

**В. С. Крутько, М. Л. Филипенко, А. А. Ляшенко, М. А. Рот, П. И. Потейко,
А. В. Стадникова, Д. А. Кашуба, В. Е. Кульшин, Н. П. Сьома, Н. И. Омельченко,
Е. П. Александрова, И. Ю. Горячева**
ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ К ИЗОНИАЗИДУ ШТАММОВ
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В Г. ХАРЬКОВЕ

*Харьковская медицинская академия последипломного образования
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
Централизованная бактериологическая лаборатория, г. Харьков*

Одной из главных особенностей туберкулеза в современных условиях является рост количества больных с медикаментозной устойчивостью возбудителя. В Украине, по данным Ю. И. Фещенко и соавт. [4], первичная устойчивость микобактерий туберкулеза (МБТ) к антимикобактериальным препаратам (АП) выявляется у 20–30 %, вторичная — до 75 % больных туберкулезом легких. Эффективность лечения больных с лекарственноустойчивым туберкулезом резко снижается, в особенности при устойчивости МБТ к основным противотуберкулезным препаратам — изониазиду и рифампицину. Установление медикаментозной чувствительности МБТ имеет существенное значение для правильного выбора стратегии лечения.

"Золотым стандартом" установления устойчивости МБТ к АП является унифицированный культуральный метод определения лекарственной чувствительности МБТ к АП на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена, принятый ВОЗ за международный стандарт. Результат анализа при использовании этого метода получают через 2–3 месяца; в месте с тем метод достаточно дорогостоящий [2].

В настоящее время разработаны новые методы выявления устойчивости МБТ, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), с помощью которых выявляют мутации в генах микобактерий, ответственных за устойчивость МБТ к АП. Эти методики позволяют значительно сократить время исследования и получить результат на 2–3 день [3].

Устойчивость МБТ к изониазиду возникает в результате появления мутаций в генах *katG*, *inhA*, *kasA*, и *hcrS* [1, 5, 9, 10, 11, 12]. Чаще всего (до 90 %) устойчивость к изониазиду обусловлена мутациями в гене *katG* [8].

Цель работы: оптимизация выявления устойчивости МБТ к изониазиду.

Задачи:

1. Определение устойчивости МБТ к изониазиду унифицированным культуральным методом на среде Левенштейна-Йенсена.

2. Определение устойчивости МБТ к изониазиду с помощью детекции замены Ser315Thr в гене *katG*.

3. Сопоставление полученных данных.

Материалы и методы

Материалом являлись культуры МБТ, выделенные от 80 больных туберкулезом легких, находившихся на лечении в противотуберкулезных учреждениях г. Харькова в 2004 году. Образцы культур отбирались в Централизованной городской бактериологической лаборатории г. Харькова. Среди пациентов преобладали мужчины —

65 (81 %). По типу туберкулезного процесса обследованные больные распределились следующим образом: впервые диагностированный туберкулез был у 34 (43 %), рецидив туберкулеза — у 24 (30 %), хронический туберкулез — у 22 (27 %). Преобладал инфильтративный туберкулез — 52 (65 %); диссеминированный туберкулез легких был у 5 (6 %), фиброзно-кавернозный — у 21 (26 %), казеозная пневмония — у 2 (3 %) больных. Деструктивные изменения в легких были обнаружены у всех обследованных больных. Таким образом, в выборку были включены больные с распространенными деструктивными формами туберкулеза легких всех типов процесса.

Культуральным методом чувствительность МБТ определялась к следующим АП: изониазиду, рифампицину, стрептомицину, этамбутолу, канамицину, этионамиду. Культура МБТ считалась устойчивой при прекращении бактериального роста в присутствии изониазида в концентрации 1 мкг/мл., рифампицина — 20 мкг/мл., стрептомицина — 5 мкг/мл., этамбутола — 5 мкг/мл., канамицина — 30 мкг/мл. и этионамида — 30 мкг/мл.

Мутации в *katG* гене определяли методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) выделяли по методу Hellyer T. J., Fletcher T. W. (1996) [7, 13]. Для амплификации фрагмента ДНК, содержащего 315 кодон гена *katG*, использовали олигонуклеотидные праймеры, ограничивающие район 520 — 1020 п.н.: KatG-4 — AATC-GATGGGCTTCAAGACG, KatG-5 — CTCGTAGCCG-TACAGGATCTCG. Амплификацию проводили в 20 мкл буфера, содержащего 67 мМ Трис-НСl (рН 8.9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01 % Твин-20, 100 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеры, 2 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы в следующем режиме: денатурация — 3 мин на первом цикле и 20 сек на последующих 35-ти циклах при 95 °С; отжиг — 20 сек при 62 °С; элонгация — 20 сек при 72 °С. Для проведения ПЦР использовали ДНК-амплификатор фирмы "Eppendorf". Наличие продукта амплификации проверяли электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием [3]. Замена Ser315Thr (AGC > ACC) приводит к появлению дополнительного сайта для эндонуклеазы рестрикции MspI (CCGG). Таким образом, наличие данной мутации можно определить методом ПДРФ-анализа с помощью этого фермента. Рестрикцию проводили в объеме 15 мкл с использованием 10 мкл амплификационной смеси, содержащей фрагмент 520–1020 п.н. гена *katG*, 1 ед. акт. MspI добавляли дважды с интервалом 1 ч и инкубировали при 37 °С. Далее рестрикционную смесь анализировали электрофорезом в 8 % акриламидном геле.

Обсуждение результатов

Частота и характер медикаментозной чувствительности МБТ, полученных с помощью культурального метода, представлены в таблице 1.

© Крутько В. С., Филипенко М. Л., Ляшенко А. А., Рот М. А., Потейко П. И., Стадникова А. В., Кашуба Д. А., Кульшин В. Е., Сьома Н. П., Омельченко Н. И., Александрова Е. П., Горячева И. Ю., 2006

Таблиця 1

Частота и характер медикаментозной чувствительности МБТ по данным культурального метода

Общее число больных	Число больных с чувствительными к АП МБТ	Число больных с устойчивыми к АП МБТ	Характер устойчивости МБТ	
			монорезистентность	полирезистентность (в т.ч. мультирезистентность)
80	22	58	11	47 (39)
100 %	27,5 %	72,5 %	19 %	81 % (67 %)

Таблиця 2

Частота чувствительности МБТ к изониазиду по данным культурального и ПЦР методов

Культуральный метод		ПЦР-метод	
чувствительность	устойчивость	чувствительность	устойчивость
35 (44 %)	45 (56 %)	36 (45 %)	44 (55 %)

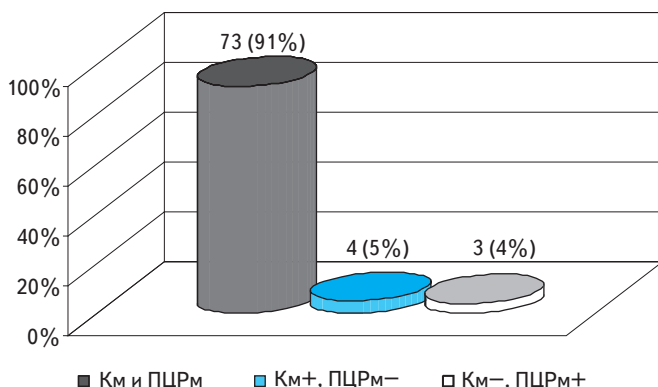


Рис. Результаты определения устойчивости МБТ к изониазиду культуральным методом (Км) и ПЦР методом (ПЦРм)

Км и ПЦРм — количество совпадений данных определения устойчивости к изониазиду по результатам культурального и ПЦР методов;

Км+, ПЦРм- — устойчивость к изониазиду, выявленная культуральным методом и не подтвержденная ПЦР методом;

Км-, ПЦРм+ — устойчивость к изониазиду, выявленная культуральным методом и не подтвержденная ПЦР методом.

Как видно из таблицы 1, у 27,5 % больных чувствительность МБТ к АП была сохранена. Монорезистентность МБТ во всех случаях наблюдалась к стрептомицину и составила 19 %. У 47 (81 %) полирезистентных изолятов выявлено 39 (67 %) случаев мультирезистентности (устойчивость как минимум к изониазиду и рифампицину).

Установлено, что при устойчивости к изониазиду в 91 % определялась устойчивость к рифампицину. Во всех случаях (100 %) устойчивости к рифампицину отмечалась устойчивость к изониазиду. В связи с этим, устойчивость к рифампицину можно рассматривать как маркер мультирезистентности, т. е. одновременной устойчивости МБТ к изониазиду. Полученные результаты согласуются с данным Baghdad J. El, N. Remus [6], в которых около 90 % рифампицин-устойчивых штаммов МБТ были резистентны и к изониазиду.

При сопоставлении данных культурального и ПЦР методов, выявлено, что устойчивость к изониазиду культуральным методом определялась в 45 изолятах (56 %), ПЦР-методом — в 44 (55 %). В 4 (9 %) из 45 случаев устойчивости к изониазиду по данным культурального метода мутации Ser315Thr в katG гене не было обнаружено. В 35 изолятах МБТ, чувствительных к АП по данным культурального метода, ПЦР анализ выявил наличие мутации Ser315Thr в katG гене в 3 (9 %) случаях. Общее число совпадений результатов определения чувствительности МБТ к изониазиду по данным культурального и ПЦР методов составило 73 (93 %) случая. Данные представлены на рис.

Можно предположить, что в 4-х случаях, когда устойчивость к изониазиду не была подтверждена ПЦР-методом, формирование устойчивости к изониазиду было обусловлено мутациями в других генах МБТ, которые не исследовались. В 3-х случаях, когда устойчивость к изониазиду была выявлена только ПЦР-методом, можно предположить о погрешности в методике проведения или пределом чувствительности культурального метода посева.

Выводы

1. Устойчивость МБТ к изониазиду культуральным методом установлена у 45 (56 %) изолятов.
2. Мутация Ser315Thr в гене katG, свидетельствующая об устойчивости МБТ к изониазиду найдена у 44 (55 %) изолятов.
3. При сопоставлении данных установлен 91 % совпадений результатов определения чувствительности культуральным методом и ПЦР-методом.
4. Полученные данные позволяют рекомендовать ПДРФ-анализ мутации Ser315Thr в гене katG в качестве быстрого метода определения устойчивости к изониазиду.
5. Результаты исследований свидетельствуют о том, что обнаружение устойчивости к рифампицину можно рассматривать как маркер мультирезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Біологічні властивості *M. tuberculosis*, виділених від хворих з первинною медикаментозною стійкістю / Журило О. А., Барбова А. І., Трофімова П. С., та ін. // Укр. пульмонол. журн. — 2005. — № 3. — С. 51–53.
2. "Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції", затверджена Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. — Київ, 2002. — 118 с.
3. Маниатис Т., Фрич Э. и Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — Москва: Мир, 1984. — 480 с.
4. Фещенко Ю. І., Мельник В. М. Медичні аспекти боротьби з туберкульозом. Укр. пульмонол. журн. — 2005. — № 2. — С. 5–8.
5. A Ser315Thr Substitution in KatG Is Predominant in Genetically Heterogeneous Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Originating from the St. Petersburg Area in Russia / Marttila H. J., Soini H., Eerola E., et al. // Antimicrob. Agents chemother. — 1998. — Vol. 42, № 9. — P. 2443–2445.

6. *Baghdadi J. El, N. Remus, L. Laaboudi, Benslimane A.* Chronic cases of tuberculosis in Casablanca, Morocco. *Int. j. tuberc. Lung. dis.* — 1995. — Vol. 7, № 7. — P. 660–664.
7. *DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis* / van Soolingen D, de Haas P. E., Hermans P. W., van Embden J. D. // *Methods Enzymol.* — 1994. — Vol. 235. — P. 196–205.
8. *KatG Mutations in Isoniazid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates Recovered from Finnish Patients* / Marttila H. J., Soini H. Huovinen P, Viljanen M. K. // *Antimicrob. Agents chemother.* — 1996. — Vol. 40, № 9. — P. 2187–2189.
9. *Molecular Analysis of katG Gene Mutations in Strains of Mycobacterium tuberculosis Complex from Africa* / Haas W.H., Schilke K., Brand J., et al. // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* — 1997. — Vol. 41, № 7. — P. 1601–1603.
10. *Mutations in katG, inhA, and ahpC Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant Isolates of Mycobacterium tuberculosis* / Silva M.S., Sena S.G., Ribeiro M.O., et al. // *Journal of clinical microbiology.* — 2003. — Vol. 41, № 9. — P. 4471–4474.
11. *Ramaswami, S., and J. M. Musser.* Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Tuber. Lung Dis.* — 1998. — Vol. 79, № 3. — P. 28–29.
12. *Slayden, R. A., C. E. Barry I.* The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Microbes Infect.* — 2000. — Vol. 2., P. 659–669.
13. *Strand displacement amplification and the polymerase chain reaction for monitoring response to treatment in patients with pulmonary tuberculosis* / Hellyer T. J., Fletcher T. W., Bates J. H., Stead W. W. et al. // *J Infect Dis.* — 1996. — Vol. 173, № 4. — P. 934–941.

ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ К ИЗОНИАЗИДУ ШТАММОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В Г. ХАРЬКОВЕ

**В. С. Крутько, М. Л. Филипенко,
А. А. Ляшенко, М. А. Рот, П. И. Потейко,
А. В. Стаднікова, Д. А. Кашуба,
В. Е. Кульшин, Н. П. Сьома, Н. И. Омельченко,
Е. П. Александрова, И. Ю. Горячева**

Резюме

Исследовано 80 изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, которые выделены от больных деструктивным туберкулезом легких в г. Харькове. Для каждого изолята определена стойкость к изониазиду унифицированным методом абсолютных концентраций в среде Левенштейна-Йенсена и параллельно исследовали ПДРФ-анализом наличие замены Ser315Thr в katG гена, ассоциированного со стойкостью МТБ к изониазиду. Выявлена высокая корреляция между данными, полученными этими методами, что позволяет рекомендовать ДРФ-анализ как наиболее быстрый метод определения стойкости к изониазиду.

CHARACTERISTICS OF DRUG RESISTANCE TO ISONIAZID OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLATES, PREVALENT IN CITY OF KHARKIV

**V. S. Krutko, M. L. Filipenko,
O. O. Ljashenko, M. A. Rot, P. I. Poteyko,
A. V. Stadnikova, D. O. Kashuba, V. E. Kulshin,
N. P. Syoma, N. I. Omelchenko,
E. P. Alexandrova, I. Y. Gorjacheva**

Summary

80 isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, selected from the patients with pulmonary tuberculosis from Kharkiv were studied. Drug resistance was assessed for each isolate using a standard method of absolute concentrations on Lowenstein-Jensen medium. Simultaneously the mutation Ser315Thr in katG, associated with a resistance to isoniazid, was determined. High correlation between these two methods was established. These data allow us to recommend the PCR method as faster and cheaper one to determine isoniazid resistance.