

Характеристика лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом и молекулярные характеристики мутаций в гене *gyrA*

1 Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь

2 Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь и Arak Medical University, Иран

3 ГУ научно-исследовательский институт пульмонологии и фтизиатрии министерства здравоохранения, Республика Беларусь

По результатам (Впервые в Республике Беларусь) установлено, что из 140 изолятов, устойчивых к изониазиду и рифампицину (включая 109 MDR и 31 XDR) 73(48%) принадлежали к генетической группе 1, 51 (33%) – к группе 2 и 28 (18%)– к группе 3. Демографическая характеристика 934 пациентов с туберкулезом в отношении к микобактериальной лекарственной устойчивости. ТБ значительно чаще болели мужчины – их среди обследованных было 70,7%, в то время как женщин – 29,3% (274 человека). У 54 пациентов (5,78% от числа всех обследованных) диагностировался XDR- ТБ. 72,22% в этой группе составляли мужчины. Наибольшее количество пациентов имели возраст 25-44 года. Детей в группе с XDR- ТБ не было.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, Секвенирование, *gyrA* ген

Characteristics of Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculosis patients and detection of mutations in *gyrA* gene

L.P. Titov 1, M. Setareh2, L.K. Surkova3

1 Belarusian Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Belarus.

2 Belarusian State medical University, Belarus and Arak Medical Univ., IRAN

3 Research Institute of pulmonology and tuberculosis, Belarus

As our results, from 140 clinical isolates of *M. tuberculosis* resistant to Isoniazid and Rifampicin (109 MDR and 31 XDR), 73 (48%) were belonged to Principle Genetic Groups 1, 51 (33%) to PGG 2 and 28 (18%) to PGG 3. Demographic characteristic of 934 samples from pulmonary TB patients were revealed that 248 were sensitive to all drugs (26.5%) and 72 had Mono resistance(7.7%). In total, 290 had MDR (60%) and 54 had XDR (5.78%). Among all patients, 3% were 65; male to female ratio was 1:2.4 overall and peaked in the 45-54 age group (give value). Males were significantly more likely to have MDR females. All cases with XDR were older than 14 years.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, sequencing, detection, *gyrA* gene

Значимость ТБ для человеческого общества огромна. Возбудитель заболевания – МБТ – произошел от микроорганизма-предшественника предположительно около 15000 лет назад [1] и определяет большее число смертей, чем любой другой отдельно взятый патогенный микроорганизм. Ежегодно регистрируется более 8 миллионов новых случаев ТБ и 1,7 миллиона летальных исходов [2-5]. На долю ТБ приходится 2,5% общей заболеваемости [3-4].

В мире каждый третий человек инфицирован МБТ – всего около двух миллиардов. Количество людей, инфицированных МБТ увеличивается ежесекундно, поскольку больной активным ТБ, оставаясь без лечения, ежегодно способен инфицировать в среднем от 10 до 15 других людей [8-11].

Несмотря на то, что эффективные лекарства для лечения ТБ существуют уже более 50 лет, до сих пор каждые 15 секунд кто-то в мире умирает от этого заболевания. Установлено, что 95% всех случаев ТБ и 99% летальных исходов от него приходится на развивающиеся страны по причине высокой стоимости лечения и его недоступности для большинства бедного населения [9-13].

В Европе ежегодно ТБ заболевают 445000 и умирают от него 66000 человек, то есть каждый час – 50 и 8 человек, соответственно. Среди упомянутых случаев 75% приходится на страны Восточной Европы[16,4].

Известно, что некоторые гены МБТ ассоциированы с лекарственной резистентностью, например: *groV* – к рифампицину, *katG*, *inhA*, *oxyR*, *ahpC*, *kasA* – к изониазиду, *gprL* – к стрептомицину, *gyrA* – к фторхинолонам, *rncA* – к . Так, причиной резистентности к ПТП,] 33, 66[пиразинамиду, *embB* – к этамбутолу включая рифампицин и изоназид, являются мутации в генах *groV* и *katG* [14].

Изониазид (гидразид изоникотиновой кислоты) является одним из наиболее эффективных антимикробных препаратов, доступных для лечения ТБ. Чувствительность к изониазиду обусловлена образованием МБТ H37Rv каталазы-пероксидазы, кодируемым геном *katG*. Мутации в соответствующем локусе гена *katG* МБТ обуславливают большинство случаев резистентности к изониазиду. Наибольшая частота мутаций в гене *katG* МБТ отмечается в кодоне 315 [3-5].

Риск развития мутаций, приводящих к лекарственной резистентности, 10^{-8} для 10^{-9} на одно деление клетки для рифампицина, $2,56 \times 10^{-7}$ для этамбутола. Риск 10^{-8} для стрептомицина; $1,0 \times 10^{-8}$ для изониазида; $2,29 \times 10^{-8}$ одновременного развития резистентности к двум препаратам составляет менее 10^{-15} [6-9].

Гендерные различия в пораженности *M.tuberculosis* в странах мира. Термин «пол», в данном случае, подразумевает те особенности мужчин и женщин, которые обусловлены как биологически детерминированными, так и социально-экономическими факторами.

Соотношение частоты случаев инфицирования МБТ среди мужчин и среди женщин (из числа официально зарегистрированных случаев, информация о которых поступала в ВОЗ) в 2005 году в Восточной Европе составила 2:1,4 [13-16].

Изучение половозрастного состава зарегистрированных в Иране больных ТБ выявило, что в возрастной группе 45-54 года заболеваемость составила около 10 на 100000 населения, без заметных различий между мужчинами и женщинами (1:1). В то же время, в Беларуси, в той же возрастной группе заболеваемость составила среди мужчин 37 на 100000, а среди женщин - 10 на 100000. Это позволяет утверждать, что среди пациентов с ТБ в Беларуси, в отличие от Ирана, преобладают мужчины [16].

Более высокая частота регистрации ТБ среди мужчин может в определенной степени отражать эпидемиологические различия: разницу в длительности воздействия, степени риска инфицирования и скорости прогрессирования от инфицирования до заболевания [16].

В регионах, где заболеваемость ТБ оставалась стабильной в течение многих лет или даже прогрессировала, среди больных доминировали молодые мужчины, при этом большинство случаев были обусловлены недавним инфицированием или реинфекцией. На фоне же низкой заболеваемости среди пациентов преобладали лица старших возрастных групп, причем причиной большинства случаев являлась реактивация латентной инфекции [15,16].

Таблица 1.4 – Распределение вновь выявленных случаев бактериоскопически-подтвержденного туберкулеза по полу в странах Европы по сравнению со странами СНГ

1.4 Резистентность к фторхинолонам и молекулярные характеристики мутаций в гене *gyrA*

Западная Европа		Восточная Европа		Страны СНГ	
Страны	Соотноше мужчин женщин	Страны	Соотноше мужчин женщин	Страны	Соотноше мужчин женщин
Франция	1,8	Латвия	3,1	Беларусь	4,1
Великобритан	1,6	Литва	2,8	Казахстан	1,7
Германия	1,9	Чехия	3,2	Узбекистан	1,4
Нидерланды	2,4	Польша	2,2	Кыргызстан	1,4
Испания	2,1	Хорватия	2,1	Таджикистан	1,3
Швейцария	1,6	Эстония	2,2	Армения	6,0

Наиболее употребимыми для лечения ТБ фторхинолонами являются ципрофлоксацин и офлоксацин, особенно в случае заражения лекарственно-резистентными штаммами [16].

Основными мишенями хинолонов являются ферменты ДНК-гираза и ДНК-топоизомераза II типа, состоящая из двух А- и двух В-субъединиц, кодируемых генами *gyrA* и *gyrB*, соответственно, а также ДНК-топоизомераза-IV. Известно, что высокая резистентность к фторхинолонам, обнаруженная у лабораторных штаммов *M. tuberculosis* и *M. smegmatis*, является результатом аминокислотных замен в предполагаемой зоне связывания фторхинолонов в генах *gyrA* или *gyrB* [17]. Поскольку в геноме МБТ закодирована только топоизомераза II типа, именно она является единственной мишенью для фторхинолонов у данного микроорганизма [16].

Было доказано, что приобретенная резистентность к фторхинолонам в основном обусловлена мутациями в особых регионах генетических мишеней, детерминирующих устойчивость или активирующих ферменты. Сообщалось, что гены *gyrA* и *gyrB*, кодирующие А- и В-субъединицы в регионах гиразы, детерминирующие резистентность к хинолонам, ассоциированы с резистентностью к фторхинолонам (Huang 2005).

В целях исследования частоты и механизмов развития резистентности к фторхинолонам у МБТ, Takiff в 1994 клонировал и секвенировал дикие типы генов *gyrA* и *gyrB*, кодирующих А и В-субъединицы ДНК-гиразы, соответственно. Мутации в *gyrA* отмечались во всех штаммах, для которых минимальная ингибирующая концентрация (МИК) ципрофлоксацина была более 2 мкг/мл – уровня, предложенного в качестве порогового для определения клинической резистентности. Исследователь обнаружил мутации к ципрофлоксацину в 3 кодонах, которые ассоциировались с резистентностью к фторхинолонам как Ала-90-Вал, Сер-91-Про, Асп-94-(Гис, Гли, Тир, Ала) [17].

Целью настоящего исследования являлось характеристика лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* выделенных от больных туберкулезом, а также определение вероятного возникновения мутаций в промоторе и структурном гене *gyrA* чувствительных, MDR и XDR клинических изолятов *M. tuberculosis*.

Материалы и методы

Объекты исследования; Для проведения микробиологических исследований были отобраны 934 образца мокроты от пациентов с подтвержденным диагнозом ТБ легких из числа больных, направленных в Национальную референс-лабораторию НИИ ПиФ с января 2007 по январь 2008. Среди всех образцов примерно 70% были из Минска и 30% из областных центров (Бреста, Гродно, Гомеля, Могилева и Витебска). Все полученные образцы были исследованы на наличие МБТ и устойчивость к ПТП.

Распространенность ТБ в зависимости от пола и возраста оценивали с учетом результатов определения чувствительности к антибиотикам.

Материалом для проведения микробиологических и молекулярно-биологических исследований являлась мокрота, полученная от 144 пациентов с ТБ легких из различных

регионов Беларуси, а также 5 образцов ДНК МБТ из Ирана, полученных за период с мая 2007 г. по декабрь 2008 г. Два стандартных штамма - H37Rv и академический, а также изолят *M. bovis* были использованы в качестве контроля.

У всех отобранных для исследования пациентов диагноз ТБ был подтвержден данными комплексного обследования, включавшего клинический осмотр с учетом диагностических критериев, рентгенографию органов грудной клетки, туберкулиновую пробу и т.д.

Сбор и дальнейший бактериологический посев мокроты осуществлялся в Национальной референс-лаборатории НИИ ПиФ в 2007-2008 гг.

Питательные среды. Питательные среды с ПТП, для определения устойчивости МБТ к ним, готовили в пробирках со средой Левенштейна-Йенсена (рисунок 1), с добавлением рабочих разведений ПТП:

1. Стрептомицина сульфат (конечная концентрация – 10 мкг/мл).
 2. Изониазид (конечная концентрация – 1 мкг/мл).
 3. Рифампицин (конечная концентрация – 40, 50, 75 и 100 мкг/мл).
 4. Этамбутол (конечная концентрация – 2 мкг/мл).
 5. Канамицина сульфат (конечная концентрация – 30 мкг/мл).
- Этионамид (протионамид) (конечная концентрация – 30 мкг/мл).



Рисунок 1 - Пробирки со средой Левенштейна-Йенсена

Реагент для обработки мокроты. Свежий реагент для обработки мокроты готовили путем смешивания равных количеств 4% NaOH и 2,9% цитрата натрия. На каждые 100 мл получившегося раствора добавляли 0,5 г порошка N-ацетил-L-цистеина. После добавления N-ацетил-L-цистеина реагент использовали в течение 24 часов.

Оборудование

Проводились стандартные биохимические тесты, для определения лекарственной чувствительности к ПТП применялся метод пропорциональных разведений в питательной среде с использованием автоматического анализатора ВАСТЕС.

Концентрация выделенной ДНК измерялась с помощью анализатора нуклеиновых кислот (DU 730, Life Science UV/Vis спектрофотометр).

Выделенные фрагменты генов амплифицировались с использованием термоциклера «Rotor-Gene» (RG-3000, Corbett Research Inc.).

Для подтверждения точечных мутаций, секвенирование фрагментов проводилось с использованием автоматического ДНК-секвенатора (Amersham auto sequencer).

Определение устойчивости *M. tuberculosis* к противотуберкулезным препаратам

Для определения спектра лекарственной устойчивости МБТ использовали метод абсолютных концентраций на опытной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС. В качестве критериев для отнесения штаммов МБТ к категории чувствительных или устойчивых использовали

пороговые значения МИК ПТП, которые ингибируют рост МБТ при культивировании их на питательных средах с различными концентрациями препаратов. Данные о величине МИК ПТП в отношении штаммов МБТ, выделенных от больных, служили микробиологическим критерием определения величины пороговых концентраций.

Распределение МБТ по чувствительности к ПТП:

Чувствительные - группа чувствительная к изониазиду и рифампицину.

Монорезистентные - данная группа резистентна либо к изониазиду, либо к рифампицину.

TMDR (Total MDR – общая множественная лекарственная устойчивость) – в данном исследовании на основании клинических различий группа пациентов с MDR была разделена на подгруппы с собственно MDR и с FLR. Для обозначения группы, состоящей из двух упомянутых подгрупп, использовалось понятие TMDR. MDR (множественная лекарственная устойчивость) - группа, резистентная к обоим лучшим противотуберкулезным препаратам: и к изониазиду, и к рифампицину. FLR (резистентность к препаратам первого выбора) - группа, состоящая из MDR-изолятов (резистентных к изониазиду и рифампицину), которые также были устойчивыми к пиперазину, этамбутолу и стрептомицину.

XDR (лекарственная суперустойчивость) - XDR-туберкулез является устойчивым к изониазиду и рифампицину, а также к лучшим препаратам второго выбора – фторхинолонам и как минимум к одному из трех инъекционных препаратов (т.е. амикацину, канамицину и капреомицину).

Молекулярно-генетическое исследование *M. tuberculosis*

Выделение ДНК для проведения ПЦР

Выделение чистой ДНК из изолятов проводилось модифицированным методом Chelex-100, который, как было установлено, позволял получить оптимальный материал для последующей очистки и длительного (около 1,5 лет) хранения [36]. Вносили 3-4 колонии из свежей полученной культуры в 270 мл ТАЕ-буфера (1х), нагревали на водяной бане при 95°C в течение 45 мин. с последующим трехкратным центрифугированием при 14000 оборотов в минуту в течение 10 мин. для полного удаления Chelex-100, препятствующего последующему проведению ПЦР.

ПЦР-амплификация фрагментов генома

Амплификация фрагментов генома клинических изолятов МБТ (генов *katG*, *gyrA*) выполнялась описанным ниже способом с целью последующего проведения методов ПДФР или секвенирования.

Определение гена *gyrA*. Полиморфизм в кодоне 95 гена *gyrA* определялся путем ПЦР-амплификации фрагмента ДНК размером 194 п.о. с праймерами *gyrA* (таблица 2.4). Все ампликоны были секвенированы обратным праймером *gyrA* методом, описанным для секвенирования.

Таблица 2.4 – Праймеры, использованные для ПЦР и секвенирования гена *gyrA*

Реакция	Направ-	Праймер (5'-3')	Размер п та, п	Программ
ПЦР для секвенирования	F	CGATCCGGGCTCCGCCCGG	194	95°C 40 с
	R	CCGGTGGGTCATTGCCTGGCG		68°C 60 с
Амплификация последователь-	R	CCGGTGGGTCATTGCCTGGCG	194	72°C 20 с
				40 циклов
Амплификация последователь-	R	CCGGTGGGTCATTGCCTGGCG	194	95°C 40 с
				68°C 60 с
Амплификация последователь-	R	CCGGTGGGTCATTGCCTGGCG	194	72°C 20 с
				40 циклов

Определение гена *katG*. Амплификация сегмента *katG* размером 975 п.о., для определения мутаций в *KatG315* и *KatG463*, проводилась при условиях и с использованием праймеров, представленных в таблице 2.3.

Продукты ПЦР выявлялись с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с этидий бромидом в течение 1 часа.

Таблица 2.3 – Праймеры, использованные для ПЦР и секвенирования гена *katG*

Реакция	Направ-	Праймер (5'-3')	Размер про п.о.	Программ
ПЦР для секвенирования	F	TTCGGCCGGGTCGACCAGT	975	94°C 10
	R	CGGAATCCAGGGTGCGAATGA		62°C 30
Амплификация последователь-	R	TGCGGTCGAAACTAGCTGTGA	837	72°C 10
				43 цикла
Амплификация последователь-	R	TGCGGTCGAAACTAGCTGTGA	837	95°C 30
				56°C 60
Амплификация последователь-	R	TGCGGTCGAAACTAGCTGTGA	837	72°C 80
				33 цикла

Исследование продуктов ПЦР

Для разделения и определения генов выполнялся электрофорез в агарозном геле. Измерение размеров образовавшихся соединений с целью идентификации генов проводилось путем применения стандартного ДНК-маркера GeneRuler (Fermentas). Для приготовления геля использовался ТАЕ-буфер с добавлением этидий-бромидом.

2.4.5 Секвенирование фрагментов ДНК

Выделенный фрагмент ДНК, соответствующий гену *katG*, длиной 837 п.о. (нуклеотиды от 571 до 1408), а также ген *gugA* (194 п.о.) амплифицировались с использованием термоциклеров «Rotor-Gene» (RG-3000, Corbett Research Inc.) и Personal Thermo Cycler MJ MiNi (Bio RAD); применялся набор красящих разделителей термосеквенасы Cy5 (GE Healthcare 27-2682-01).

Процедура проводилась с использованием автоматического ДНК-секвенатора (Amersham auto sequencer).

Для амплификации использовались олигонуклеотидные праймеры, соответствующие фрагментам геномной последовательности *M. tuberculosis H37Rv*. Исследование выполнялось с помощью некоторых прикладных программ (например Integrated DNA Technologies, DNA Services Facility, Primer Design, и др.), а также DNAMAN (Quebec, Canada) или же использовались данные из литературных источников. Последовательная температура отжига для амплификации рассчитывалась отдельно. Условия, специфичные для каждого праймера, представлены в таблицах 2.1, 2.3, 2.4.

Для того, чтобы избежать ошибок при проведении метода, некоторые эксперименты по секвенированию повторялись 2-3 раза. Кроме того, процедура проводилась как с прямыми, так и с обратными праймерами.

Анализ результатов секвенирования осуществлялся с помощью таких программ, как ALFwin Sequence Analyser module V2, Mega 4.1 (2008, <http://www.megasoftware.net/>), NCBI-BLAST и BLASTP (Search nucleotide databases, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), DNAMAN (Quebec, Canada), а также BioEdit.

Белковая последовательность изолятов анализировалась путем «перевода» нуклеотидных последовательностей в Mega program.

Выявление основных генетических групп

SNPs в KatG463 и GyrA95 определялись путем секвенирования. На основании полученных результатов изоляты были отнесены к одной из трех PGG, которые были определены Sreevatsan et al. как группа 1 (ЦГГ в katG463, АЦЦ в gyrA95), группа 2 (ЦГГ в katG463, АЦЦ в gyrA95) и группа 3 (ЦГГ в katG463, АГЦ в gyrA95).

Результаты

Сбор клинического материала и изучение устойчивости к противотуберкулезным препаратам

В работе было исследовано 152 клинических изолята, идентифицированных как МБТ. 101 исследуемый изолят (66,5%) был выделен от пациентов-мужчин, а 51 (33,5%) – от женщин. Таким образом, соотношение мужчин и женщин составляло 2,08. Возраст пациентов колебался в диапазоне 25-65 лет.

Был проведен посев образцов на пробирки со средой Левенштейна-Йенсена. После 4 недель культивирования на средах выросли колонии, напоминающие цветную капусту.

Тест на лекарственную чувствительность МБТ выявил, что 109 изолятов обладали MDR, 31 – XDR и 9 – являлись чувствительными к ПТП. Два стандартных штамма - H37Rv и академический, а также изолят *M. bovis* были использованы в качестве контроля.

Секвенирование гена резистентности к фторхинолонам в изолятах *M. tuberculosis*

На 21 клиническом изоляте было проведено изучение молекулярных основ лекарственной резистентности МБТ к фторхинолоновым препаратам. Исследование базировалось на обнаружении областей, детерминирующих резистентность к хинолонам (QRDRs) гена ДНК-гиразы (*gyrA*) (таблица 5.7).

Таблица 5.7 – Мутации в области, детерминирующей резистентность к хинолонам (QRDRs) гена ДНК-гиразы (*gyrA*) изолятов *M. tuberculosis*

Характеристика клинических изолятов		Кодоны в области GRDR					
Тип резистентности	Изоляты	88	89	90	91	94	95
			ГАЦ	ГЦГ (Аср)	ТЦГ	АЦ (Аср)	АГЦ
Чувствительные	H 264	-	-	-	-	-	-
	H 276	-	-	-	-	-	-
Всего	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
MDR – чувствительные офлоксацину	1452M	-	-	-	-	-	+
	11TM	-	-	-	-	-	+
	2TM	-	-	-	-	-	+
	6TM	-	-	-	-	-	+
	1193M	-	-	-	-	-	+
	1499M	-	-	-	-	-	+
Всего	0%	0%	0%	0%	0%	100%	
XDR- устойчивые к офлоксацину	194X	-	-	-	-	+ААЦ	+
	12T	-	-	-	-	+ГЦЦ	+
	12X	-	-	+ГТГ	-	-	+
	1207X XDR	-	-	-	-	+ГЦЦ	+
	3369X XDR	-	-	+ГТГ	-	-	+
	1241X	-	-	+ГАГ	-	+ЦАЦ	+
	124X	-	-	+ГТГ	-	-	+
	9T XDR	-	-	+ГТГ	-	-	+
	571X	-	-	+ГТГ	-	-	+
	4T XDR	-	-	-	-	+ЦАЦ	+
	662X	-	-	+ГТГ	-	-	-
	7211X	-	-	+ГТГ	-	-	+
14TM(S)	-	-	+ГТГ	-	-	+АЦЦ	
Всего		0%	0%	70%	0%	30,5%	92%

Результаты секвенирования нуклеотидов *gyrA* QRDRs у 2 чувствительных, 6 MDR- и 13 XDR-клинических изолятов обнаружили наличие скрытой мутации в GRDR области гена *gyrA* у одного из чувствительных и MDR-изолятов.

У XDR-изолятов была определена частота аминокислотных и нуклеотидных замен в кодонах 90 и 94 гена *gyrA*. Было выявлено, что максимально часто, у девяти (70%) ГТГ). Остальные 4 (30%) из XDR-изолятов, наблюдалась мутация в кодоне 90 (ГЦГ ГТЦ или ЦАЦ) и один изолят (1241 X) имел изолята имели мутацию в кодоне 94 (ГАЦ ЦАЦ). Мутация в кодоне ГТГ) и 94 (ГАЦ) две мутации одновременно в кодонах 90 (ГЦГ 94 наблюдалась у 5 (30%) XDR-изолятов.

Мутация в кодоне 95 была идентифицирована у всех 6 MDR и 12 (92%) XDR-изолятов, но не обнаруживалась ни у одного из чувствительных изолятов. Учитывая, что MDR-изоляты не являются устойчивыми к фторхинолонам, было доказано что мутация в данном кодоне не имеет отношения к резистентности.

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что определение аминокислотной последовательности областей, детерминирующих резистентность к хинолонам (QRDRs) в субъединице А ДНК-гиразы может быть использовано в качестве молекулярного теста для определения устойчивости микобактерий к фторхинолонам

Изучение молекулярных основ резистентности лекарственно-устойчивых клинических изолятов *M. tuberculosis* к фторхинолоновым препаратам показал мутаций в области GRDR гена *gyrA* клинических изолятов *M. tuberculosis*. У XDR-изолятов была определена частота аминокислотных и нуклеотидных замен в кодонах 90 и 94 гена *gyrA*. Было выявлено, что максимально часто, у девяти (70%) из XDR-изолятов, наблюдалась мутация в кодоне 90 (ГЦГ ГТГ). Остальные 4 (30%) изолята имели мутацию в кодоне 94 (ГАЦ ГТЦ или ЦАЦ) и один изолят (1241 X) имел две мутации одновременно в кодонах 90 (ГЦГ ГТГ) и 94 (ГАЦ ЦАЦ). Мутация в кодоне 94 наблюдалась у 5 (30%) XDR-изолятов.

Мутация в кодоне 95 была идентифицирована у всех 6 MDR и 12 (92%) XDR-изолятов, но не обнаруживалась ни у одного из чувствительных изолятов. Учитывая, что

MDR-изоляты не являются устойчивыми к фторхинолонам, было доказано что мутация в данном кодоне не имеет отношения к резистентности.

Характеристика больных туберкулезом

Демографическая характеристика 934 пациентов с туберкулезом в отношении к микобактериальной лекарственной устойчивости. В этом случае все пациенты были разделены на 5 групп на основании резистентности к основным антимикобактериальным препаратам. Были обнаружены изоляты, относящиеся к группам туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (MDR), лекарственной суперустойчивостью (XDR), монорезистентностью к изониазиду или рифампицину и с резистентностью ко всем препаратам первого выбора.

За период с 2007 г. по 2009 г. были обследованы 934 гражданина Беларуси с диагностированным ТБ. В целом, ТБ значительно чаще болели мужчины – их среди обследованных было 70,7%, в то время как женщин – 29,3% (274 человека). Наибольшая разница по половому составу была в возрастной группе 25-44 года, а наименьшая – в группах младше 15 и старше 65 лет (таблица 3.1, рисунок 3.1). Таким образом, 31,2% от всех пациентов составляли мужчины в возрасте 25-44 года и только 1,5% – мальчики младше 15 лет. Частота ТБ в возрастных группах младше 15 и старше 55 лет составила 3% и около 22%, соответственно. Соотношение мужчин и женщин в этих группах было 1 и 1,88, соответственно.

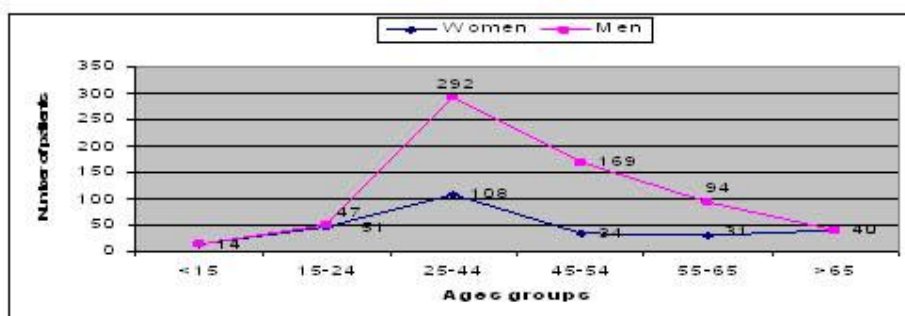


Рисунок 3.1 – Половая дифференцировка в различных возрастных группах

Среди пациентов с лекарственно-устойчивым ТБ в различных возрастных группах значимой разницы в числе мужчин и женщин отмечено не было. Практически не наблюдалось разницы по возрастным группам при сравнении мужской и женской популяции с XDR-ТБ ($P=0,92$), с MDR-ТБ ($P=0,1$) и с лекарственно-чувствительным ТБ ($P=0,2$).

XDR-ТБ является устойчивым к изониазиду и рифампицину, а также к любому из препаратов второго выбора – фторхинолонам и как минимум к одному из трех инъекционных препаратов (т.е. амикацину, канамицину и капреомицину). У 54 пациентов (5,78% от числа всех обследованных) диагностировался XDR-ТБ. 72,22% в этой группе составляли мужчины. Наибольшее количество пациентов имели возраст 25-44 года. Детей в группе с XDR-ТБ не было.

Обнаруживалась также и значительная разница в числе мужчин и женщин трудоспособного возраста с MDR-ТБ ($P=0,0001$). Такая же ситуация отмечалась в группе инфицированных лекарственно-чувствительным ТБ ($P=0,016$). Однако, среди пациентов с XDR- и монорезистентным ТБ значимой разницы по половому признаку среди пациентов трудоспособного возраста выявлено не было ($P=0,28$ и $0,53$, соответственно).

В целом, ТБ значительно чаще болели мужчины – их среди обследованных было 70,7%, в то время как женщин – 29,3% (274 человека). Наибольшая разница по половому

составу была в возрастной группе 25-44 года, а наименьшая – в группах младше 15 и старше 65 лет.

Молекулярно-генетическая группировка клинических изолятов по «основным генетическим группам»

По результатам, полученным впервые в Республике Беларусь, 73 (48%) принадлежали к генетической группе 1, 51 (33%) – к группе 2 и 28 (18%) – к группе 3. Молекулярно-генетический анализ 30 XDR-изолятов выявил, что 15 (50%), 12 (40%) и 3 (10%) относились к основным генетическим группам 1, 2 и 3, соответственно [3-А]. По результатам молекулярно-генетического анализа 22 штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов, содержащихся в пенитенциарных учреждениях Беларуси, 10 (45,5%) из них принадлежали к основной генетической группе 1, 8 (36%) – к группе 2 и 4 (18%) – к группе 3.

Благодарность

Выражаем искреннюю благодарность нашим коллегам в референс- лаборатории ГУ НИИ пульмонологии и фтизиатрии МЗ РБ за помощь в сборе материала и проведении тестов на чувствительность к препаратам.

Литература

1. Mutations at amino acid position 315 of the katG Gene are Associated With High-level Resistance to isoniazid, Other Drug resistance, and successful transmission Mycobacterium tuberculosis in the Netherlands / D. van Soolingen // JID. 2000. Vol. 182 (10). P. 1788–1790.[et al.]
2. Rindi, L. Detection of Mycobacterium tuberculosis genotypic groups by a duplex real-time PCR targeting the katG and gyrA genes. Journal of Microbiological Methods 59 (Spain) / L. Rindi, N. Lari, D. Bonanni // J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 56. P. 283–287.
3. Сетаре, М. Распространенность мутаций в кодоне 463 katG-гена в клинических изолятах лекарственно-устойчивых Mycobacterium tuberculosis в Республике Беларусь и возможности применения метода ПЦР-ПДФР в экспресс-диагностике туберкулеза / М. Сетаре, Л. П. Титов, Л. К. Суркова // Медицинский журнал. 2009. №. 1. С. 81–86.
4. Сетаре, М. Изучение полиморфизма отдельных нуклеотидов KatG315 и KatG463 в клинических изолятах Mycobacterium tuberculosis, полученных от больных туберкулезом легких в пенитенциарных заведениях / М. Сетаре, Л. П. Титов, Л. К. Суркова // Медицинский журнал. 2009. №. 1. С. 86–92.
5. Титов, Л. П. Изучение мутации и разработка метода экспресс-идентификация микроорганизмов группы Mycobacterium tuberculosis путем регуляторного гена whiB7 / Л. П. Титов [и др.] // Медицинский журнал. 2009. №. 2. С. 119–124.
6. Cockerill, F. R. Rapid identification of a point mutation of the Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase (katG) gene associated with isoniazid resistance / F. R. Cockerill // J. Infect. Dis. 1995. Vol. 171 (1). P. 240–245.
7. Doorn, H.R.V. The Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to Isoniazid and the Arg3Leu Mutation at Codon 463 of katG Are Not Associated / H.R.V. Doorn // Journal of clinical microbiology. 2001. Vol. 39, № 4. P. 1591–1594.
8. Dye, C. Global epidemiology of tuberculosis / C. Dye // Lancet. 2006. Vol. 367. P. 938–940.
9. Dye, C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project / C. Dye [et al.] // JAMA. 1999. Vol. 282. P. 677–686.

10. Dye, C. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis incidence, prevalence, and deaths globally / C. Dye [et al.] // JAMA. 2005. Vol. 293. P. 2767–2775.
11. Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR TB) [Electronic resource] / CDC, Centers for Disease Control and Prevention, July 2007. - Mode of access: <http://www.cdc.gov/tb>.
12. Haas, W. H. Molecular analysis of katG gene mutations in strains of Mycobacterium tuberculosis complex from Africa / W.H. Haas [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 1997. Vol. 41. P. 1601–1603.
13. Leung, E.T.Y. Detection of KatG Ser315Thr substitution in respiratory specimens from patients with isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis using PCR-RFLP / E.T.Y. Leung [et al.] // Journal of Medical Microbiology. 2003. Vol. 52. P. 999–1003.
14. Mokrousov, I. High Prevalence of KatG Ser315Thr Substitution among Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001 / I. Mokrousov, T. Otten, M. Filipenko // Antimicrob Agents Chemother. 2002. Vol. 46. P. 1417–1424.
15. Borgdorff, M.W. Gender and Tuberculosis: a Comparison of Prevalence Surveys with Notification Data to Explore Sex Differences in Case Detection / M.W. Borgdorff // Int J Tuberc Lung Dis. 2000 Feb;4(2):123–32.
16. Palomino, J. C., S. Cardoso, L., V. Ritacco (editors). Tuberculosis 2007, From Basic Science to Patient Care ;www.TuberculosisTextbook.com.
17. Cloning and nucleotide sequence of Mycobacterium tuberculosis gyrA and et[gyrB] genes and detection of quinolone resistance mutations / H. E. Takiff // Antimicrob. Agents Chemother. 1994. Vol. 38. P. 773–780]al.