

УДК 616-002.5-078

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДОМ
АБСОЛЮТНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ И ГИБРИДИЗАЦИОННОГО
АНАЛИЗА НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПАХ

Т.В. Умпелева, К.В. Белоусова, Н.И. Еремеева, Л.А. Голубева,
Д.В.Вахрушева

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт
фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, г. Екатеринбург, Лаборатория экспериментальных и
диагностических методов исследования

Резюме. Проведено исследование 179 образцов клинического материала на наличие детерминант устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, аминогликозидам и этамбутолу и принадлежность к определенным генотипам с использованием набора «ТБ-ТЕСТ». Для 54 образцов произведено сопоставление с результатами микробиологического исследования. Установлено, что большинство проб (84,9%) принадлежат к генетической группе Beijing. 77,1% образцов обладали множественной, а 16,2% образцов – широкой лекарственной устойчивостью. Показана высокая корреляция между результатами определения лекарственной устойчивости молекулярно-генетическими и культуральными методами к рифампицину и изониазиду, при этом доминирующими мутациями были *katGS315T1* и *rpoBS531L*.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, лекарственная устойчивость, биочипы, метод абсолютных концентраций, генотип.

COMPARISON OF DETERMINATION RESULTS OF DRUG RESISTANCE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY ABSOLUTE CONCENTRATION
METHOD AND HYBRIDIZATION ANALYSIS ON BIOLOGICAL
MICROCHIPS

T.V. Umpeleva, K.V. Belousova, N.I. Eremeeva, L.A. Golubeva, D.V.
Vakhrusheva

Ural Research Institute for Phthisiopulmonology, Yekaterinburg, Russian
Federation

Laboratory of experimental and diagnostic methods of research

Summary

Comparison of determination results of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* by absolute concentration method and hybridization analysis on biological microchips

T.V. Umpeleva, K.V. Belousova, N.I. Eremeeva, L.A. Golubeva, D.V.
Vakhrusheva

A study was made of 179 samples of clinical material for the presence of determinants of drug resistance to rifampicin, isoniazid, fluoroquinolones, aminoglycosides and ethambutol and belonging to certain genotypes using the «TB-TEST» kit. For 54 samples, a comparison was made with the results of a microbiological study. It was found that the majority of samples (84.9%) belong to the genetic family Beijing. 77.1% of the samples had multi and 16.2% - extensively drug resistance. A high correlation between the results of the determination of drug resistance by molecular genetic and cultural methods for rifampicin and isoniazid was shown, with the dominant mutations being katGS315T1 and rpoBS531L.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, drug resistance, biochips, absolute concentration method, genotype.

Введение.

Несмотря на устойчивую тенденцию к снижению заболеваемости туберкулезом, в России отмечается рост случаев заболевания туберкулезом с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя [1]. В сложившейся ситуации особенно актуальным становится вопрос внедрения ускоренных методов выявления возбудителя туберкулеза и определения спектра его устойчивости к максимальному количеству противотуберкулезных препаратов. На территории Российской Федерации зарегистрировано несколько технологий, позволяющих выявлять мутации устойчивости к противотуберкулезным препаратам (ПТП): картриджная технология; технология на основе ПЦР в режиме реального времени; гибридизационные технологии с использованием ДНК-стрипов и биологических микрочипов.

В своей работе мы произвели анализ результатов определения лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза с использованием метода абсолютных концентраций в качестве «золотого стандарта» и новой молекулярно-генетической тест-системы «ТБ-ТЕСТ» («БИОЧИП-ИМБ», Россия), позволяющей выявлять наличие мутаций, ассоциированных с устойчивостью к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, этамбутолу, аминогликозидам/циклическим пептидам и одновременно устанавливать генотип возбудителя.

Материалы и методы исследования

Произведен анализ результатов исследования 179 образцов клинического материала (102 (57,0%) – операционный материал (легочный), 31 (17,3%) – операционный материал (костный), 42 (23,5%) – респираторный материал, 4 (2,2%) – другие виды материала), полученных от пациентов, госпитализированных по поводу туберкулеза в ФГБУ «УНИИФ», г. Екатеринбург. Молекулярно-генетические и культуральные исследования проводили из одной порции клинического материала. При этом, в случае исследования респираторного и другого «жидкого» материала производили

деление осадка после обработки образца BD BBL™ MycoPrep™ system. Операционный материал первоначально делили на порции с последующей гомогенизацией в инактивирующем реагенте (НПК Синтол, Россия) для молекулярно-генетических исследований (МГИ) и в 10% Na₃PO₄ для посева на плотные питательные среды. Выделение ДНК и ПЦР проводили с использованием набора «Амплитуб-РВ» (НПК Синтол, Россия), по результатам которой для анализа отбирали образцы, содержащие ДНК *M.tuberculosis complex* с концентрацией не менее 10²-10³ копий/мл, что позволило провести дальнейшее исследование на наличие мутаций с использованием тест-системы «ТБ-ТЕСТ». Исследование с помощью тест-системы «ТБ-ТЕСТ» проводилось по методике, рекомендованной производителем.

В случае получения культуры на плотной питательной среде проводили определение лекарственной чувствительности методом абсолютных концентраций к ПТП в следующих концентрациях: изониазид – 1 и 10 мкг/мл, рифампицин – 40 мкг/мл, этамбутол – 2 и 5 мкг/мл, канамицин – 30 мкг/мл, капреомицин – 30 мкг/мл, офлоксацин – 2 и 10 мкг/мл.

Результаты

Из 179 образцов клинического материала, в которых была выявлена ДНК *M. tuberculosis complex* и выявлено наличие либо отсутствие мутаций устойчивости к ПТП, культуры микобактерий были получены лишь из 54 образцов (30,2%).

Среди всех образцов по результатам молекулярно-генетического исследования 77,1% обладали множественной лекарственной устойчивостью, из них 16,2% содержали мутации, обуславливающие широкую лекарственную устойчивость. В 16,8% образцов мутации, ассоциированные с лекарственной устойчивостью, найдены не были. 6,1% образцов имели мутации моно- и полирезистентности.

Наиболее часто встретившимися заменами, обуславливающими устойчивость к изониазиду и рифампицину, были: *katGS315T1* (95,9%) и *rpoBS531L*

(87,0%) соответственно. Совпадение между наличием мутаций и фенотипической лекарственной устойчивостью, полученной методом абсолютных концентраций, для этих препаратов было высоким и составило 98,1% для рифампицина и 100,0% для изониазида (Табл. 1 и 2). Ранее уже было показано, что данные мутации обуславливают устойчивость к высоким концентрациям изониазида и рифампицина, не снижая при этом жизнеспособности микобактерий, и что они ассоциированы с принадлежностью изолятов к генетической группе Beijing [2-5].

Выявление мутаций в генах *gyrA* (15 замен) и *gyrB* (23 замены) с помощью набора «ТБ-ТЕСТ» ассоциировано с устойчивостью к фторхинолонам. В данной выборке изолятов было выявлено 8 замен в гене *gyrA* и 4 мутации в гене *gyrB*, у трех изолятов выявлено сочетание мутаций в этих генах. Из 29 образцов, содержащих мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам, у 3 (10,3%) фенотипической устойчивости методом абсолютных концентраций обнаружено не было, а из 25 образцов без мутаций в указанных генах в пяти (20,0%) случаях культурально была определена устойчивость. В литературе обсуждается вопрос о связи между типом выявленной мутации и эффективной концентрацией разных фторхинолонов. Так, высокий уровень устойчивости ассоциирован с заменами D94 (D94G, D94Y, D94N) [6]. В нашей работе указанные мутации выявлены у 36 (69,2%) изолятов, наиболее частая замена *gyrAD94G S95T* – у 29 (16,2%) (Табл. 3). Сопоставление результатов молекулярно-генетического и культурального исследований показало, что у 12 (63,0%) изолятов с заменами D94G, D94Y, D94N наблюдается фенотипическая устойчивость к офлоксацину в концентрации 10 мкг/мл. Совпадение между наличием мутаций и фенотипической лекарственной устойчивостью, полученной методом абсолютных концентраций, для фторхинолонов при концентрации 2 мкг/мл составило 85,2%, при концентрации 10 мкг/мл – 70,4%, в среднем – 77,8%.

По данным литературы высокий уровень устойчивости к канамицину и капреомицину обуславливается мутацией в гене *rrs* [7-8], низкий уровень устойчивости к канамицину связан с заменами в гене *eis* [9-10]. В нашей выборке среди 30 (55,6%) изолятов с мутациями в *rrs* и *eis* генах, 6 (20,0%) были фенотипически чувствительными, при этом все они содержали мутации в гене *eis*. У 3 (12,5%) изолятов без мутаций культурально была выявлена лекарственная устойчивость. Среди 10 (33,3%) изолятов с мутацией *a1401g* гена *rrs* только 7 (70,0%) обладали фенотипической устойчивостью к капреомицину, и у 6 (13,6%) изолятов, не содержащих мутации в этом гене, методом абсолютных концентраций была установлена устойчивость (Табл. 4). Возможно, разная степень устойчивости, обусловленная разными типами замен, объясняет определенный процент расхождения результатов молекулярно-генетического и культурального исследования. Так, ранее уже было отмечено, что результаты метода микро разведений, например, теста Sensititre MucosTB Plate, для определения уровня устойчивости лучше коррелируют с выявленными мутациями [6]. Накопление и обобщение данных о типах мутаций и связанной с ними степенью лекарственной устойчивости крайне важны для выбора режимов химиотерапии, особенно в случаях туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. Совпадение между наличием мутаций и фенотипической лекарственной устойчивостью, полученной методом абсолютных концентраций, для канамицина и капреомицина составило 83,3% (Табл. 4).

Набор «ТБ-ТЕСТ» позволяет диагностировать большой спектр мутаций устойчивости к этамбутолу – 23, однако согласно данным литературы не всегда наблюдается корреляция между наличием мутаций и фенотипической устойчивостью [11-12]. Согласно инструкции к набору «ТБ-ТЕСТ» чувствительность определения устойчивости к этамбутолу составляет 60,0%. В нашем исследовании было выявлено 9 замен в гене *embB*, из них наиболее часто встречающаяся замена – M306V (50,0%) (Табл. 5). Однако среди

изолятов с выявленными мутациями у 22 (50,0%) лекарственная устойчивость методом абсолютных концентраций подтверждена не была, а среди 10 изолятов без мутаций 3 (30,0%) обладали фенотипической устойчивостью. Совпадение между наличием мутаций и фенотипической лекарственной устойчивостью, полученной методом абсолютных концентраций, для этамбутола составило 53,7% (Табл. 5).

Определение генетической принадлежности изолятов на основе SNP анализа позволило установить принадлежность 152 (84,9%) изолятов к генетической группе Beijing, из них 82 (53,9%) принадлежали к кластеру BeijingB0. Остальные выявленные генотипы: Ural – 9 (5,0%), LAM – 8 (4,5%), Haarlem–1 (0,6%). У 9 (5,0%) изолятов генотип не определен. Высокую долю изолятов Beijing и, в частности, BeijingB0 можно объяснить контингентом обследованных больных, большинство из которых были ранее принимавшими ПТП пациентами, направленными на оперативный этап лечения.

Заключение

Проведенный нами анализ показал высокий уровень совпадения результатов выявления мутаций с использованием набора «ТБ-ТЕСТ» и культуральных тестов устойчивости к рифампицину и изониазиду.

Совпадение между наличием мутаций и фенотипической лекарственной устойчивостью, полученной методом абсолютных концентраций, для фторхинолонов, канамицина/капреомицина и этамбутола составила 77,8%, 83,3% и 53,7%, соответственно.

Тест-система «ТБ-ТЕСТ» позволяет надежно выявлять мутации в наиболее значимых кодонах основных генов, ассоциированные с устойчивостью к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, этамбутолу, аминогликозидам/циклическим пептидам и одновременно устанавливая генотип возбудителя, что способствует правильному и своевременному выбору препаратов для лечения больных и может помочь пресечь распространение микобактерий туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью.

Список литературы

1. Нечаева О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в России / О.Б. Нечаева http://tbhiv.ru/images/cms/data/docpdf/tub_epidsituaciya_2014.pdf (дата обращения 23.06.17).
2. Нарвская О.В. Геномный полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis* и его роль в эпидемическом процессе: дис. д-ра мед. наук. / О.В. Нарвская. СПб, 2003. С.173.
3. Салина Т.Ю., Морозова Т.И. Молекулярно-генетические особенности лекарственной устойчивости к рифампицину и распространенность мутаций в гене *rpoB* на территории Саратовской области // Туберкулез и болезни легких, 2014. №4. С. 22-25.
4. Умпелева Т.В., Вязовая А.А., Еремеева Н.И., Кравченко М.А., Нарвская О.В., Скорняков С.Н. Генетические особенности возбудителя туберкулеза в Уральском федеральном округе России // Туберкулез и болезни легких, 2016. Т. 94. №8. С.60-65.
5. Маничева О.А., Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Вязовая А.А., Журавлев В.Ю., Барнаулов А.О., Догондзе М.З., Оттен Т.Ф., Вишневский Б.И. Лекарственная устойчивость, жизнеспособность и вирулентность *in vitro* штаммов *Mycobacterium tuberculosis* различных генотипов // Инфекция и иммунитет, 2011. Т.1. №4. С. 341-348.
6. Носова Е.Ю., Хахалина А.А., Исакова А.И. и др. Одновременное определение генетических детерминант широкой лекарственной устойчивости и генотипирование *M. tuberculosis* с помощью гибридизационного анализа на биочипах // Туберкулез и социально-значимые заболевания, 2016. №2. С. 24-33.
7. Du Q., Dai G., Long Q. et al. *Mycobacterium tuberculosis* *rrs* A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin clinical isolates from mainland China. // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2013. Vol. 77. P. 138-142.

8. Georghiou S., Magana M., Garfein R. et al. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review // *PloS One*, 2012. Vol. 7. e33275.

9. Gikalo M., Nosova E., Krylova L., Moroz A. The role of *eis* mutations in the development of kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Moscow region // *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012. Vol. 67. N. 9. P. 2107-2109.

10. Zaunbrecher M., Sikes J., Metchock B. et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2009. Vol. 106. P. 20004-20009.

11. Park Y., Ryoo S., Lee S. et al. Correlation of the phenotypic ethambutol susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* with *embB* gene mutations in Korea // *J. Med. Microbiol.*, 2012. Vol. 61. N. 4. P. 529-534.

12. Plinke C., Rusch-Gerdes S., Niemann S. Significance of mutations in *embB* Codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006. Vol. 50. N. 5. P. 1900-1902.

Таблица 1

Спектр мутаций устойчивости к рифампицину и результаты, полученные культуральным методом

Тип мутации в гене <i>rpoB</i>	Количество изолятов с мутацией, абс. (%)	Количество изолятов с мутацией, получена культура, абс. (%)	Количество устойчивых/чувствительных изолятов методом абсолютных концентраций
S531L	120 (67,0)	47 (87,0)	46/1
H526L	7 (3,9)	3 (5,5)	3/0
D516Y	2 (1,1)	1 (1,9)	1/0
L511P	2 (1,1)	1 (1,9)	1/0
D516V	1(0,6)	0	
H526Y	2 (1,1)	0	
H526N	3 (1,7)	0	
N513K	1 (0,6)	0	
wt	41 (22,9)	2 (3,7)	0/2
Всего:	179 (100,0)	54 (100,0)	98,1%

Таблица 2

Спектр мутаций устойчивости к изониазиду и результаты, полученные культуральным методом

Тип мутации в гене katG/inhA	Количество изолятов с мутацией, абс. (%)	Количество изолятов с мутацией, получена культура, абс. (%)	Количество устойчивых/чувствительных изолятов методом абсолютных концентраций
S315T(1)	118 (65,9)	41 (75,9)	41/0
S315T(1) T15	14 (7,8)	8 (14,8)	8/0
S315T(1) G8	8 (4,4)	2 (3,7)	2/0
S315T(1), inhA_A8	1 (0,6)	1 (1,9)	1/0
S315T(1), I335V	1 (0,6)	0	
T15	1 (0,6)	0	
G8	1 (0,6)	0	
S315G , T15	1 (0,6)	0	
S315T2	1 (0,6)	0	
S315G	2 (1,1)	0	
wt	31 (17,2)	2 (3,7)	0/2
Всего:	179 (100,0)	54 (100,0)	100,0%

Таблица 3

Спектр мутаций устойчивости к фторхинолонам и результаты, полученные культуральным методом

Тип мутации в генах gyrA/gyrB	Количество изолятов с мутацией, абс. (%)	Количество изолятов с мутацией, получена культура, абс. (%)	Количество устойчивых к 2 мкг/мл/ устойчивых к 10 мкг/мл/ чувствительных изолятов, методом абсолютных концентраций
A74S	1 (0,6)	1 (1,9)	1/0/0
A90G	1 (0,6)	0	
A90V	5 (2,7)	2 (3,6)	2/1/0
D94A 95	1 (0,6)	1 (1,9)	1/0/0
D94A S95T	1 (0,6)	1 (1,9)	1/1/0
D94G S95T	27 (15,0)	14 (25,8)	13/9/1
D94G S95T, A90G	1 (0,6)	0	
D94G S95T, S91P	1 (0,6)	1 (1,9)	1/0/0
D94N A90V	1 (0,6)	0	
D94N S95T	2 (1,1)	1 (1,9)	1/0/0
D94N S95T/R485C	1 (0,6)	1 (1,9)	1/1/0
D94Y	1 (0,6)	0	
D94Y S95T	2 (0,6)	2 (3,6)	2/2/0
N538T	1 (0,6)	1 (1,9)	1/0/0
D500N	1 (0,6)	1 (1,9)	1/0/0
R485C	1 (0,6)	1 (1,9)	0/0/1
S486F	2 (1,1)	0	
S91P/N538T	1 (0,6)	1 (1,9)	1/0/0
S91P/S486F	1 (0,6)	1 (1,9)	0/0/1
wt	127 (70,8)	25 (46,2)	5/1/20
Всего:	179 (100,0)	54 (100,0)	77,8%

Таблица 4. Спектр мутаций устойчивости к аминогликозидам/циклическим пептидам и результаты, полученные культуральным методом

Тип мутации в генах <i>rrs/eis</i>	Количество изолятов с мутацией, абс. (%)	Количество изолятов с мутацией, получена культура, абс. (%)	Количество устойчивых/чувствительных изолятов к канамицину методом абсолютных концентраций	Количество устойчивых/чувствительных изолятов к капреомицину методом абсолютных концентраций
a1401g	26 (14,5)	10 (18,6)	10/0	7/3
a1401g g37t	1 (0,6)	0		
c12t	6 (3,4)	2 (3,6)	1/1	0/2
c14t	11 (6,1)	6 (11,1)	3/3	2/4
g10a	20 (11,2)	10 (18,6)	8/2	2/8
g37t	10 (5,6)	2 (3,6)	2/0	1/1
wt	105 (58,6)	24 (44,5)	3/21	1/23
Всего:	179 (100,0)	54 (100,0)	83,3%	83,3%

Таблица 5. Спектр мутаций устойчивости к этамбутолу и результаты, полученные культуральным методом

Тип мутации в гене <i>embB</i>	Количество изолятов с мутацией, абс. (%)	Количество изолятов с мутацией, получена культура, абс. (%)	Метод абсолютных концентраций количество устойчивых/чувствительных изолятов
D354A	6 (3,4)	4 (7,4)	0/4
G406A	4 (2,2)	1 (1,9)	0/1
G406D	5 (2,7)	0	
M306I1	6 (3,4)	4 (7,4)	0/4
M306I2	2 (1,1)	1 (1,9)	1/0
M306V	58 (32,4)	22 (40,8)	14/8
N296H	1 (0,6)	0	
Q497K	9 (5,0)	2 (3,6)	1/1
Q497R	25 (14,0)	10 (18,5)	6/4
wt	63 (35,2)	10 (18,5)	3/7
Всего:	179 (100,0)	54 (100,0)	53,7%

Ответственный для переписки: Умпелева Татьяна Валерьевна,
tumpelva@yandex.ru