

В.В. НИКОЛАЕВСКИЙ^{1,2},
Ф.А. ДРОБНИЕВСКИ (F.A. DROBNIIEWSKI)²,
Ю.И. БАЖОРА¹

¹ Одесский государственный медицинский университет,
Валиховский переулок 2, Одесса, 65026, Украина

² Референс-лаборатория и Отделение инфекционных болезней
Королевского колледжа, Лондон, Великобритания
HRA Mycobacterium Reference Unit, King's College Hospital (Dulwich),
East Dulwich Grove, SE22 8QF London UK

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, ВЫДЕЛЕННЫХ В ЮЖНОМ РЕГИОНЕ УКРАИНЫ



Представлены результаты молекулярно-генетического анализа штаммов Mycobacterium tuberculosis, выделенных от больных в Одесской и Николаевской областях Украины. Впервые исследована распространенность отдельных типов мутаций в генах, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду, получены данные о распространенности штаммов семейства Beijing на Юге Украины.

© В.В. НИКОЛАЕВСКИЙ, Ф.А. ДРОБНИЕВСКИ
(F.A. DROBNIIEWSKI), Ю.И. БАЖОРА, 2004

Введение. Туберкулез в настоящее время является проблемой всемирного масштаба. Ежегодно в мире регистрируется более 8 млн новых случаев этого заболевания, 2 млн человек ежегодно гибнут от туберкулеза [1]. Начиная с 90-х годов прошлого столетия наблюдается резкое возрастание заболеваемости туберкулезом в большинстве стран СНГ, включая Украину и Россию. В Украине за последние 10 лет заболеваемость возросла в более чем 2 раза, составив в 2001 г. 68,6 на 100 000 населения [2].

Одной из важнейших в диагностике и лечении туберкулеза является проблема лекарственной резистентности. Особого внимания заслуживают мультирезистентные штаммы *M. tuberculosis*, устойчивые по меньшей мере к двум важнейшим противотуберкулезным препаратам — изониазиду и рифампицину. Эффективность лечения туберкулеза, вызванного мультирезистентными штаммами, остается невысокой, при этом значительно возрастают экономические и временные затраты [3–5]. Наибольшую тревогу вызывает одновременное распространение эпидемии ВИЧ/СПИД в Украине. Известно, что непосредственной причиной более одной трети всех смертей от ВИЧ-инфекции является туберкулез [6]. Во всем мире около 3 % всех новых случаев туберкулеза вызваны мультирезистентными штаммами, при этом наиболее высокие уровни мультирезистентности среди штаммов, которые выделены от больных, ранее не лечившихся от туберкулеза, зарегистрированы в Китае (11 %) и ряде стран Восточной Европы, в том числе России и странах Балтии (от 7 до 14 % и более) [7, 8].

Во многих случаях в регионах с высокими уровнями первичной мультирезистентности было обнаружено превалирование штаммов *M. tuberculosis* семейства Beijing. Циркуляция штаммов указанного семейства была обнаружена в Китае, других странах Азии и ряде регионов России (Архангельская, Самарская, Ленинградская области). Имеются данные о выраженной ассоциации между принадлежностью штаммов к семейству Beijing и высокими уровнями первичной лекарственной устойчивости [9, 10].

Украина по ряду причин не имеет официальных данных относительно лекарственной устойчивости штаммов микобактерий, циркулирующих на ее территории [3]. Немногочис-

ленные к настоящему времени данные литературы свидетельствуют о достаточно высоких уровнях резистентности возбудителя туберкулеза к противотуберкулезным препаратам [11]. Информация по молекулярной эпидемиологии штаммов, выделяемых от пациентов, на территории Украины в настоящее время отсутствует.

Выявление механизмов действия большинства противотуберкулезных препаратов на молекулярном уровне и идентификация мутаций в генах, ответственных за развитие лекарственной устойчивости у микобактерий, сделало эффективным применение молекулярно-генетических методов для диагностики лекарственной устойчивости микобактерий. В последнее время благодаря высокой эффективности, скорости, чувствительности и специфичности наибольшее распространение получили методы, основанные на идентификации мутаций путем амплификации фрагментов генов с последующей гибридизацией с олигонуклеотидными зондами [12, 13]. Для исследовательских целей, особенно в странах с высокими уровнями заболеваемости и лекарственной устойчивости, успешно применяются некоммерческие тест-системы, основанные на принципах обратной гибридизации [9, 14]. Применение систем, выявляющих мутации в генах *rpoB*, *katG* и *inhA*, позволяет выявить более 90 % всех устойчивых к рифампицину и изониазиду штаммов. Для выявления принадлежности штаммов к семейству Beijing наиболее эффективным и простым подходом является сполиготипирование, основанное на изучении количества спейсеров в регионе прямых повторов генома *M. tuberculosis* [15].

Цель работы — выявление мутаций в генах, ассоциированных с развитием устойчивости к рифампицину и изониазиду, и изучение распространенности штаммов семейства Beijing среди изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных в Одесской и Николаевской областях Украины.

Материал и методы. Исследование проводили на материале 110 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов Одесского и Николаевского областных противотуберкулезных диспансеров в 2003 г. В ходе проспективного исследования на каждого пациента заполняли специальную карту с необходимой эпидемиологической информацией.

Культивирование и идентификацию выделенных культур производили в соответствии с действующим Приказом МОЗ Украины № 45 [16]. Микробиологические исследования проводились в бактериологических лабораториях областных противотуберкулезных диспансеров Одессы и Николаева.

Молекулярно-генетические исследования были проведены на базе Национальной Референс-лаборатории по диагностике туберкулеза Королевского колледжа (Лондон, Великобритания). Для выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду и рифампицину, применяли метод обратной гибридизации на нейлоновых мембранах [9]. ДНК метили биотином, для визуализации результатов гибридизации применяли систему стрептавидин—щелочная фосфатаза.

Для получения препаратов ДНК колонию микобактерий, снятую с плотной питательной среды, помещали в 200 мкл раствора TE, суспендировали на вортексе и лизировали путем нагревания при 80 °С, проводили депротеинизацию равным объемом хлороформа, после чего охлаждали во льду. Приготовленный таким образом экстракт ДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР.

Для амплификации фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA*, в которых наиболее вероятны мутации, применяли мультиплексную ПЦР с тремя парами биотин-меченых праймеров, фланкирующих соответствующие участки генов [17]. Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл, в том числе 2 мкл 10-кратного ПЦР-буфера («Bioline», Великобритания), 0,5 ед. Таq-полимеразы («Bioline», Великобритания), по 0,5 мкл каждого из четырех нуклеотидтрифосфатов (2 мМоль, «Bioline», Великобритания), по 20 мкМоль каждого из шести праймеров и 1 мкл препарата ДНК микобактерий, приготовленного в соответствии с вышеописанным способом. Реакция амплификации производилась на амплификаторе Perkin Elmer 9700 по следующей программе: 3 мин 95 °С; 30 циклов: 15 с 95 °С, 30 с 65 °С, 60 с 72 °С; 5 мин 72 °С и хранение при +4 °С. Наличие ПЦР-продуктов проверяли путем электрофореза продуктов амплификации в 2,0%-ном агарозном геле.

Олигонуклеотидные пробы, соответствующие нормальным и мутантным последователь-

ностям указанных генов, наносили на полоски нейлоновой мембраны (Osmonics Inc., США) в определенном порядке (рис. 1). После высушивания при комнатной температуре мембраны облучали УФ-светом в течение 1 мин для образования сшивок между пробами и материалом мембраны, промывали в 0,5^x растворе SSC и высушивали на воздухе.

Гибридизацию продуктов амплификации с пробами, нанесенными на мембраны, проводили в пластиковых пробирках в растворе 5^x SSPE; 0,5 % SDS при температуре +60 °C в течение 20 мин. Затем мембраны двукратно отмывали в растворе 0,4^x SSPE, 0,1 % SDS и однократно — в растворе 0,1 М трис-0,1 М NaCl, pH 7,5 при комнатной температуре. После отмывки мембраны инкубировали 20 мин в растворе блокирующего реагента («Roche», США) с добавлением конъюгата стрептавидин—щелочная фосфатаза («BioGenex», США) в разведении 1:100. После двукратной промывки в буфере 0,1 М трис-0,1 М NaCl, pH 7,5 мембраны инкубировали в растворе NBT-BCIP 0,075 мг/мл в светонепроницаемом контейнере до появления отчетливого изображения в виде точек пурпурно-коричневого цвета. Проявленные мембраны промывали водой и высушивали при комнатной температуре.

Сполиготимирование ДНК микобактерий проводили в соответствии со стандартной методикой [15] с использованием реактивов и мембран фирмы «Isogen» (Нидерланды). Статистическую обработку результатов эпидемиологического анализа и кластеризацию штаммов проводили с помощью компьютерной программы BioNumerics («Applied Maths», Нидерланды).

Результаты исследований и их обсуждение. Бактериологическими методами все исследуемые штаммы микобактерий были идентифицированы как *Mycobacterium tuberculosis*.

При мультиплексной амплификации фрагментов генов *rpoB*, *katG* и *inhA* ПЦР-продукты первоначально были получены для 101 штамма: 53 изолятов из Одесской области (98,1 % исследуемых штаммов) и 48 изолятов из Николаевской области (85,7 % исследуемых штаммов). После очистки ДНК-экстрактов с помощью набора реактивов DNeasy Tissue® Kit («Qiagen», Германия) удалось получить ПЦР-

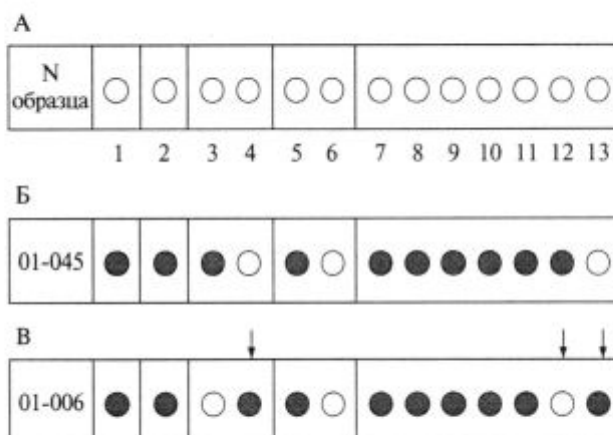


Рис. 1. Порядок расположения зондов на мембране и результаты молекулярно-генетической диагностики лекарственной устойчивости. А — порядок расположения зондов: 1 — индикатор *M. tuberculosis*; 2 — контроль проявления цвета; 3 — ген *katG* кодон 315 норма; 4 — ген *katG* кодон 315 мутация; 5 — ген *inhA* кодон 280 норма; 6 — ген *inhA* кодон 280 мутация; 7 — ген *rpoB* кодоны 511,513,514 норма; 8 — ген *rpoB* кодоны 513, 514, 516 норма; 9 — ген *rpoB* кодоны 513, 514, 516 норма; 10 — ген *rpoB* кодон 516 норма; 11 — ген *rpoB* кодон 526 норма; 12 — ген *rpoB* кодон 531 норма; 13 — ген *rpoB* кодон 531 мутация. Б — результат гибридизации продуктов амплификации ДНК штамма *M. tuberculosis*, чувствительного к рифампицину и изониазиду (без мутаций в соответствующих генах). В — результат гибридизации продуктов амплификации ДНК штамма *M. tuberculosis*, устойчивого к рифампицину и изониазиду (стрелки указывают на наличие мутаций в генах *rpoB* и *katG*)

продукты дополнительно для трех штаммов микобактерий. Таким образом, в общей сложности мультиплексная амплификация была успешной для 94,5 % исследуемых штаммов.

Гибридизация ПЦР-продуктов с ДНК-зондами, иммобилизованными на нейлоновых мембранах, была успешной для всех имеющихся ПЦР-продуктов. Результаты молекулярно-генетической диагностики устойчивости к рифампицину и изониазиду штаммов, выделенных в Одесской и Николаевской областях, представлены в таблице.

При анализе результатов обращает на себя внимание высокая частота встречаемости мутаций в генах, ответственных за развитие устойчивости к изониазиду и рифампицину. Более трети всех исследованных изолятов характеризовались наличием мутаций в генах *katG* и (или) *inhA*, что свидетельствует об их устойчивости к

Показатели устойчивости штаммов *M. tuberculosis* к рифампицину и изониазиду по данным молекулярно-генетической диагностики

Тип устойчивости	Одесская область (n = 54)	Николаевская область (n = 50)
Мутации, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину (ген <i>rpoB</i>)	16 (29,6 %)	14 (28,0 %)
Мутации, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду (гены <i>katG</i> , <i>inhA</i>)	21 (38,9 %)	18 (36,0 %)
Мультирезистентность	15 (27,7 %)	12 (24,0 %)

изониазиду. Несколько меньшей была частота встречаемости мутаций в гене *rpoB* (в среднем 28,8 %), что тем не менее свидетельствует о высоких уровнях устойчивости к рифампицину. Около четверти штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных в Одесской и Николаевской областях, обладали мутациями как в гене *rpoB*, так и в генах *katG* и/или *inhA*, что позволяет сделать вывод об их мультирезистентности. Уровни распространенности мутаций, связанных с развитием лекарственной резистентности, в Одесской и Николаевской областях были в сущности одинаковыми.

Весьма интересным в практическом плане представляется проблема изучения распространенности определенных типов мутаций, свя-

занных с лекарственной устойчивостью. Нами был проведен анализ вклада отдельных типов мутаций в развитие лекарственной устойчивости среди штаммов микобактерий, циркулирующих на территории Одесской и Николаевской областей Украины. Результаты анализа представлены на рис. 2 и 3.

Наиболее распространенными мутациями, обуславливающими резистентность к изониазиду среди изолятов, которые выделены от больных в Одесской и Николаевской областях, были замены нуклеотидов в кодоне 315 гена *katG* (рис. 2). Ими обладали 100 % изониазид-резистентных штаммов из Одесской области и 95,7 % штаммов из Николаевской области. В 22,2 и 21,7 % штаммов из Одесской и Николаевской областей соответственно наличие мутаций в гене *katG* сочеталось с мутациями в гене *inhA*. Лишь один штамм, выделенный от больного в Николаевской области, характеризовался наличием мутации в гене *inhA* без изменений в гене *katG*. В целом спектр мутаций, вовлеченных в развитие резистентности к изониазиду, среди штаммов из Одесской и Николаевской областей был практически одинаков.

Иная картина наблюдалась нами при анализе типов мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину (рис. 3). Более трех четвертей (76,5 %) устойчивых к рифампицину штаммов, выделенных от больных в Одесской области, содержали мутации в кодоне 531 гена

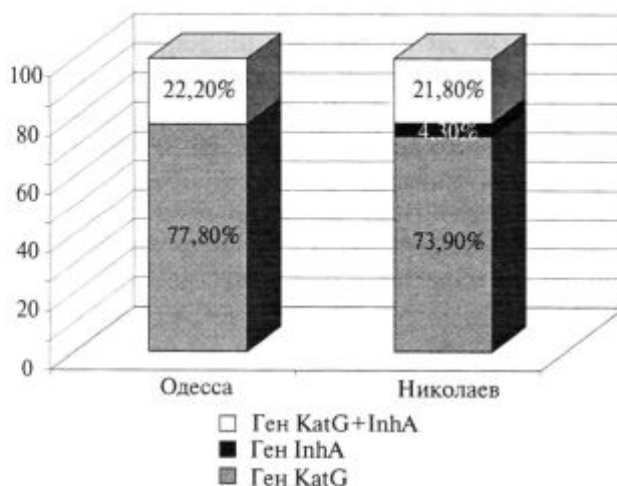


Рис. 2. Распространенность отдельных типов мутаций (по вертикали, %), связанных с устойчивостью к изониазиду



Рис. 3. Распространенность отдельных типов мутаций (по вертикали, %), связанных с устойчивостью к рифампицину (ген *rpoB*)

rpoB, что является характерным для популяций стран СНГ [16, 18]. Менее значительным являлся вклад мутаций в кодонах 526 и 511–514 (17,6 и 5,9 % соответственно). Спектр мутаций в гене *rpoB* среди штаммов, выделенных от больных в Николаевской области, характеризовался более равномерным вкладом различных типов мутаций. Преобладали мутации в кодоне 526 (50,0 %), менее трети составляли мутации в кодоне 531, остальные штаммы содержали мутации в кодонах 511–514 (рис. 3).

Сполиготикирование изолятов *M. tuberculosis* позволило выявить значительное разнообразие генотипов, циркулирующих в Николаевской и Одесской областях Украины. В Одесской области преобладающим оказался генотип, соответствующий семейству Beijing (39,6 %), меньшим количеством изолятов оказались представлены ряд других семейств, в частности Haarlem, A2 и др. Распространенность штаммов семейства Beijing в Николаевской области была меньше, чем в Одесской, в 2,3 раза и составила 17,5 %. Около 20 % генотипов штаммов, циркулирующих в обеих областях, по данным сполитипирования классифицировать не удалось.

Уровни устойчивости к изониазиду и рифампицину в Одесской и Николаевской областях, по данным молекулярно-генетических методов, превышают уровни для г. Киева [11] и достаточно близки к данным, полученным нами в ходе ретроспективного исследования за 2000–2002 гг. (работа в печати). Вместе с тем результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что в Южном регионе Украины уровни распространенности рифампицин- и изониазид-устойчивых штаммов значительно ниже показанных для ряда регионов России, стран Балтии и Китая [7, 9, 18].

Весьма интересными представляются данные анализа вклада отдельных мутаций в развитие лекарственной устойчивости. Картина распространенности мутаций в генах *katG* и *inhA* близка к ранее опубликованной для ряда территорий и характеризуется доминированием мутаций в кодоне 315 гена *katG*. Что касается спектра мутаций, связанных с развитием устойчивости к рифампицину (ген *rpoB*), то он значительно отличается от такового у штаммов, циркулирующих в Центре и Северо-Востоке

России и близок к характеристике устойчивых штаммов из Восточной и Западной Европы, для которых более характерны мутации в кодонах 526 и 514–516 [7, 9, 18, 19].

Данные анализа паттернов резистентности в совокупности с данными сполитипирования позволяют сделать предварительные выводы о степени генетической гетерогенности штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Южном регионе Украины. Отсутствие выраженного доминирования отдельных типов мутаций, относительно низкая распространенность штаммов семейства Beijing и разнообразие сполитипов среди штаммов, выделенных в Одесской и Николаевской областях, весьма резко отличаются от генетической структуры штаммов микобактерий в Центре и Северо-Востоке России, для которых характерно доминирование мутаций в кодоне 531 гена *rpoB* и штаммов семейства Beijing (более 70 %) [9, 18]. На основании наших данных можно сделать вывод о циркуляции разнообразных клонов микобактерий на территории Юга Украины.

Выводы. Применение молекулярно-генетических методов диагностики лекарственной устойчивости в совокупности с методами молекулярной эпидемиологии позволило впервые получить данные о распространенности мутаций, которые ответственны за развитие лекарственной устойчивости среди штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Одесской и Николаевской областей Украины, что является весьма важным для создания новых либо адаптации существующих тест-систем для экспресс-диагностики лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза. Полученные предварительные данные о распространенности штаммов семейства Beijing, ассоциированных с высокими уровнями лекарственной устойчивости, являются существенным этапом программы создания баз данных генотипов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Украине на основании различных молекулярно-эпидемиологических методов с последующей интеграцией их в международные базы данных.

Исследование частично финансировалось Департаментом международного развития Великобритании (грант CNTR0034).

SUMMARY. Results of molecular-genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients of Odessa and Nikolaev regions of Ukraine are represented. Occurrence of individual types of mutations in genes associated with rifampicin and isoniazid resistance has been studied for the first time. Data concerning prevalence of Beijing strains in the South of Ukraine are obtained.

РЕЗЮМЕ. Представлено результати молекулярно-генетичної діагностики стійкості штамів *Mycobacterium tuberculosis*, що були виділені у Одеській та Миколаївській областях України, до рифампіцину та ізоніазиду, а також результати молекулярно-епідеміологічного аналізу методом споліготипуювання. Рівні резистентності до рифампіцину, ізоніазиду та мультирезистентності склали у середньому 28,8; 37,5 та 25,9 % відповідно. Розповсюдженість штамів родини Beijing склала 39,6 і 17,5 % для Одеської та Миколаївської областей відповідно. Аналіз розповсюдженості окремих типів мутацій та дані молекулярно-епідеміологічних досліджень дозволяють зробити висновок про значну гетерогенність генотипів штамів *M. tuberculosis*, що циркулюють на Півдні України.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dye C., Scheele S., Dolin P. et al. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring project // JAMA. — 1999. — 282. — P. 677–686
2. Феценко Ю.И. Ситуация с туберкулезом в Украине // Доктор. — 2002. — № 4. — С. 11–14
3. Феценко Ю.И., Петренко В.М., Черенько С.О. та ін. Епідеміологія, діагностика та лікування хіміорезистентного туберкульозу органів дихання // Укр. пульмонолог. журн. — 2002. — № 4. — С. 5–12
4. Феценко Ю.И., Петренко В.М., Черенько С.О. Ефективність хіміотерапії хворих з полірезистентним туберкульозом легень // Укр. пульмонолог. журн. — 2000. — № 1. — С. 9–14
5. World Health Organization, International Union Against Tuberculosis. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. — Geneva, 2000.
6. Colebunders R., Lambert M.L. Management of coinfection with HIV and TB // Brit. Med. J. — 2002. — 324. — P. 802–803.
7. Espinal M.A. The global situation of MDR-TB // Tuberculosis. — 2003. — 83. — P. 44–51.
8. Yue J., Shi W., Xie J. et al. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China // J. Clin. Microbiol. — 2003. — 41. — P. 2209–2212.
9. Drobniowski F.A., Balabanova Y.M., Ruddy M. et al. Rifampin- and Multidrug-resistant tuberculosis in Russian civilians and prison inmates: dominance of the Beijing strain family // Emerg. Infect. Dis. — 2002. — 8. — P. 1320–1326.
10. Toungoussova O.S., Sandven P., Mariandyshv A.O. et al. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia // J. Clin. Microbiol. — 2002. — 40. — P. 1930–1937.
11. Журило О.А., Турченко Л.В., Клименко М.Т. та ін. Ситуация з мультирезистентного та полірезистентного туберкульозу в м. Києві // Укр. пульмонолог. журн. — 2002. — № 3. — С. 36–39.
12. Николаевский В.В., Бажора Ю.И. Выявление лекарственной устойчивости микобактерий молекулярно-генетическими методами // Буковин. мед. вісн. — 2003. — 3. — С. 137–144.
13. Drobniowski F.A., Caws M., Gibson A., Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis // Lancet Inf. Dis. — 2003. — 3. — P. 141–147.
14. Van Rie A., Warren R., Mshanga I. et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community // J. Clin. Microbiol. — 2001. — 39. — P. 636–641.
15. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // J. Clin. Microbiol. — 1997. — 35. — P. 907–914.
16. Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002 «Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції» (складена під керівництвом Феценко Ю.И., Журило О.А., Клименко М.Т. та ін.) // Зб. норм.-директ. документів з охорони здоров'я. — 2002. — № 2. — С. 63–111.
17. Drobniowski F.A., Nikolayevskyy V.V., Brown T.J. et al. Detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from Samara region (Central Russia) // Clin. Microbiol. Inf. — 2003. — 9, № 1. — P. 93.
18. Mokrousov I., Filliol I., Legrand E. et al. Molecular characterization of MDR *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia and analysis of rifampin resistance using RNA/RNA mismatch analysis as compared to the line probe assay and *rpoB* gene sequencing // Res. Microbiol. — 2002. — 153. — P. 212–219.
19. Bartfal Z., Somoskovi A., Kodmon C. et al. Molecular Characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay // Clin. Microbiol. — 2001. — 39. — P. 3736–3739.

Поступила 10.02.04