

А. І. Барбова, О. А. Журило, П. С. Трофімова, С. В. Миронченко
ПОРІВНЯЛЬНІ РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ ТА ФЕНОТИПІЧНИМИ МЕТОДАМИ ДОСЛІДЖЕННЯ

ДУ «Національний інститут фізіотерпії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського НАМН України»

На сьогоднішній день туберкульоз з множинною МС залишається однією з актуальних проблем сучасної охорони здоров'я. В структурі МС збудника туберкульозу рівень мультирезистентних штамів залишається високим, також зростає питома вага штамів *M. tuberculosis* з розширеною медикаментозною стійкістю. У зв'язку з цим лікування таких випадків туберкульозу викликає певні труднощі, вимагає значних матеріальних витрат і підтримує несприятливу епідеміологічну ситуацію з подальшим поширенням хіміорезистентного туберкульозу [1, 3].

Необхідно відмітити, що для отримання репрезентативних даних щодо розповсюдження штамів *M. tuberculosis* з МС та призначення ефективного та своєчасного лікування в будь-якій країні повинні бути налагоджені стандартні методики виконання ТМЧ циркулюючих штамів *M. tuberculosis* та здійснення зовнішньої оцінки якості таких досліджень [3].

Нині в світі для визначення МС збудника туберкульозу до ПТП 1-го і 2-го ряду використовуються фенотипічні методи з використанням рідких та щільних середовищ і молекулярно-генотипічні методи — ПЛР з використанням LPA технології та повногеномне секвенування [2]. Оскільки кожна з методик має свої переваги, недоліки та чутливість, вони застосовуються комплексно, а їх результати порівнюються.

Метою нашої роботи в цієї главі було проведення порівняльного аналізу між результатами МС штамів *M. tuberculosis*, що були виділені від хворих на туберкульоз легень, отриманими за допомогою молекулярно-генетичних і культуральних методів дослідження.

Матеріали і методи досліджень

Було досліджено та проаналізовано 1134 штами *M. tuberculosis* від хворих з новими випадками туберкульозу і раніше пролікованих хворих, що були включені до першого Національного дослідження з вивчення розповсюдженості хіміорезистентних штамів *M. tuberculosis* в Україні.

Визначення МС проводили на базі лабораторії мікробіології НІФП НАМНУ за допомогою мікробіологічного аналізатора ВАСТЕС 960 MGIT. Тестування проводили до наступних ПТП 1-го ряду: H і R; до ПТП 2-го ряду: OfI, MfX, Km, Am і капреоміцину (Cap).

Молекулярно-генетичні дослідження (повногеномне секвенування) проводились на базі Супранациональної лабораторії ВООЗ (м. Мілан, Італія). Застосування методу повногеномного секвенування дозволило виявити мутації, що впливають на геномні регіони, пов'язані з появою фенотипової МС *M. tuberculosis* і провести генотипування всіх виділених штамів *M. tuberculosis*, які отримані нами в результаті дослідження.

Проведені дослідження в подальшому дали можливість встановити кореляцію між результатами фенотипового і генотипового тестування МС збудника туберкульозу.

Хід дослідження складався з декількох послідовних етапів:

Виділення штамів *M. tuberculosis* в рідкому середовищі — Виділення ДНК *M. tuberculosis* — Секвенування ДНК *M. tuberculosis* — Аналіз — Інтерпретація результатів.

Секвенування проводилось за допомогою апарату Illumina HiSeq Rapid з використанням набору Nextera® XT DNA kit (Illumina). Аналіз повногеномного секвенування проводили шляхом суміщення геномної послідовності конкретного зразка із референсним геномом (H37Rv) для визначення варіантів, які могли б привести до фенотипових змін.

Обговорення результатів

В ході проведення досліджень виявлені наступні генотипи штамів МБТ (протиповано 1134 штами *M. tuberculosis*):

- Beijing (50,2 %);
- Euro-American Superlineage (16,8 %);
- LAM (14,9 %);
- Ural (9,6%);
- Haarlem (8,0 %);
- S-type (0,3%);
- nd (0,2%).

Відомо, що *M. tuberculosis* генотипу Beijing мають високу вірулентність, здібність інтенсивно розмножуватися в макрофагах та швидко адаптацію до імунної системи макроорганізму. Мікобактерії даного генотипу асоційовані з множинною медикаментозною резистентністю. Це пояснюється наявністю мутацій в генах, пов'язаних з системою репарації ДНК з однієї сторони, з іншої сторони — виникнення резистентних штамів пов'язане зі специфічністю будови клітинної стінки. В свою чергу, при лікуванні туберкульозу, що викликаний штамми з високою вірулентністю, зростає доза і тривалість прийому медикаментозних препаратів, що в свою чергу викликає МС [114]. Тому, високий рівень циркуляції хіміорезистентних штамів *M. tuberculosis* в Україні пов'язаний з тим, що 50,2 % з них відносяться до генотипу Beijing.

В ході дослідження було проведено визначення ролі виявлених в геномі мутацій в розвитку медикаментозної резистентності. Дані проведених досліджень щодо визначення резистентності до основних ПТП 1-го ряду — H і R наведені в табл. 1 і 2.

Інші мутації, що були виявлені: Val170Phe, InDel425, Leu430Pro, Leu430Pro+Met434Val, Leu430Pro+His445Asn,

Таблиця 1

Визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до рифампіцину; n = 1134; (M ± m) %

Результати медикаментозної резистентності <i>M. tuberculosis</i> за методами:						
фено-типичний		молекулярно-генетичний (мутації в гені <i>gyrB</i>)		співпадіння результатів		Найбільш поширені мутації
стійкі		стійкі		стійкі		
абс.	%	абс.	%	%		
357	31,5 ± 2,4 *	374	32,9 ± 2,4 *	95,5		Ser450Leu (249), Ser450Phe (38), Leu452Pro (13), Asp435Val (11)

Примітка. * p > 0,05 при порівнянні відповідних результатів стійкості.

Таблиця 2

Визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до ізоніазиду; n = 1134; (M ± m) %

Результати медикаментозної резистентності <i>M. tuberculosis</i> за методами:					Найбільш поширені мутації			
фено-типичний		молекулярно-генетичний (мутації в генах <i>katG</i> і <i>inhA</i>)		співпадіння результатів		<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>katG+inhA</i>
стійкі		стійкі		стійкі				
абс.	%	абс.	%	%				
475	41,9 ± 2,2 *	493	43,5 ± 2,2 *	96,3		Ser315Thr+c-15t (102), Ser315Thr+c-15t+t-8c (1), Ser315Thr+t-8c (4), Ser315Thr+Ser94Ala (1)	c-15t (12), t-8c (4), t-8g (1), lle21Thr(2), lle21Val (2)	Ser315Thr+c-15t (102), Ser315Thr+c-15t+t-8c (1), Ser315Thr+t-8c (4), Ser315Thr+Ser94Ala (1)

Примітка. * p > 0,05 при порівнянні відповідних результатів стійкості.

Met434Leu+His445Asn, Asp435Tyr, Ser441Gln, His445Arg, His445Asn, His445Asn+Ile491Met, His445Asp, His445Leu, His445Ser, His445Ser+Lys446Gln, His445Thr, His445Tyr, Arg448Lys, Ser450Leu+Ile491Val, Ser450Trp.

За даними табл. 1 видно, що при тестуванні штамів *M. tuberculosis* щодо визначення MC до R фенотиповим і молекулярно-генетичним методами виявлений високий відсоток співпадіння результатів тестування — 95,5 %.

З табл. 2 видно, що мутації, які асоційовані з резистентністю до H, зустрічаються найчастіше в гені *katG*. В наших дослідженнях було виявлено 346 таких мутацій, при цьому 345 були виявлені в 315-му кодоні — мутація Ser315Thr. За даними літератури ця мутація є одною з основних причин стійкості *M. tuberculosis* до H. Вивчення її розповсюдження є важливим, оскільки штами з цією мутацією зберігають повну вірулентність, характеризуються високим рівнем медикаментозної резистентності до H і частіше за все являються мультирезистентними штамми [5].

Ізольована мутація гена *inhA* була виявлена в 21 випадку, що свідчить про наявність штамів *M. tuberculosis*, стійких до H, в яких відсутня активність ферменту каталази-пероксидази, що кодується геном *katG*. Мутації тільки на рівні *inhA*, як правило, асоціюються з низькою стійкістю до H.

Як видно з табл. 1 і 2, не виявлено достовірної різниці між показниками визначення медикаментозної резис-

тентності штамів *M. tuberculosis* до R і H при дослідженні молекулярно-генетичними та культуральними методами.

З даних табл. 3 видно, що більшість мутацій (52), що свідчать про стійкість штамів *M. tuberculosis* до OfI виявлені в гені *gyrA*. В гені *gyrB* виявлено всього 3 мутації, що не є значущим фактором щодо формування резистентності до OfI.

Таблиця 3

Визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до офлоксацину; n = 1134; (M ± m) %

Результати медикаментозної резистентності <i>M. tuberculosis</i> за методами:					Найбільш поширені мутації			
фено-типичний		молекулярно-генетичний (мутації в генах <i>gyrA</i> і <i>gyrB</i>)		співпадіння результатів		<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gyrA+gyrB</i>
стійкі		стійкі		стійкі				
абс.	%	абс.	%	%				
67	5,9 ± 2,8 *	72	6,3 ± 2,8 *	93,1		Asp94Gly (34), Asp94Ala (10), Ala90Val (8) Ser91Pro, Asp94Asn, Ala90Val+Ser91Pro, Asp94Ala+Asp94Gly	Glu501Asp (2), Asp461His (1)	Asp94Asn+Glu501Asp, Asp94Gly+Thr500Pro, Ala90Val+Glu501Asp

Примітка. * p > 0,05 при порівнянні відповідних результатів стійкості.

З даних табл. 4 видно, що більшість мутацій, що свідчать про стійкість штамів *M. tuberculosis* до MfI виявлені в гені *gyrA*.

Таблиця 4

Визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до моксифлоксацину; n = 826; (M ± m) %

Результати медикаментозної резистентності <i>M. tuberculosis</i> за методами:					Найбільш поширені мутації			
фено-типичний		молекулярно-генетичний (мутації в генах <i>gyrA</i> і <i>gyrB</i>)		співпадіння результатів		<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gyrA+gyrB</i>
стійкі		стійкі		стійкі				
абс.	%	абс.	%	%				
57	6,9 ± 3,3 *	71	8,6 ± 3,3 *	80,3		Asp94Gly (28), Asp94Ala (7), Ala90Val (7)	Glu501Asp (2)	Asp94Asn+Glu501Asp, Asp94Gly+Thr500Pro, Ala90Val+Glu501Asp

Примітка. * p > 0,05 при порівнянні відповідних результатів стійкості.

Як видно з таблиць 3 і 4 достовірної різниці між показниками визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до фторхінолонових антибіотиків, які були отримані при проведенні молекулярно-генетичних та культуральних методів дослідження не виявлено.

Як видно з табл. 5 молекулярно-генетична резистентність штамів *M. tuberculosis* до Km асоційована з двома генами — *rrs* і *eis*, кількість мутацій в яких були виявлені в нашому дослідженні — 56 та 63 відповідно.

Таблиця 5

Визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до канаміцину; n = 1134; (M ± m) %

Результати медикаментозної резистентності <i>M. tuberculosis</i> за методами:					Найбільш поширені мутації		
фенотипічний		генотипічний (мутації rrs і eis)		співпадіння результатів	rrs	Eis	rrs+eis
стійкі		стійкі		стійкі	a1401g (56)	g-37t (17), g-10a (15), c-14t (11), c-12t (13), g-10c (1), InDel+8 (5), InDel-7 (1)	a1401g+g-10c (1)
абс.	%	абс.	%	%			
120	10,6 ± 2,8 *	127	11,3 ± 2,8 *	94,5			

Примітка. * p > 0,05 при порівнянні відповідних результатів стійкості.

Як видно з табл. 6 молекулярно-генетична резистентність штамів *M. tuberculosis* до Am асоційована з геном — rrs. Достовірної різниці між показниками визначення медикаментозної резистентності до Am, які були отримані при проведенні молекулярно-генетичних та культуральних методів дослідження не виявлено.

Таблиця 6

Визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до амікацину; n = 1128; (M ± m) %

Результати медикаментозної резистентності штамів <i>M. tuberculosis</i> за методами:					Найбільш поширені мутації	
фенотипічний		молекулярно-генотипічний (мутації в гені rrs)		співпадіння результатів		
стійкі		стійкі		стійкі	a1401g (57)	
абс.	%	абс.	%	%		
57	5,1 ± 2,9 *	60	5,3 ± 2,9 *	95,0		

Примітка. * p > 0,05 при порівнянні відповідних результатів стійкості.

Як видно з табл. 7 молекулярно-генетична резистентність штамів *M. tuberculosis* до Cap асоційована з геном — rrs. Достовірної різниці між показниками визна-

чення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до Am, які були отримані при проведенні молекулярно-генетичних та культуральних методів дослідження не виявлено.

Таблиця 7

Визначення медикаментозної резистентності штамів *M. tuberculosis* до амікацину; n = 1128; (M ± m) %

Результати медикаментозної резистентності штамів <i>M. tuberculosis</i> за методами:					
фенотипічний		молекулярно-генотипічний (мутації в гені rrs)		співпадіння результатів	Найбільш поширені мутації
стійкі		стійкі		стійкі	a1401g (35)
абс.	%	абс.	%	%	
35	3,1 ± 2,9 *	40	3,5 ± 2,9 *	87,5	

Примітка. * p > 0,05 при порівнянні відповідних результатів стійкості.

Таким чином, як видно з таблиць 5, 6 і 7 достовірної різниці щодо кількості штамів *M. tuberculosis* з MC до антибіотиків групи аміноглікозидів, які були отримані при проведенні молекулярно-генетичних та культуральних методів дослідження не виявлено.

Висновки

Таким чином, проведені дослідження показали високу результативність тестування медикаментозної чутливості як фенотипічними, так і молекулярно-генетичними методами дослідження. Результативність дослідження MC штамів *M. tuberculosis* за geno- та фенотипічними методами є порівняною і не має достовірної різниці. Виявлення генетичних мутацій, що асоційовані з медикаментозною резистентністю штамів *M. tuberculosis*, гарантують високу діагностичну точність прогнозування фенотипової резистентності до всіх протестованих ПТП. В штамів *M. tuberculosis*, що мають стійкість до Q, основні мутації виявлені в гені *gyrA*, мутації в гені *gyrB* не є значущим фактором щодо формування резистентності до Q. Мутації в 2-х генах rrs і eis, що асоційовані з резистентністю до аміноглікозидів виявлені лише в штамів *M. tuberculosis*, що мають медикаментозну стійкість до Km.

ЛІТЕРАТУРА

1. Туберкульоз із розширеною резистентністю : епідеміологічні аспекти, проблеми діагностики і лікування/ Ю. І. Фещенко та ін. // Укр. пульмонолог. журн. 2013. № 3, додаток. С. 31–33.
2. Algorithm for laboratory diagnosis and treatment-monitoring of pulmonary tuberculosis and drug-resistant tuberculosis using state-of-the-art rapid molecular diagnostic technologies / WHO. Geneva : WHO, 2017, 29 p
3. Global tuberculosis report / WHO. Geneva : WHO, 2017, 249 p
4. Saint-Joanis B., Souchon H., Wilm ing M. Use of side-directed mutagenesis to probe the structure, function and isoniazid activation of the catalase/oxidase, kat G, from *Mycobacterium tuberculosis* // Biochem J. — 1999. — Vol. 338. — P. 753-760.
5. Zhang Y., Yew W.W. Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 2009, vol. 13, no. 11, pp. 1320-1330.