

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР КАРДИОЛОГИИ И ТЕРАПИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА МИРСАИДА МИРРАХИМОВА
Диссертационный совет Д.14.10.416**

На правах рукописи
УДК 616.24-002.5:579.873.21:577.21 (575.2)

ИСАКОВА ЖАЙНАГУЛЬ ТОЛОНОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РИФАМПИЦИН И
ИЗОНИАЗИД УСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА У БОЛЬНЫХ
ТУБЕРКУЛЕЗОМ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ**

14.01.04 – внутренние болезни
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Бишкек – 2011

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте молекулярной биологии и медицины при Национальном центре кардиологии и терапии имени академика Мирсаида Миррахимова при МЗ Кыргызской Республики

Научный консультант: академик НАН КР,
доктор биологических наук, профессор
Алдашев Алмаз Абдулхаевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук
Ливерко Ирина Владимировна

доктор медицинских наук, профессор
Сабиров Ибрагим Самижонович

доктор медицинских наук
Тилекеева Улангуль Муктаровна

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН г. Москва.

Защита диссертации состоится «22» апреля 2011 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д. 14.10.416 при Национальном центре кардиологии и терапии имени академика Мирсаида Миррахимова при МЗ КР по адресу: 720040, Бишкек, ул. Тоголок-Молдо, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Национального центра кардиологии и терапии имени академика Мирсаида Миррахимова при МЗ КР (720040, Бишкек, ул. Тоголок-Молдо, 3).

Автореферат разослан «18» марта 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник

Т.А. Романова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) 1/3 часть населения Земли инфицировано микобактериями туберкулеза (МБТ). Ежегодно в мире туберкулезом (ТБ) заболевают 8-9 млн. человек и около 2 млн. каждый год умирают от этой инфекции. Из общей смертности от инфекционных заболеваний 75-80% составляет смертность от туберкулеза (ВОЗ, 2008).

Кыргызская Республика (КР) относится к числу стран с неблагоприятной ситуацией по туберкулезу. В 2009 г. показатель заболеваемости туберкулезом среди гражданского населения составил 100,9/100 тыс. населения, а показатель смертности 8,7/100 тыс. населения. В пенитенциарной системе более высокие показатели заболеваемости 115,1/100 тыс. населения и смертности – 11,6 /100 тыс. населения (Алишеров А. Ш., 2009).

Одной из главных причин глобального ухудшения эпидемической ситуации по туберкулезу является появление и широкое распространение МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), то есть штаммов устойчивых одновременно к рифампицину (RIF) и изониазиду (INH) (ВОЗ, 2008).

Причиной широкого распространения МБТ с МЛУ является поздняя диагностика лекарственно-устойчивого туберкулеза, неправильное или незаконченное лечение.

Сложность раннего выявления устойчивости МБТ к противотуберкулёзным препаратам (ПТП) является одним из главных факторов развития вторичной устойчивости из-за неадекватного применения лекарственных препаратов.

Широко используемые бактериологические методы выявления лекарственной устойчивости МБТ требуют длительного периода времени (до 3 месяцев) и клиницисты получают сведения о лекарственной чувствительности возбудителя туберкулёза ретроспективно, практически к моменту завершения интенсивной фазы лечения. Таким образом, больным туберкулёзом лёгких с самого начала назначается стандартное лечение без достоверной информации о наличии лекарственной устойчивости МБТ. В связи с этим возрастает актуальность проблемы внедрения в практику новых ускоренных методов лабораторной диагностики ТБ с МЛУ.

С развитием молекулярной генетики появились новые методы определения лекарственной устойчивости МБТ в кратчайшие сроки. Одним из самых перспективных подходов является технология выявления мутаций в геноме МБТ, связанных с устойчивостью к противотуберкулёзным препаратам на биочипах.

Устойчивость МБТ к рифампицину обусловлена мутацией в гене *rpoB*, а мутации в генах *katG*, *inhA* и *ahpC* приводят к изониазид резистентности (Telenti A. et al., 1993; Ramaswamy S., Musser J., 1998). Анализ мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* рифампицин- и изониазид-устойчивых штаммов, циркулирующих в Кыргызской Республике, ранее не проводился.

Биочип-метод в течение 2-х дней позволяет идентифицировать большинство из известных типов мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*,

приводящих к рифампицин и изониазид устойчивости (Mikhailovich V. et al., 2001). Экспресс выявление МБТ с МЛУ позволяет выбрать адекватную химиотерапию на раннем этапе лечения больного, что повышает эффективность лечения и уменьшает риск внутрибольничного заражения туберкулезом с МЛУ.

Для успешной борьбы с туберкулезной инфекцией важно не только знать, к какому лекарственному препарату устойчивы микобактерии туберкулеза, но и генотип, поскольку от генотипа микобактерий зависит вирулентность, трансмиссивность и лекарственная устойчивость. С клинической и практической точки зрения важными являются МБТ генотипа Beijing, для которых характерна высокая вирулентность, трансмиссивность и поли- мультирезистентность (Вишневский Б.Т. и др., 2002; Drobniowski F. et al., 2005; Mokrousov I., 2008). Известно, что лекарственно-устойчивые (ЛУ) штаммы генотипа Beijing вызывают тяжелое прогрессирующее течение туберкулеза легких (Нарвская О.В., 2003; Степаншина В.Н. и др., 2007; Черноусова Л.Н. и др., 2008). В связи с тем, что генотипирование популяции МБТ, распространенных на территории нашей республики ранее не проводилось, проведение работ по ее молекулярно-генетическому типированию представляет интерес не только для Кыргызской Республики, но и как часть исследований, проводимых в мировом масштабе.

Высокий уровень заболеваемости и смертности от туберкулеза, широкое распространение штаммов МБТ с МЛУ, отсутствие данных о генотипах, о частоте встречаемости и спектре мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* рифампицин- и изониазид-устойчивых штаммов МБТ, циркулирующих в Кыргызской Республике определило, цель и задачи настоящей работы.

Цель исследования

Молекулярно-генетическая характеристика мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, приводящих к устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике

Задачи работы

1. Оценить чувствительность и специфичность биочип-метода в выявлении устойчивых/чувствительных к рифампицину и изониазиду МБТ относительно стандартного бактериологического метода исследования.
2. Провести анализ мутаций в гене *groV* МБТ у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике.
3. Выявить основные типы мутаций в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*, обуславливающие устойчивость МБТ к изониазиду.
4. Провести анализ мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* МБТ, приводящих к появлению МЛУ у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких.
5. Дать сравнительную молекулярно-генетическую характеристику МБТ с МЛУ, выявленных у больных туберкулезом легких гражданского сектора и пенитенциарной системы КР.
6. Провести генотипирование МБТ, циркулирующих в пенитенциарной системе Кыргызской Республики.

Научная новизна

Впервые в Кыргызской Республике внедрен экспресс биочип-метод оценки лекарственной устойчивости МБТ на уровне генотипа.

Впервые в республике выявлены основные типы мутаций в гене *groB*, обуславливающие устойчивость МБТ к рифампицину и определены мутации в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*, приводящие к изониазид-резистентности.

Впервые на основе молекулярно-генетических исследований определены основные виды мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, характерные для МБТ с МЛУ, циркулирующих в Кыргызской Республике.

Впервые в республике проведено генотипирование МБТ. Показано, что на территории Кыргызской Республики преобладают МБТ генотипа Beijing. Установлено, что штаммы Beijing, выявленные в Кыргызской Республике, имеют генетическую схожесть с популяцией МБТ, распространенными в Российской Федерации.

Впервые в республике создан банк ДНК МБТ, содержащий информацию о встречающихся в Кыргызской Республике мутантных рифампицин и изониазид устойчивых штаммах МБТ, что позволяет отличать привнесенные случаи возбудителя туберкулеза от локальных.

Генетический банк данных ДНК МБТ позволяет следить за эволюционными изменениями штаммов микобактерий туберкулеза в Кыргызской Республике. Это позволяет участвовать в международных программах по глобальной эпидемиологии туберкулеза.

Практическая значимость исследования

Экспресс выявление МБТ с МЛУ биочип-методом позволяет своевременно изолировать бактериальных больных, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы МБТ, назначать им адекватную химиотерапию на раннем этапе лечения, что улучшает эффективность лечения больного, сокращает срок пребывания больных в стационаре и обеспечивает экономию имеющихся ресурсов в секторе здравоохранения.

Генотипирование МБТ позволяет своевременно оптимизировать превентивные меры, направленные на разрыв эпидемиологической цепочки передачи инфекции среди гражданского населения и в пенитенциарной системе.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Биочип-метод, не уступая по своей чувствительности и специфичности бактериологическому методу абсолютных концентраций, позволяет выявить МБТ с МЛУ в течение 2-х дней.
2. Большинство локальных рифампицин-устойчивых штаммов МБТ имеют мутацию 531 (*Ser531*→*Leu*) кодона гена *groB*.
3. У больных туберкулезом в Кыргызской Республике наиболее часто устойчивость МБТ к изониазиду связана с мутацией 315 (*Ser315*→*Thr*) кодона гена *katG*.
4. У больных туберкулезом легких в пенитенциарной системе КР отмечается селекция штаммов МБТ с МЛУ, имеющих сочетанный тип мутаций в гене *groB* (*Ser531*→*Leu*) и *katG* (*Ser315*→*Thr*).

5. В Кыргызской Республике у больных, находящихся в местах лишения свободы, наибольшее число (75%) туберкулеза легких вызывают МБТ генотипа Beijing.
6. Штаммы МБТ семейства Beijing, выявленные в Кыргызской Республике, имеют существенное генетическое сходство с популяцией МБТ Российской Федерации.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены и обсуждены в виде докладов (устных и стендовых), тезисов на республиканских и международных семинарах, конгрессах и конференциях в 2005–2010 гг.: на 10-м Конгрессе Турецкого торакального общества (Анталья, 2007); на Конгрессах Европейского Респираторного Общества (Копенгаген, 2005; Мюнхен, 2006; Стокгольм, 2007; Берлин, 2008; Вена, 2009; Барселона, 2010); на Всемирной конференции по легочным заболеваниям IUATLD (Париж, 2006; Мехико, 2009); на I Конгрессе Кыргызского торакального общества (Бишкек, 2006); на I Конгрессе фтизиатров Кыргызстана (Бишкек, 2008); на IV и V Конгрессе Евро-Азиатского респираторного общества (Ташкент, 2008; Бишкек, 2009); на 30-м Конгрессе Европейского Общества Микробиологии (Порту, Португалия, 2009) и 8 Конгрессе Северных и Балтийских стран по инфекционным болезням (Санкт-Петербург, 2009).

Апробация диссертации состоялась 12 ноября 2009 года на заседании ученого совета НИИМБиМ при НЦКТ имени академика Мирсаида Миррахимова при МЗ КР. Диссертация прошла дополнительное обсуждение в Кыргызской государственной медицинской академии имени И.К.Ахунбаева на совместном заседании кафедр госпитальной терапии, профпатологии с курсом гематологии; фтизиатрии; базисной и клинической фармакологии 5 октября 2010 г. и в Кыргызско-Российском Славянском Университете на заседании кафедры терапевтических дисциплин №2 медицинского факультета 1 ноября 2010 г. Диссертация обсуждена на заседании экспертной комиссии по предварительному рассмотрению диссертаций при НЦКТ 2 декабря 2010 года.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в лечебно - диагностический процесс Национального центра фтизиатрии (НЦФ) при МЗ КР, городской противотуберкулезной больницы г. Бишкека и в работу противотуберкулезной службы пенитенциарной системы Чуйской области. Материалы диссертации внедрены в учебный процесс Кыргызского государственного медицинского института переподготовки и повышения квалификации (КГМИПиПК).

Личное участие автора в получении результатов

Аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, определение молекулярных маркеров устойчивости МБТ к RIF и INH в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* биочип-методом, анализ и интерпретация полученных результатов, статистическая обработка и подготовка публикаций выполнялись лично автором.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 27 научных статей и одна монография.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 177 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы и 23 рисунка.

Состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель содержит 260 названий, из них 36 работ авторов ближнего и 224 работы авторов дальнего зарубежья.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность за помощь, оказанную в процессе выполнения работы сотрудникам Национального центра фтизиатрии (НЦФ) при МЗ КР и лично генеральному директору, доктору медицинских наук, профессору А.Ш. Алишерову. Автор особую благодарность выражает доктору биологических наук И. В. Мокроусову (Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) и профессору Н. Растиги (Институт Пастера Гваделупы, Франция) за полезные обсуждения и помощь в работе.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, представлены цели и задачи исследования, изложена научная новизна, практическая значимость и основные положения диссертации, выносимые на защиту. Приводятся сведения об апробации результатов исследования, отражена структура и объем работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы подробно изложены и анализированы генетические механизмы развития лекарственной устойчивости МБТ к ПТП основного и резервного ряда. Рассмотрены вопросы перспективности и эффективности использования, ускоренных молекулярно-генетических методов выявления МБТ, устойчивых к ПТП. Анализированы работы авторов ближнего и дальнего зарубежья, посвященных к генотипам и методам генотипирования МБТ. Анализирована история происхождения и роль МБТ генотипа Beijing в распространении туберкулеза с МЛУ.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Было проанализировано 1656 образцов ДНК МБТ, выделенные из мокроты больных туберкулезом легких, поступивших на стационарное лечение в Национальный Центр Фтизиатрии с 2005 по 2009 год. 1372 образцов ДНК МБТ получены от больных впервые выявленным туберкулезом легких и 284 образца от ранее леченных больных. В исследование также включены 87 препаратов ДНК МБТ, полученные из мокроты больных впервые выявленным туберкулезом легких пенитенциарной системы. Пациенты, включенные в данное исследование, ВИЧ-отрицательные. Больным в условиях стационара НЦФ проводилось рентгенография органов грудной клетки, микроскопия мазка мокроты и посев мокроты на МБТ. Все пациенты являлись бактериовыделителями по результатам метода микроскопии мазка мокроты. Образцы мокроты для исследования у больных были собраны согласно

общепринятым методикам в 1-й день поступления больных в стационар. После деконтаминации каждый образец мокроты делили на две части. Одну часть использовали для определения лекарственной чувствительности МБТ к RIF и INH классическим бактериологическим методом абсолютных концентраций, а вторую часть использовали для выявления МБТ, устойчивых к RIF и INH биочип-методом.

Лекарственную устойчивость МБТ к RIF и INH определяли биочип-методом и бактериологическим методом абсолютных концентраций. Выделение ДНК и идентификация мутаций в генах *rpoB*, *katG* и *inhA* и *ahpC*, обуславливающих устойчивость МБТ к RIF и INH проводилось биочип-методом (ООО «ТВ-Биочип -ИМБ», Москва, Россия) в НИИ Молекулярной биологии и медицины при НЦКТ имени академика Мирсаида Миррахимова при МЗ КР. Микроскопия и посев мокроты с последующим определением лекарственной устойчивости МБТ к RIF и INH бактериологическим методом абсолютных концентраций на твердой питательной среде Левенштейна-Йенсена были проведены в референс-лаборатории НЦФ при МЗ КР.

Генотипирование образцов ДНК МБТ, выделенных от впервые выявленных больных ТБ пенитенциарной системы, был выполнен с использованием сполиготипирования (Kamerbeek K. et al., 1997) и методом инвертной IS6110-ПЦР (Mokrousov I. et al., 2006). Для характеристики штаммов МБТ генотипа Beijing использовали 12 локусов VNTR (Supply P.S. et al., 2001) и 3 гипервариабельные локусы QUB-3232, VNTR-3820 VNTR-4120 (Iwamoto T. S. et al., 2007). Профили сполиготипирования и 12- MIRU типирования сравнивали с международной базой сполиготипов SITVIT2 (Институт Пастера, Гваделупы, Франция) и глобальной базой профилей MIRU генотипа Beijing (Mokrousov I., 2008). Генотипирование было проведено в Институте Пастера, Гваделупы (Франция) д.б.н. И.В. Мокроусовым в лаборатории микобактерий туберкулеза (зав. лаб. проф. Н. Растоги).

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 6.0. и SPSS 10.0.5. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым уровнем достоверности различий. Филогенетический анализ проводили с использованием пакетов программ PHYLIP 3.6 и RAUP 4.0. Индекс Хантера-Гастона (HGI) рассчитывали для оценки генетического разнообразия популяции по данному маркеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ МБТ К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ МЕТОДОМ БИОЧИПОВ И БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ АБСОЛЮТНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ

В Кыргызской Республике для определения чувствительности МБТ к ПТП традиционно используется классический бактериологический метод абсолютных концентраций, результаты которого получают через 2-3 месяца, а также

применяется автоматизированная система «Bactec MGIT 960» с использованием жидких сред, срок получения результатов 2-3 недели.

С 2005 г. в Кыргызской Республике для выявления МБТ, устойчивых к RIF и INH наряду со стандартными бактериологическими методами начали использовать биологические микрочипы. Одной из задач нашего исследования было оценить чувствительность и специфичность биочип метода. Оценка основных показателей чувствительности биочип-метода проводилась относительно стандартного бактериологического метода абсолютных концентраций. В нашем исследовании чувствительность показывает процент идентифицированных лекарственно-устойчивых штаммов МБТ, а специфичность процент идентифицированных лекарственно-чувствительных штаммов МБТ. Чувствительность и специфичность биочип-метода рассчитывали при помощи четырехпольной таблицы (Реброва О.Ю., 2006).

630 образцов МБТ были параллельно протестированы биочип-методом и бактериологическим методом абсолютных концентраций на выявление устойчивости к RIF и INH. При сопоставлении результатов 2-х методов исследования было выявлено, что чувствительность и специфичность биочип-метода при выявлении МБТ, устойчивых и чувствительных к рифампицину составила 88% и 96%, для изониазид- устойчивых и чувствительных штаммов – 93% и 93%, для штаммов с МЛУ и не с МЛУ – 90,6% и 97% соответственно. Таким образом, биочип-метод по своей чувствительности и специфичности не уступает бактериологическому методу абсолютных концентраций. Но, в отличие от стандартного метода, биочип-методом МБТ, устойчивые к RIF и INH можно выявить уже через 2 дня. Таким образом, при сохранении высокой чувствительности и специфичности при выявлении МБТ и определении лекарственной устойчивости, принципиальным преимуществом биочип-метода является срок получения результатов – 2 дня.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МБТ, УСТОЙЧИВЫХ К РИФАМПИЦИНУ И ИЗОНИАЗИДУ, У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

*Молекулярно-генетическая характеристика МБТ, устойчивых к рифампицину
у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких*

В более 95% случаев резистентность МБТ к рифампицину обусловлена мутациями в гене *rpoB*, который кодирует β -субъединицу РНК-полимеразы. Выявление места локализации и типа мутаций в гене *rpoB* является важным, поскольку микобактерии туберкулеза с различными типами мутаций требуют для предотвращения размножения разные дозы лекарственных препаратов (Williams D. et al., 1998; Stepanshina V. et al., 1999; Van Soolingen D. et al., 2000).

Лекарственная устойчивость МБТ к рифампицину биочип-методом исследована у 668 впервые выявленных и 236 ранее леченных больных ТБ.

Среди обследованных были больные из г. Бишкека (n=323), Чуйской (n=185), Иссык-Кульской (n=68), Нарынской (n=75), Таласской (n=47), Ошской (n=65), Джалал-Абадской (n=90) и Баткенской областях (n=51).

У $26,2 \pm 1,7\%$ (175 из 668) впервые выявленных и у $61,8 \pm 3,2\%$ (у 146 из 236) ранее леченных больных были выявлены МБТ с мутацией в гене *groV*, т.е. рифампицин-устойчивые штаммы ($p < 0,001$). Было выявлено 15 вариантов рифампицин-устойчивых штаммов. При этом статистически значимо чаще встречались МБТ, устойчивость которых к рифампицину была обусловлена мутацией 531 кодона гена *groV* (рис. 1).



Рисунок 1. Рифампицин-устойчивые штаммы МБТ, выявленные у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике. Примечание: * – $p = 0,0001$ при сравнении с мутациями в других кодонах гена *groV*.

На втором месте, по частоте встречаемости, находятся рифампицин-устойчивые штаммы с мутацией 526 кодона, на третьем и четвертом месте – с мутацией 516 и 511 кодонов гена *groV*. Рифампицин-резистентные штаммы с мутацией 533, 512, 513 и 522 кодонов встречались редко.

Более детальный анализ выявленных мутаций в гене *groV* показал, что в 531 кодоне было выявлено 2 типа мутаций, сопровождающихся заменой серина на лейцин и на триптофан (табл.1). Статистически значимо чаще встречалась мутация с заменой серина на лейцин ($\text{Ser}531 \rightarrow \text{Leu}$). Рифампин-устойчивые штаммы с данной мутацией были выявлены у 61 % впервые выявленных и 59 % ранее леченных больных.

В 526 кодоне было выявлено пять типов мутаций, сопровождающихся заменой гистина на тирозин, аспарагиновую кислоту, лейцин, аргинин и на пролин. Рифампицин-устойчивые штаммы с мутацией 526 кодона были выявлены у 16,6% впервые выявленных и у 18,5% больных, ранее получавших ПТП. В 516 кодоне было выявлено 2 типа мутаций с заменой аспарагина на валин и на тирозин. Рифампицин-резистентные штаммы с данным типом

мутаций были выявлены у 4,6% впервые выявленных и 7,4% ранее леченных больных.

Таблица 1

Спектр мутаций в гене *groV* МБТ, выделенных у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике

Кодоны гена <i>groV</i>	Мутации	Впервые выявленные (n=175)		Ранее леченные (n=146)			
		n (%)	n (%)	n (%)		n (%)	
533	Leu533→Pro	5 (2,8)	5 (2,8)	1 (0,7)		1(0,7)	
531	Ser531→Leu	107 (61)*	114 (65)	86 (59) *		86 (59)	
	Ser531→Trp	7 (4)		-			
526	His526→Tyr	7 (4)	29 (16,6)	9 (6)		27 (18,5)	
	His526→Asp	10 (5,7)		6 (4)			
	His526→Leu	1 (0,6)		5 (3,4)			
	His526→Arg	10 (5,7)		5 (3,4)			
	His526→Pro	1 (0,6)		2 (1,4)			
522	Ser522→Leu	1 (0,6)	1 (0,6)	2 (1,4)		2 (1,4)	
516	Asp516→Val	8 (4,6)	8 (4,6)	2 (1,4)		11 (7,4)	
	Asp516→Tyr			9(6,2)			
513	Gln513→Leu	1 (0,6)	1 (0,6)	1 (0,7)		3 (2)	
	Gln513→Gly			2 (1,4)			
512	Ser512→Thr	2 (1,2)	2 (1,2)	1 (0,7)		1 (0,7)	
511	Leu511→Pro	14 (8)	14 (8)	12 (8,2)		12 (8,2)	
Двойные мутации							
531	Ser531→Leu	-	-	2 (1,4)		2 (1,4)	
511	Leu511→Arg			2 (1,4)		2 (1,4)	
531	Ser 531→Leu	-	-	1 (0,7)		1 (0,7)	
516	Asp516→Thr			1 (0,7)		1 (0,7)	
511	Leu511→Arg	1 (0,6)	1 (0,6)	-		-	
526	His526→Cys			-		-	

Примечание: * – p = 0,0001 сравнение с другими вариантами мутаций

Другие варианты рифампицин-устойчивых штаммов с другими типами мутаций были выявлены у единичных больных. Таким образом, у больных туберкулезом в Кыргызской Республике большинство (65%) МБТ, устойчивых к рифампицину содержат мутацию в 531 кодоне гена *groV* (Ser531→Leu). По литературным данным мутация Ser531→Leu обеспечивает устойчивость МБТ к

высоким дозам рифампицина (Stepanshina V. et al., 1999; Van Soolingen D. et al., 2000).

Анализ рифампицин-устойчивых штаммов МБТ, встречающихся в отдельных регионах Кыргызской Республики, показал, что рифампицин-резистентные штаммы с мутацией Ser531→Leu встречались во всех регионах республики и доминировали по частоте встречаемости (рис. 2). Однако, в г. Бишкеке, Чуйской и Ошской областях, которые характеризуются повышенной плотностью населения, высокой внутренней и внешней миграцией, встречались рифампицин-устойчивые штаммы с широким спектром мутаций в гене *groV*. Таким образом, на территории Кыргызской Республики среди рифампицин-устойчивых штаммов доминируют МБТ с мутацией Ser531→Leu.

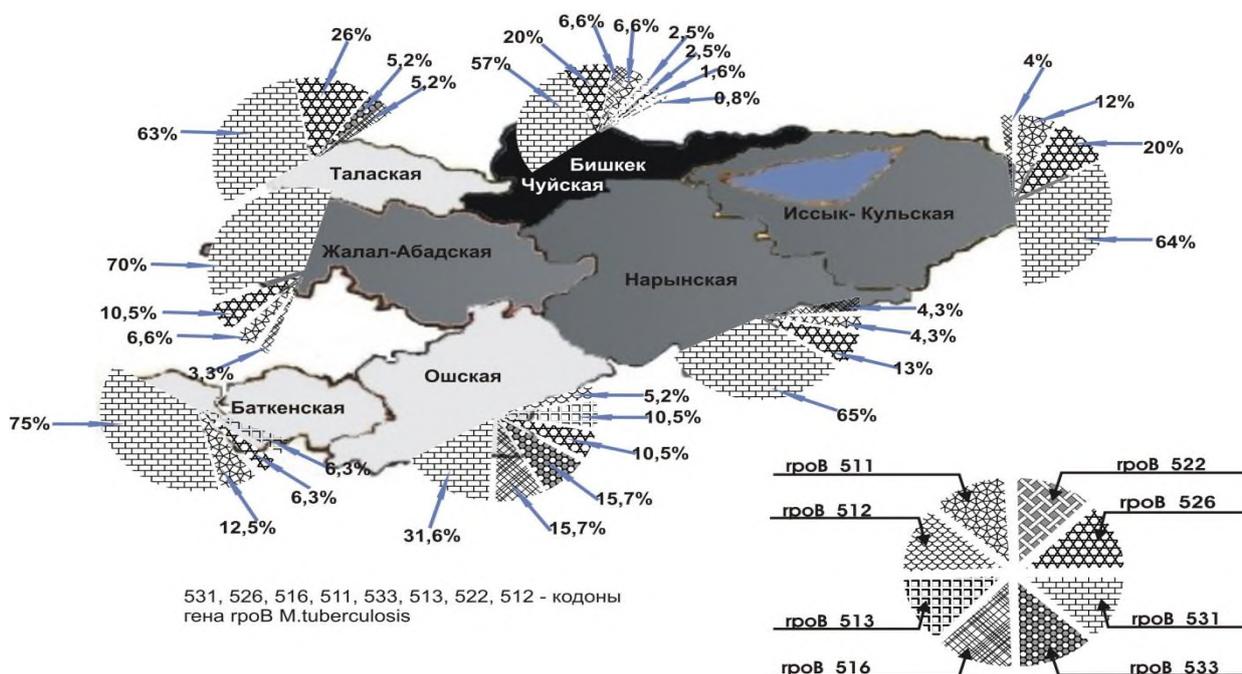


Рисунок 2. Частота встречаемости рифампицин-устойчивых штаммов МБТ, с различными типами мутаций, на территории Кыргызской Республики

Молекулярно-генетическая характеристика МБТ, устойчивых к изониазиду у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких

В отличие от рифампицина устойчивость МБТ к изониазиду ассоциирована с мутациями в нескольких генах, главными из которых являются: *katG*, *inhA* и *ahpC* (Ramaswamy S., Musser J., 1998; Mikhailovich V., 2009; Mokrousov I., 2009).

Из 630 (582 впервые выявленные и 48 ранее леченных больных) исследованных образцов мокроты в 283 (45%) были выявлены МБТ устойчивые к ИН. При этом монорезистентность к ИН была выявлена в 118 образцах из 283. В 165 образцах устойчивость МБТ к ИН сочеталась с устойчивостью к RIF.

Анализ частоты встречаемости мутаций в генах *katG*, *inhA* и *ahpC* в изониазид-резистентных штаммах МБТ, показал, что в 86% (101/118) случаев устойчивость МБТ к изониазиду была связана с мутацией гена *katG*, в 10%

(12/118) - гена *inhA* и в 4,0% (5/118) - гена *ahpC*. Таким образом, на территории Кыргызской Республики доминируют изониазид-устойчивые штаммы МБТ с мутацией гена *katG* (рис. 3).

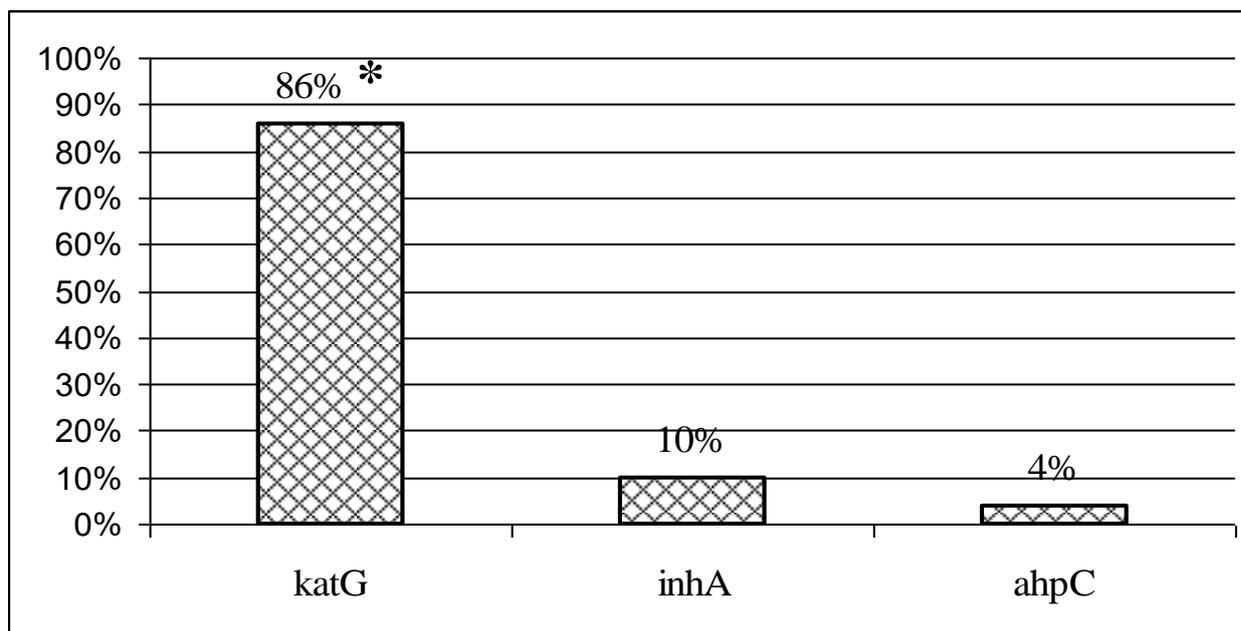


Рисунок 3. Изониазид-устойчивые штаммы МБТ, с мутациями в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*, выделенные у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике. Примечание: * $p < 0,0001$ по сравнению с мутациями в генах *inhA* и *ahpC*.

Более детальный анализ выявленных мутаций в каждом из трех генов показал, что в гене *katG* мутация, в основном, выявлялась в 315 кодоне (табл. 2).

Таблица 2

Спектр мутаций в генах *katG*, *inhA* и *ahpC* изониазид-устойчивых штаммов МБТ, выделенных у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике

Гены МБТ, обуславливающие устойчивость к изониазиду	Кодоны	Аминокислотные замены	Нуклеотидные замены	Образцы с мутациями	
				n=118	%
<i>katG</i>	315	Ser → Thr	AGC → ACC	92	78±3,8*
	315	Ser → Arg	AGC → ACA	5	4,2±1,8
	315	Ser → Asn	AGC → AAC	3	2,5±1,4
	315	Ser → Gly	AGC → GGC	1	0,85±0,8
<i>inhA</i>	15		C → T	10	8,5±2,5
<i>inhA</i>	8		T → G	2	1,7±1,2
<i>ahpC</i>	9		G → A	5	4,3±3,4

Примечание: * – $p = 0,0008$ по сравнению с другими типами мутаций в генах *katG*, *inhA* и *ahpC*.

В этом кодоне было выявлено 4 варианта мутаций с заменой серина на треонин, аргинин, аспарагин и на глютаминовую кислоту. Статистически значимо чаще (78% случаев) выявлялась мутация с заменой серина на треонин (Ser315→Thr).

В гене *inhA* мутации были выявлены в -15 и -8 позиции. В гене *ahpC* мутация была идентифицирована в положении -9 относительно сайта инициации транскрипции. В целом, популяция изониазид-устойчивых МБТ, циркулирующих в Кыргызской Республике, однородна и представлена в основном штаммами с мутацией 315 кодона (Ser315→Thr) гена *katG*. Изониазид-устойчивых штаммов с мутацией Ser315→Thr характеризует устойчивость к высоким дозам изониазида (Ramaswamy S., Musser J., 1998; van Soolingen D. et al., 2000; Mokrousov I., 2008).

Молекулярно-генетическая характеристика МБТ с МЛУ у впервые выявленных и ранее леченных больных туберкулезом легких

Согласно классификации ВОЗ (2008), МЛУ рассматривают как одновременную устойчивость МБТ к рифампицину и изониазиду. Множественная лекарственная устойчивость МБТ возникает в результате сочетанных мутаций в гене *groV* (устойчивость к рифампицину) и мутаций в генах *katG*, *inhA* и *ahpC* (устойчивость к изониазиду) (Ramaswamy S., Musser J., 1998). Одной из задач нашего исследования было изучить частоту встречаемости и профиль мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* МБТ, обуславливающих развитие МЛУ у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике. Для решения этой задачи биочип-методом были исследованы 630 образцов ДНК МБТ. При этом 582 образца ДНК МБТ получены от больных, ранее не получавших ПТП и 48 образцов ДНК МБТ получены от ранее лечившихся пациентов.

У 48,6% (283/582) впервые выявленных больных были обнаружены МБТ чувствительные к RIF и INH. У 51,4% (299/582) – МБТ, устойчивые к RIF и/или INH. При этом штаммы с МЛУ были выявлены у 28,3% (165 из 582) больных, у 3,4% (20/582) - монорезистентные к RIF и у 19,6% (114/582) больных монорезистентные к INH штаммы МБТ.

В группе больных, ранее получавших ПТП, чувствительные к RIF и INH МБТ выявлены у 12,5% (6/48). У 87,5% (42/48) больных обнаружены МБТ устойчивые либо к RIF и/или к INH. При этом у 75% (36/48) были выявлены МБТ с МЛУ, у 4,2% (2/48) больных обнаружены штаммы устойчивые только к RIF, у 8,3% (4/48) - штаммы МБТ, устойчивые только к INH. Таким образом, в структуре ЛУ как у впервые выявленных, так и ранее леченных, частота встречаемости штаммов с МЛУ выше, чем монорезистентных к INH и RIF ($p < 0,005$).

По профилю выявленных мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* МБТ с МЛУ у впервые выявленных и ранее леченных больных существенно не отличались (таб. 3).

Варианты МБТ с множественной лекарственной устойчивостью у впервые выявленных и у ранее леченных больных туберкулезом легких

МБТ с множественной лекарственной устойчивостью				Впервые выявленные больные		Раннее леченные больные	
RIF-устойчивость	INH-устойчивость			n=165	(%)	n=36	(%)
ген rpoB	ген katG	ген inhA	ген ahpC				
Ser531→Leu	Ser315→Thr	-	-	92	56±3,8*	23	63,8±8,0*
Ser531→Leu	Ser315→Thr	InhA_T15	-	3	1,8±1,0	-	-
Ser531→Leu		InhA_T15	-	-	-	2	5,5±3,8
Ser531→Leu	Ser315→Asn	-	-	4	2,4±1,2	-	-
Ser531→Leu	Ser315→Arg	-	-	3	1,8±1,0	-	-
Ser531→Leu		-	ahpC_9	-	-	2	5,5±3,8
His526→Arg	Ser315→Thr	-	-	6	3,6±1,4	2	5,5±3,8
His526→Asp	Ser315→Thr	-	-	6	3,6±1,4	1	2,7±2,7
His526→Tyr	Ser315→Thr	InhA_T15	-	14	8,6±0,4	2	5,5±3,8
His526→Leu	Ser315→Thr	-	-	-	-	1	2,7±2,7
His526→Leu	Ser315→Gly	-	-	1	0,6±0,6	-	-
His526→Leu	-	InhA_T15	-	2	1,2±0,8	-	-
His526→Pro	-	inhA_T15	-	1	0,6±0,6	-	-
His526→Asn	-	inhA_T15	-	1	0,6±0,6	-	-
Asp516→Tyr	Ser315→Thr	-	-	11	6,6±1,9	-	-
Asp516→Val	Ser315→Thr	-	-	2	1,2±0,8	1	2,7±2,7
Leu511→Pro	Ser315→Thr	-	-	11	6,6±1,9	-	-
Leu533→Pro	Ser315→Thr	-	-	8	4,8±1,6	-	-
Ser522→Leu	Ser315→Thr	-	-	-	-	1	2,7±2,7
Gln513→Gly	Ser315→Thr	-	-	-	-	1	2,7±2,7

Примечание: * – $p = 0,0001$ по сравнению с другими сочетанными типами мутаций в генах rpoB, katG и inhA.

В обеих группах больных преобладали штаммы с признаками МЛУ, имеющие наиболее распространенный тип сочетания мутаций в генах rpoB (Ser531→Leu) и katG (Ser315→Thr). Такие штаммы с МЛУ были выявлены у 56% впервые выявленных и 63,0% ранее леченных больных. Таким образом, у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике основную популяцию

МБТ с МЛУ составляют штаммы с сочетанной мутацией Ser531→Leu гена *groV* и Ser315→Thr гена *katG*.

Географическая вариабельность распределения специфических мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC* определяет необходимость предварительного анализа молекулярной основы лекарственной устойчивости локально циркулирующих штаммов до внедрения молекулярных методов в широкую практику. Ограничением внедрения молекулярно-генетических методов определения резистентности является разнообразие механизмов развития устойчивости. Некоторые из устойчивых микроорганизмов не выявляются конкретным молекулярным методом, направленным на детекцию только определенного спектра, а не всех мутаций.

Результаты наших исследований показали, что у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике устойчивость МБТ к рифампицину в 91% случаев обусловлена мутациями в 531, 526, 516 и 511 кодонах гена *groV*. 89% рифампицин-устойчивых штаммов устойчивы также и к изониазиду. Следовательно, рифампицин-устойчивые МБТ являются надежным маркером МЛУ и биочип-метод (ООО «ТВ-Биочип-ИМБ») может быть использован для экспресс выявления большой доли рифампицин- (и, следовательно, МЛУ) и изониазид-устойчивых штаммов МБТ, циркулирующих в Кыргызской Республике.

ГЛАВА 5. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МБТ С МЛУ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПЕНИТЕНЦИАРНОЙ СИСТЕМЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

Неблагополучие по туберкулёзу во многих странах обусловлено широкой распространенностью МБТ в пенитенциарных учреждениях. Исторически пенитенциарные учреждения всегда представляли собой весомый резервуар туберкулёзной инфекции, в виду комплекса неблагоприятных факторов, присущих данной категории людей. В настоящее время особую обеспокоенность в пенитенциарной системе вызывает широкое распространение МБТ с МЛУ. Такая обстановка оказывает негативное влияние не только на эпидемическую ситуацию в местах лишения свободы, но и на общество в целом.

В параллельном исследовании 87 образцов МБТ, полученных от впервые выявленных больных туберкулезом пенитенциарной системы, и 122 образца МБТ, выделенных от больных туберкулезом легких гражданского сектора, были исследованы на ЛУ МБТ к RIF и INH. Проведенный сравнительный анализ показал, что частота встречаемости МБТ с ЛУ была выше у больных ТБ пенитенциарной системы, чем у больных ТБ гражданского сектора.

В структуре лекарственной устойчивости в обеих группах преобладали больные, выделяющие МБТ с МЛУ, однако частота их встречаемости также

была выше у больных ТБ пенитенциарной системы (41%), в гражданском секторе – 27,8% (табл. 4).

Таблица 4

Структура лекарственной устойчивости МБТ у больных туберкулезом легких гражданского сектора и пенитенциарной системы КР

Популяции МБТ	Гражданское население (n=122)	Пенитенциарная система (n=87)	P
	абс. (%)	абс. (%)	
МБТ, устойчивые к RIF	4 (3,2)	3 (3,4)	0,09
МБТ, устойчивые к INH	24 (19,6)	22 (25,6)	0,73
МБТ с МЛУ	34 (27,8)	36 (41,0)	0,76
МБТ, чувствительные к RIF и INH	60 (49,4)	26 (30,0)	0,0001

Анализ спектра мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* МБТ выявил 13 вариантов сочетания мутаций в этих генах (табл. 5).

Таблица 5

Варианты МБТ с множественной лекарственной устойчивостью у больных туберкулезом легких гражданского сектора и пенитенциарной системы КР

МБТ с множественной лекарственной устойчивостью		Гражданское население n=34	Пенитенциарная система n=36
		абс. (%)	абс. (%)
Ser531→Leu	Ser315→Thr	19 (57,0) *	28 (77,7%)*
Ser 531→ Leu	Ser315→Asn	1 (2,4)	–
Ser 531 →Leu	Ser315→Arg	3 (1,8)	–
His526→Tyr	Ser315→Thr	1 (8,4)	2 (5,5)
His526→Asp	Ser315→Thr	1 (0,36)	1 (2,7)
Ser526→Arg	Ser315→Thr	1 (0,36)	1 (2,7)
Leu511→Pro	Ser315→Thr	1 (6,6)	–
Asp516 →Tyr	Ser 315→ Thr	3 (6,6)	–
His526 →Leu	InhA_T15	1 (1,2)	–
His526 →Asn	InhA_T15	1 (0,60)	–
His526→ Pro	InhA_T15	1 (0,60)	1 (2,7)
Ser531→Leu	Ser315→Thr, inhA_T15	1 (0,60)	2 (5,5)
His526→Leu	Ser315→Thr, inhA_T15	–	1 (2,7)

Примечание: * – p = 0,0001 при сравнении с другими сочетанными типами мутаций в генах *groB* и *katG*, *groB* и *inhA*.

Наиболее распространённым был вариант сочетания мутаций Ser531→Leu гена *groB* и Ser315→Thr гена *katG*, который встречался у заключенных в 77,7%, а у гражданского населения в 57,0% случаев. Были выявлены и другие варианты сочетания мутаций, которые встречались с одинаковой частотой у МБТ от больных обеих групп. Кроме того, были детектированы варианты мутаций, которые обнаруживались только у больных ТВ гражданского населения, либо только у заключенных.

Сравнительный анализ популяции МБТ с МЛУ показал, что у заключенных по профилю выявленных мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* мультирезистентные штаммы были более однородны и были представлены в основном (77,7%) штаммами с сочетанной мутацией Ser531→Leu гена *groB* и Ser315→Thr гена *katG*. Эти данные свидетельствуют о селекции данных штаммов в пенитенциарной системе или об их активной трансмиссии.

Генотипирование штаммов МБТ, циркулирующих в Кыргызской Республике

По данным Pfyffer G.E. et al., (2001), Toungousova O.S. et al., (2003), высокая распространенность МБТ с МЛУ в пенитенциарной системе стран СНГ (Азербайджане и России) связана с широким распространением МБТ генотипа Beijing. В связи с этим одной из задач нашего исследования было провести генотипирование МБТ, распространенных в пенитенциарной системе Кыргызской Республики. По положительным результатам микроскопии мазка мокроты, ПЦР и биочип анализа, достаточного количества ДНК МБТ из 87 образцов клинического материала, полученного из пенитенциарной системы, было отобрано 56 образцов. Эти 56 образцов клинического материала были переданы в институт Пастера Гваделупы для генотипирования.

Результаты сполиготипирования показали, что наибольший кластер – 42/56 (75%) штаммов – был образован штаммами генетического семейства Beijing. Штаммы генетических семейств Haarlem и LAM в изученной популяции составляли 6/56 (10,7%) и 6/56 (10,7%) соответственно. Два образца ДНК представляли микст штамма Beijing и штамма другого генотипа.

Необходимо отметить, что МБТ с генотипом Beijing чаще встречались среди штаммов с МЛУ, тогда как другие генотипы в основном включали лекарственно-чувствительные штаммы МБТ. Таким образом, очевидно, что штаммы семейства Beijing играют ведущую роль в распространении МБТ с МЛУ в Кыргызской Республике.

При сравнении профилей 12-MIRU-локусов МБТ генотипа Beijing, выделенных в Кыргызстане, с глобальной базой MIRU-VNTR штаммов Beijing позволило отнести полученные профили к типам, уже представленным в глобальной базе данных профилей MIRU-VNTR генотипа Beijing (Mokrousov I., 2008). Индекс Хантера-Гастона, показывающий уровень гетерогенности популяции и рассчитанный на основе полиморфизма 12 локусов MIRU-VNTR

составил 0,66, что указывает на высокую однородность коллекции по этому признаку.

Более детальная дифференциация штаммов Beijing на основе 12 локусов MIRU позволила более точно установить пути проникновения штаммов Beijing в Кыргызскую Республику. В исследованной популяции 28 из 36 штаммов Beijing относились к типу M2 (профиль MIRU 223325153533), который характерен для различных регионов России. Три штамма генотипа Beijing относились к небольшим типам M87 (223325153433) и M40 (223325153523), характерным как для России, так и для Восточной Азии (Mokrousov I., 2008). Один штамм принадлежал к наиболее крупному типу M11 (223325173533), который преобладает в различных частях Евразии, является основным в Восточной Азии и вторым в России. 4 штамма принадлежали к типам M33 (223325163533) и M70 (223325163533), характерным для Восточной Азии (Шанхай, Вьетнам).

ВЫВОДЫ

1. Биочип-метод обладает высокой чувствительностью (90%) и специфичностью (97%), но в отличие от бактериологического метода позволяет выявить МБТ, устойчивые к рифампицину и изониазиду в течение 2-х дней.
2. Биочип-метод не исключает использование бактериологического метода и используется как дополнительный метод для раннего выявления лекарственно-устойчивых штаммов МБТ.
3. У больных туберкулезом в Кыргызской Республике устойчивость МБТ к рифампицину обусловлена, в основном, мутациями в 531, 526, 516 и 511 кодонах гена *rpoB*. Основной мутацией, вызывающей устойчивость МБТ к рифампицину, является – Ser531→Leu гена *rpoB*, тогда как основной мутацией, обуславливающей устойчивость МБТ к изониазиду, является – Ser315→Thr гена *katG*.
4. На территории Кыргызской Республики основной резервуар МБТ с множественной лекарственной устойчивостью составляют штаммы, имеющие сочетанный тип мутаций Ser531→Leu гена *rpoB* и Ser315→Thr гена *katG*.
5. Частота встречаемости МБТ с множественной лекарственной устойчивостью у больных туберкулезом пенитенциарной системы в 1,5 раза выше, чем у больных туберкулезом гражданского сектора. МБТ с МЛУ у больных туберкулезом легких гражданского сектора и пенитенциарной системы по профилю выявленных мутаций в генах *rpoB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* не отличаются.
6. У больных туберкулезом в пенитенциарной системе КР преобладают МБТ генотипа Beijing (75%). Штаммы Beijing чаще обнаруживаются среди штаммов с МЛУ. Очевидно, что штаммы Beijing играют ведущую роль в распространении туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.
7. Популяция МБТ генотипа Beijing, выявленная в Кыргызской Республике, относительно однородна и, в целом, имеет значительное сходство с популяциями МБТ северо-западной Евразии, прежде всего, России и слабое генетическое родство с популяцией МБТ Восточной Азии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для сокращения сроков выявления больных с лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза целесообразно использовать экспресс биочип метод, позволяющий выявить лекарственно-устойчивые штаммы в течение 2-х дней, непосредственно в клиническом материале, без длительного этапа культивирования МБТ, что уменьшает биологический риск распространения живых штаммов.
2. Биочип-метод позволяет до начала химиотерапии проводить идентификацию МБТ с лекарственной устойчивостью. Ранняя идентификация МБТ с лекарственной устойчивостью позволяет провести своевременную изоляцию больных и адекватную химиотерапию уже на раннем этапе лечения.
3. Результаты работы являются научным обоснованием для разработки эффективной стратегии лечения больных туберкулезом в Кыргызской Республике с учетом типов мутаций в генах *groV*, *katG*, *InhA* и *ahpC*, обуславливающих различную степень устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду.
4. Генотипирование МБТ способствует осуществлению на территории Кыргызской Республики мониторинга распространения туберкулезной инфекции на современном методологическом уровне.
5. Результаты работы рекомендуется внедрить в практику лабораторной диагностики специализированных учреждений республики, в программу обучения клинических ординаторов и циклы последипломной подготовки врачей.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Монография

Молекулярно-генетическая характеристика лекарственно-устойчивых микобактерий туберкулеза в Кыргызской Республике. – Бишкек, 2010. – 100 с.

Статьи:

1. **Исакова Ж.Т.**, Пак О.А., Юсупова Э.У. и др. Диагностическая ценность биочип анализа при первичной и вторичной лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* // ЦАМЖ. – 2005. – №1. – С. 4–9.
2. **Исакова Ж.Т.**, Пак О.А., Юсупова Э.У. и др. Молекулярный анализ мутаций гена *groV* *M. Tuberculosis* у больных туберкулезом, проживающих в городской и сельской местности Кыргызской Республики // ЦАМЖ. – 2005. – №2–3. – С. 108–112.
3. **Исакова Ж.Т.**, Пак О.А., Юсупова Э.У. и др. Применение биологических микрочипов в определении лекарственной устойчивости *Mycobacterium tuberculosis* к рифампицину // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – №8. – С. 50–54.
4. **Исакова Ж.Т.**, Пак О.А., Юсупова Э.У. и др. Молекулярно-генетические изменения *M. tuberculosis* при различных клинических формах лекарственно устойчивого туберкулеза // Фтизиопульмонология. – 2006. – №1. – С. 22–27.

5. **Исакова Ж.Т.,** Пак О.А., Юсупова Э.У. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ рифампицин-устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на территории Кыргызской Республики // Пульмонология. – 2006. – №2. – С. 48–52.
6. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Юсупова Э.У. и др. Картографическое моделирование распространенности рифампицинрезистентных штаммов *M. Tuberculosis* в различных регионах Кыргызской Республики // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – №7. – С. 33–36.
7. **Исакова Ж.Т.,** Пак О.А., Юсупова Э.У., и др. Анализ мутаций гена *groV* *M. Tuberculosis* при различных клинических формах туберкулеза, выявленных в Кыргызской Республике // Молекулярная Медицина. – 2007. – № 2. – С. 38–43.
8. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Юсупова Э.У. и др. Профиль мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду у штаммов *M. Tuberculosis*, циркулирующих в Кыргызской Республике // Респираторная Медицина. – 2007. – №1. – С. 66–70.
9. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Тумашова А.Ф. и др. Сравнительный анализ определения лекарственной чувствительности *M. Tuberculosis* к рифампицину бактериологическим методом и методом биочип-анализа. // Молекулярная Медицина. – 2007. – №4. – С. 44–48.
10. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Юсупова Э.У. и др. Анализ мутаций мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* у больных туберкулезом в Кыргызской Республике // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – №4. – С. 17–21.
11. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Юсупова Э.У. и др. Эффективность применения биочип-анализа для быстрого молекулярно-генетического определения мультирезистентных штаммов *M. Tuberculosis* // Молекулярная Медицина. – 2008. – №1. – С. 51–55.
12. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Алдашев А.А. Сравнительный анализ метода биочип-диагностики и бактериологического метода определения устойчивости *M. Tuberculosis* к рифампицину и изониазиду // ЦАМЖ. – 2008. – Т. XIV (1). – С. 22–25.
13. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Кожомкулов М.Д. Основные показатели применения метода микрочипов при выявлении резистентных к рифампицину штаммов микобактерий туберкулеза // ЦАМЖ. – 2008. – Т. XIV (4). – С. 318–320.
14. **Исакова Ж.Т.,** Кожомкулов М.Д., Курманова Н.К. Клиническое значение метода биологических микрочипов в определении устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину у впервые выявленных больных туберкулезом легких // ЦАМЖ. – 2008. – Т. XIV (4). – С. 321–323.
15. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Алдашев А.А. Биологические микрочипы в экспресс-идентификации штаммов *M. Tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью у больных туберкулезом в Республике Кыргызстан // Пульмонология. – 2008. – №3. – С. 64–66.

16. **Исакова Ж.Т.,** Гончарова З.К., Алдашев А.А. Характеристика спектра лекарственной устойчивости рифампицин-резистентных штаммов *M. tuberculosis* к другим противотуберкулезным препаратам первого ряда // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – №11. – С. 39–42.
17. **Исакова Ж.Т.** Молекулярно-эпидемиологический анализ рифампицин и изониазид устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Кыргызской Республике // Респираторная Медицина. – 2008. – №1. – С. 63–66.
18. **Исакова Ж.Т.** Раннее выявление циркулирующих в Кыргызской Республике лекарственно устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* тест-системой «ТВ-Биочип» // Известия НАК КР. – 2008. – №2. – С. 46–49.
19. **Исакова Ж.Т.** Молекулярно-генетическая характеристика рифампицин- и изониазидустойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в различных регионах Кыргызской Республики // Вестник КРСУ. – 2008. – № 4. – Т. 8. – С. 20-23.
20. **Исакова Ж.Т.** Частота встречаемости и типы мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду у штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в Кыргызской Республике // Молекулярная генетика микробиология и вирусология. – 2008. – №4. – С. 36–38.
21. **Исакова Ж.Т.** Экспресс-выявление рифампицин и изониазид-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* тест-системой «ТВ-Биочип» // Медицинские новости Грузии. – 2008. – №5 (158). – С. 15–19.
22. **Исакова Ж.Т.** Мутации в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* *M. tuberculosis*, циркулирующих в Кыргызской Республике // Сибирский Медицинский Журнал. – 2008. – Том. 23. – №3. – С. 89–91.
23. **Исакова Ж.Т.** Практическое значение тест-системы «ТВ-Биочип MDR» в экспресс-идентификации штаммов *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – №2. – С. 50–51.
24. **Исакова Ж.Т.,** Совхозова Н.А., Гончарова З.К. и др. Молекулярно-генетическая характеристика *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, выделенные у больных туберкулезом гражданского сектора и пенитенциарной системы Кыргызской Республики // Респираторная Медицина. – 2009. – №1. – С. 87–91.
25. Mokrousov I., Valcheva V., Sovhozova N., Aldashev A., Rastogi N., **Isakova J.** Penitentiary population of *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyzstan: Exceptionally high prevalence of the Beijing genotype and its Russia-specific subtype // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2009. – Vol. 9. – №6. – P. 1400–1405.
26. **Исакова Ж.Т.,** Мокроусов И.В., Вылчева В. и др. Генотипирование штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих в местах лишения свободы Кыргызской Республики // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – №9. – С. 39-44.

27. **Исакова Ж.Т.,** Совхозова Н.А., Гончарова З.К. и др. Характеристика мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* *M. tuberculosis*, выделенных у больных туберкулезом гражданского сектора и пенитенциарной системы Кыргызской Республики // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – №10. – С. 45-49.

Жайнагуль Толоновна Исакованын 14.01.04 – ички оорулар жана 03.01.04 – биохимия адистиги боюнча медицина илимдеринин доктору илимий даражасын алуу үчүн «Кыргыз Республикасындагы кургак учук менен оорулуу адамдардагы кургак учуктун рифампицин жана изониазидге туруктуу микобактериялардын молекулярдык-генетикалык мүнөздөмөсү» аттуу диссертациясынын

КЫСКАЧА МАЗМУНУ

Негизги сөздөр: микобактериялардын молекулярдык-генетикалык мүнөздөмөсү, генотиптештирүү, кургак учуктун микобактериясы, көп дарыга туруктуулук, биочип-талдоо.

Изилдөөнүн максаты: Кыргыз Республикасындагы кургак учук менен оорулуу адамдардагы кургак учуктун рифампицин жана изониазидге туруктуу микобактериялардын *groB*, *katG*, *inhA* жана *ahpC* мутациялары боюнча молекулярдык-генетикалык мүнөздөмөсү.

Изилдөөнүн материалы: Жарандык сектордогу ($n=1656$) жана пенитенциардык тутумдагы ($n=87$) кургак учук менен ооруган 18-75 жашар адамдардан алынган кургак учуктун микобактериясынын ДНКсы.

Изилдөө ыкмалары: кургак учуктун микобактериясы (КУМБ) рифампицинге (RIF) жана изониазидге (INH) туруктуулугун аныктоо биочиптер ыкмасы жана абсолюттук концентрация стандарттуу бактериологиялык ыкмасы менен жүргүзүлгөн. КУМБ-ду эпидемиологиялык типтештирүү үчүн сполиготиптештирүү ыкмасы, IS6110-RFLP жана MIRU-VNTR талдоо колдонулган.

Алынган натыйжалар жана алардын илимий жаңылыктары: биочип-ыкма бийик кабылдагыч касиетке (90%) жана өзгөчөлүүлүккө (97%) ээ жана *groB*, *katG*, *inhA* жана *ahpC* гендериндеги мутациялары боюнча RIF жана INH дарыларына туруктуу КУМБду эки күндө аныктоого жөндөмдүү. Кыргызстандагы кургак учук (КУ) менен ооруган оорулуулардагы КУМБ-дун RIF дарысына туруктуулугу, негизинен, *groB* генинин Ser531→Leu (TCG→TTG) мутациясы (62%) менен, ал эми INH дарысына туруктуулугу *katG* генинин Ser315→Thr (AGC→ACC) мутациясы (78%) менен шартталган. Көптөгөн дарыга туруктуу (КДТ) КУМБ-дун штаммдарынын кездешүү жыштыгы пенитенциардык тутумдагы КУ менен оорулуулар арасында жарандык сектордогу КУ менен оорулуулар арасындагыга караганда 1,5 эсе жогору. ДКТ КУМБ-дун республикадагы негизги резервуарын *groB* генинин Ser531→Leu мутациясы менен *katG* генинин Ser315→Thr мутациясы айкалышкан штаммдары (64%) түзөт.

Пенитенциардык тутумдагы КУ менен оорулуулардын арасында Beijing генотибинин штаммы басымдуулук кылат (75%). Beijing генотиб штамдары дарыга туруктуулук штамдарынын арасында кыйла көп табылган. Кыргыз Республикасындагы КУ менен оорулууларда аныкталган Beijing генотибинин КУМБ Түндүк-Батыш Евразиядагы, негизинен, Россиядагы КУМБ популяциясы менен генетикалык жактан окшоштугу Чыгыш Азиядагы КУМБ популяциясына окшоштугуна караганда кыйла күчтүү.

Колдону боюнча сунуштар: иштин жыйынтыктары республиканын атайы адистериштирилген дарылоо-профилактикалык мекемелеринде колдону учун, ошондой эле ординаторлордын окутуу программасына жана врачтардын дипломдон кийинки окутуу циклдарда колдолунат.

Колдонуу чөйрөсү: ички оорулар, фтизиопульмонология, биохимия.

Адабияттар: 260 илимий булак, көрсөтмөлөр: 23 таблица жана 23 сүрөт.

РЕЗЮМЕ

диссертации Исаковой Жайнагуль Толоновны на тему «Молекулярно-генетическая характеристика рифампицин и изониазид устойчивых микобактерий туберкулеза у больных туберкулезом в Кыргызской Республике» на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям 14.01.04 – внутренние болезни и 03.01.04 – биохимия.

Ключевые слова: генетические мутации, генотипирование, микобактерии туберкулеза, множественная лекарственная устойчивость, биочип-анализ.

Цель исследования: молекулярно-генетическая характеристика мутаций в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC*, приводящих к устойчивости микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду у больных туберкулезом легких в Кыргызской Республике.

Материал исследования: образцы ДНК МБТ, полученные от больных туберкулезом легких гражданского сектора ($n=1656$) и пенитенциарной системы ($n=87$) в возрасте 18-75 лет.

Методы исследования: лекарственную устойчивость МБТ к RIF и INH определяли биочип-методом и бактериологическим методом абсолютных концентраций. Генотипирование ДНК МБТ был выполнен с использованием сполитипирования и методом инвертной IS6110-ПЦР. Для характеристики МБТ использовали 12 локусов VNTR и 3 гипервариабельных локуса QUB-3232, VNTR-3820 VNTR-4120.

Полученные результаты и их новизна: показано, что биочип-метод обладает высокой чувствительностью (90%) и специфичностью (97%) и может выявить МБТ, устойчивые к RIF и INH по мутациям в генах *groB*, *katG*, *inhA* и *ahpC* в течение 2-х дней. Показано, что у больных ТВ легких в Кыргызской Республике устойчивость МБТ к RIF обусловлена, в основном, мутацией Ser531→Leu (TCG →TTG) гена *groB* (62%), а устойчивость к INH связана с

мутацией Ser315→Thr (AGC→ACC) гена katG (78%). Частота встречаемости штаммов МБТ с МЛУ у больных ТБ пенитенциарной системы в 1,5 раза выше, чем у больных туберкулезом гражданского сектора. В Кыргызской Республике основной резервуар МБТ с МЛУ составляют штаммы с сочетанной мутацией Ser531→Leu гена rpoB и Ser315→Thr гена katG. В пенитенциарной системе КР преобладают МБТ генотипа Beijing (75%). Штаммы Beijing чаще встречаются среди штаммов с МЛУ. МБТ генотипа Beijing, выявленные у больных туберкулезом легких в КР, относительно однородны и имеют значительное генетическое сходство с популяцией МБТ Российской Федерации, и слабое родство с популяцией МБТ Восточной Азии.

Рекомендации по использованию: результаты работы рекомендуется внедрить в практику специализированных учреждений республики, в программу обучения клинических ординаторов и циклы последипломной подготовки врачей.

Область применения: внутренние болезни, фтизиопульмонология, биохимия.

Библиография: 260 источников, иллюстрации – 23 таблиц и 23 рисунка.

SUMMARY

of dissertation of Ms. Isakova Zhainagul Tolonovna on the theme: «Molecular and genetic characteristics of tuberculosis mycobacterium resistant to rifampicin and isoniazid in tuberculosis patients in Kyrgyzstan» in candidacy for a degree of Doctor of Medicine with a specialization in internal diseases – 14.01.04 and biochemistry – 03.01.04.

Key words: mutation in genes, genotyping, mycobacterium tuberculosis, multi-drug resistant, biochip analysis.

Investigation objective. Molecular and genetic characteristics of mutation in rpoB, katG, inhA and ahpC genes leading to resistance of Mycobacterium tuberculosis (M.tb) to rifampicin and isoniazid in pulmonary TB patients in the Kyrgyz Republic.

Subject of investigation. DNA samples of M.tb were collected from adult patients with tuberculosis. The 1656 sputum samples were taken from patients from the civilian sector and 87 sputum samples were taken from patients from the penitentiary system (at the age of 18-75 years).

Methods of investigation. Drug resistance of M.Tb to rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) was examined by biochip method and bacteriological method of absolute concentrations. Spolygotyping method IS6110-RFLP and MIRU-VNTR analysis were used for epidemiological typing of M.tb.

The received results and their newness. Biochip method has a high sensitivity (90%), specificity (97%) and can be used as a rapid method for identification of M.tb resistant to RIF and INH according to mutation in genes rpoB, katG, inhA and ahpC. In Tb patients in Kyrgyzstan, M.tb resistance to RIF is caused mainly due to Ser531→Leu (TCG→TTG) mutation of the rpoB (62%) gene and

resistance to INH due to Ser315→Thr (AGC→ACC) mutation of the katG (78%) gene. The frequency of MDR M.tb in TB patients of the penitentiary system is 1.5 times higher than in TB patients of the civil sector. The main reservoir of multi-drug resistant (MDR) TB in the republic is constituted by strains with co-mutation of Ser531→Leu of rpoB gene and Ser315→Thr of katG gene (64%). Multiple MRD was detected more often among M.tb of Beijing genotype. Tuberculosis mycobacterium of Beijing genotype detected in tuberculosis patients in the Kyrgyz Republic have strong genetic similarity with M.tb population in Northwest Eurasia, especially Russia and weak relatedness with M.tb population in Eastern Asia.

Practical application: results of research are recommended to be introduced in practice of specialized medical institutions of the Republic and also in training program of residents and cycles of postgraduate training of physicians.

The area of applying: internal diseases, phthisiopulmonology, biochemistry.

Bibliography: 260 sources, illustrations – 23 charts and 23 figures.

Список сокращений

Биочип – биологический микрочип

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КР – Кыргызская Республика

ЛУ – лекарственная устойчивость

МЗ – министерство здравоохранения

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МБТ – Mycobacterium tuberculosis

НЦФ – Национальный центр фтизиатрии

НЦКТ – Национальный центр кардиологии и терапии

НИИМБиМ – Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и медицины

п. н. – пары нуклеотидные

ПТП – противотуберкулезные препараты

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТВ – туберкулез

DR (direct repeat) – регион прямых повторов

MIRU – mycobacterial interspersed repeat units (англ. микобактериальные рассеянные повторы)

INH – изониазид

RIF – рифампицин

UPGMA – (unweighted pair-group method of arithmetic averages) – невзвешенный попарный метод арифметических средних

VNTR – variable number of tandem repeats (полиморфизм числа tandemных повторов)