

УДК 579

ЮРИЙ МИХАЙЛОВИЧ МАРКЕЛОВ

кандидат медицинских наук, доцент курса фтизиопульмонологии медицинского факультета, Петрозаводский государственный университет
markelov@psu.karelia.ru

АННА АЛЕКСАНДРОВНА ВЯЗОВАЯ

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, ФГУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора
annavyazovaya@pasteurorg.ru

ВЯЧЕСЛАВ ЮРЬЕВИЧ ЖУРАВЛЕВ

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов, Санкт-Петербургский НИИФ Росмедтехнологий
jouravlev-slava@mail.ru

АНДРЕЙ ОЛЕГОВИЧ МАРЬЯНДЫШЕВ

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН, заведующий кафедрой фтизиопульмонологии, Северный государственный медицинский университет (г. Архангельск)
maryandyshhev@mail.ru

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ В КАРЕЛИИ

Исследованы 119 штаммов (в том числе 54 с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ)) с помощью молекулярно-генетических методов. Абсолютное большинство штаммов с МЛУ (90,9 %) и половина полирезистентных (ПР) штаммов, циркулирующих на территории Карелии, принадлежали к генетическому семейству Beijing. Устойчивость к рифампицину у большинства штаммов с МЛУ семейства Beijing была связана с мутацией 531 TCG → TTG гена *rpoB*, обуславливающей высокий уровень устойчивости к рифампицину и кросс-резистентность к рифабутинам. Представленные данные демонстрируют эпидемическую опасность МЛУ штаммов генотипа Beijing, циркулирующих на территории Карелии.

Ключевые слова: туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, генотипирование микобактерий туберкулеза, Beijing

В настоящее время проблема распространения туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) приобрела глобальное значение и является ведущим фактором, определяющим недостаточную эффективность противотуберкулезных мероприятий. В 1997 году в отчете Всемирной организации здравоохранения и Международного союза борьбы с туберкулезом и заболеваниями легких впервые был введен термин «горячие точки» распространения МЛУ-ТБ, которые обозначили страны или регионы, включая Российскую Федерацию, где более 5 % общего числа больных туберкулезом имели формы заболевания, обусловленного МЛУ штаммами микобактерий туберкулеза (МБТ) [5]. В Карелии, несмотря на некоторую стабилизацию показателя заболеваемости туберкулезом, удельный вес первичной МЛУ МБТ за последние 10 лет увеличился в 11 раз (с 2,8 до 30,9 %). Показатель частоты первичной МЛУ МБТ в Карелии в 2008 году превысил аналогичный показатель по РФ (8,1 %) более чем в 3 раза [4].

В последние годы большое внимание уделяется изучению циркуляции различных генотипов МБТ на различных территориях. Показана связь МЛУ с принадлежностью МБТ к генотипу Beijing в РФ [3], [7]. Установлено, что штаммы этого генотипа, обладающие высокой трансмиссивностью и гипервирулентностью, вызывают тяжелое прогрессирующее течение туберкулеза [1], [2], [3], [6], [7]. Таким образом, необходима углубленная характеристика популяции возбудителя МЛУ-ТБ на территории Карелии.

С помощью молекулярно-генетических методов нами были изучены 119 штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких в 2004–2007 годах, включая 54 штамма МЛУ, 40 лекарственно чувствительных и 25 полирезистентных к противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда. Из 119 штаммов 46 были подвергнуты генотипированию методом IS6110-RFLP [10] в референс-лаборатории Национального института общественного здоровья г. Осло (Норвегия), 73 – методом ПЦР с инверти-

рованными праймерами, *Ris1* и *Ris2*, расположенными на терминальных участках элемента *IS6110* [9], 11 – методом *IS6110*-RFLP [10] в лаборатории молекулярной микробиологии ФГУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора. Мутации в гене *groB*, ассоциированные с устойчивостью МБТ к рифампицину, определяли с помощью тест-системы «ТБ-БИОЧИП» в лаборатории молекулярно-генетических методов Санкт-Петербургского НИИФ Росмедтехнологий согласно [2].

Результаты генотипирования штаммов МБТ представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика 119 штаммов МБТ, выделенных от впервые выявленных больных в Республике Карелия

Генотип МБТ	Отношение к ПТП I ряда					
	МЛУ		ПР		ЛЧ	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Beijing	50	92,6	13	52	4	10
Другие (не Beijing)	4	7,4	12	48	36	90
Итого	54	100	25	100	40	100

Таблица 2

Генотипическая характеристика МЛУ штаммов Beijing (n = 11)

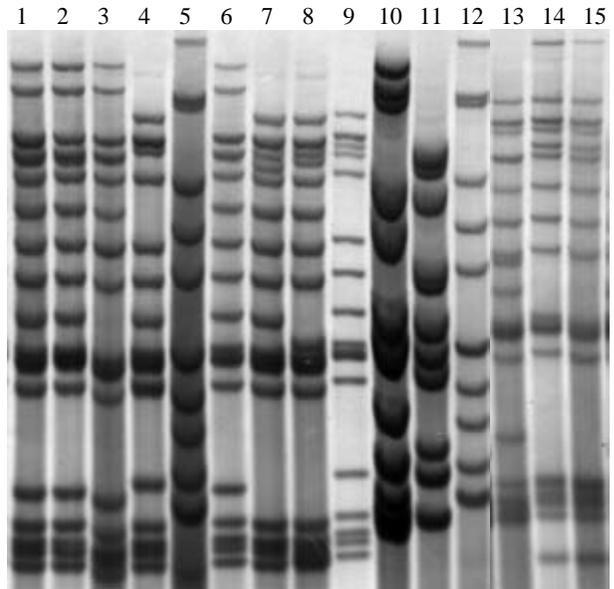
Число копий <i>IS6110</i>	Профиль <i>IS6110</i> -RFLP	Число штаммов
17	Генотип В	
	В0	3
	В1	2
	В7	1
16	Генотип С	
	С1	1
	С8	1
	С7	1
15	Генотип А	
	А4	1

Таблица 3

Мутации в гене *groB* у МЛУ штаммов МБТ различных генотипов (n = 29)

Мутация в гене <i>groB</i>	Число штаммов	Генотип	
		Beijing	не Beijing
531TCG → TTG	24	22	2
526CAC → GAC	2	1	1
516GAC → GTC	3	2	1

Как видно из табл. 1, подавляющее большинство (92,5 %) МЛУ штаммов (n = 54) и половина полирезистентных штаммов по результатам генотипирования принадлежат к генетическому семейству Beijing. У 36 (87,8 %) из 41 ЛЧ штамма выявлены другие генотипы (не Beijing). Из 54 МЛУ штаммов 37 (68,5 %) обладали тотальной устойчивостью к ПТП I ряда.



Электрофореграмма профилей ДНК штаммов МБТ различных генотипов (метод *IS6110*-RFLP): Дорожки: 1, 2, 6 – В0; 3 – С1; 4 – А4; 5, 12 – маркер (ДНК штамма *M. t.* 14323); 7 – С8; 8 – С30; 9 – С7; 10, 11 – не Beijing; 13 – В7; 14, 15 – В1. Обозначения профилей указаны согласно базе данных лаборатории молекулярной микробиологии ФГУН «СПбНИИЭМ им. Пастера» Роспотребнадзора

Из 11 штаммов генетического семейства Beijing, изученных методом *IS6110*-RFLP, 6 штаммов представляют варианты генотипа В, 4 – генотипа С и 1 штамм – генотипа А (табл. 2). Принадлежность штаммов Beijing к определенному генотипу (и его вариантам) обусловлена различиями в количестве и расположении копий элемента *IS6110* на хромосоме бактерии. Несмотря на варибельность профилей *IS6110* (см. рисунок), изученные штаммы Beijing являются генетически близкородственными, что свидетельствует об эндемическом характере циркуляции штаммов данного генотипа на территории Карелии и согласуется с существующими представлениями о единстве происхождения и последующей клональной диссеминации МБТ генотипа Beijing [3], [9].

У 29 штаммов МБТ, обладавших МЛУ по результатам определения устойчивости к препаратам методом абсолютных концентраций, в гене *groB* был изучен спектр мутаций, контролирующей устойчивость к рифампицину. Из 29 штаммов 25 принадлежали к генотипу Beijing. Как видно из табл. 3, установлено полное совпадение результатов определения устойчивости к препарату с помощью культурального и молекулярно-генетического методов. Устойчивость к рифампицину подавляющего большинства (22 из 25) штаммов генотипа Beijing была обусловлена мутацией TCG(Ser) → TTG(Leu) в кодоне 531, ассоциированной с высоким уровнем устойчивости к рифампицину и кросс-резистентностью к рифабутинам, что согласуется с опубликованными ранее данными о доминировании данной мутации у

штаммов российской популяции МЛУ МБТ генетического семейства Beijing [3], [7].

ВЫВОДЫ

1. Среди штаммов МЛУ МБТ, выделенных от впервые выявленных больных туберкулезом легких на территории Республики Карелия, доминируют штаммы генотипа Beijing.

2. Устойчивость к рифампицину у абсолютного большинства изученных штаммов МЛУ МБТ генотипа Beijing обусловлена мутацией TCG(Ser) → TTG(Leu) в кодоне 531 гена *rpoB*, ассоциированной с высоким уровнем устойчивости к рифампицину и кросс-резистентностью к рифабутинам.

Циркуляция МЛУ штаммов МБТ генотипа Beijing представляет эпидемическую угрозу в плане распространения МЛУ-ТБ в Карелии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вишневский Б. И., Иванов Л. И., Колечко Н. Г. и др. Клиническое значение микобактерий туберкулеза с различными биологическими свойствами // Проблемы туберкулеза. 1991. № 4. С. 51–55.
2. Журавлев В. Ю., Нарвская О. В., Вязовая А. А., Мокроусов И. В., Оттен Т. Ф., Вишневский Б. И. Молекулярно-генетические технологии в этиологической диагностике диссеминированного туберкулеза легких // Журнал микробиологии. 2010. № 3. С. 77–81.
3. Нарвская О. В. Геномный полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis* и его значение в эпидемическом процессе: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 2003. 35 с.
4. Пунга В. В., Ерохин В. В., Нагорная Е. Д. и др. Итоги и опыт работы ЦНИИТ РАМН в пилотных территориях по контролю за выявлением и лечением туберкулеза (когортный анализ) // Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2006. № 8. С. 6–8.
5. Самойлова А. Г., Марьяндышев А. О. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза – актуальная проблема фтизиатрии // Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2005. № 7. С. 3–9.
6. Скворцова Л. А., Павлова М. В., Сапожникова Н. В. и др. Показатели иммунитета и биологические свойства микобактерий при инфильтративном туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезни легких. 2005. № 11. С. 6–9.
7. Тунгусова О. С. Бактериология и молекулярная генетика микобактерий туберкулеза. Архангельск: Изд. центр СГМУ, 2003. 102 с.
8. Glynn J., Whitley J., Bifani P. et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review // Emerg. Infect. Dis. 2002. Vol. 8. P. 843–849.
9. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A. et al. PCR-based methodology for detecting multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family circulating in Russia // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2003. Vol. 22. P. 342–348.
10. Van Embden J., Cave D., Crawford J. et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology // J. Clin. Microbiol. 1993. Vol. 31. № 2. P. 406–409.