаншина В.Н. Детекция изолятов дикого типа и устойчивых к изониазиду микобактерий туберкулеза. *Туб. и болезни легких.* 2010. № 9. С. 45-50.
10. Saint-Joanis B., Souchon H., Wilming M., Johnsson K., Alzari P.M., Cole S.T. Use of side-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/peroxidase, KatG, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* 1999. № 338. P. 753-760.
11. Wengenack N.L., Uhl J.R., St. Amand A.L. et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis kat G*(S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. *J. Infect. Dis.* 1997. № 176. P. 722-727.