

*Исакова Ж.Т., Совхозова Н.А., Гончарова З.К., Талайбекова Э.Т., Гончарова О.С.,  
Алдашева Н.М., Алдашев А.А.*

**КЫРГЫЗ РЕСПУБЛИКАСЫНДА КЕЗДЕШҮҮЧҮ КУРГАК УЧУКТУН  
МИКОБАКТЕРИЯСЫНЫН РИФАМПИЦИН-, ИЗОНИАЗИД-, ФТОРХИНОЛОН-  
ДАРЫЛАРЫНА ТУРУКТУУЛУКТУ АЛЫП КЕЛҮҮЧҮ, rpoB, katG, inhA, ahpC ЖАНА  
gyrA ГЕНДЕРИНДЕГИ НЕГИЗГИ МУТАЦИЯЛАРЫ**

*Исакова Ж.Т., Совхозова Н.А., Гончарова З.К., Талайбекова Э.Т., Гончарова О.С.,  
Алдашева Н.М., Алдашев А.А.*

**ОСНОВНЫЕ МУТАЦИИ В ГЕНАХ rpoB, katG, inhA, ahpC и gyrA,  
ОБУСЛАВЛИВАЮЩИЕ РИФАМПИЦИН-, ИЗОНИАЗИД-, ФТОРХИНОЛОН-  
УСТОЙЧИВОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В  
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ.**

*Zh.T. Isakova, N.A. Sovhozova, Z. K. Goncharova, E.T. Talaibekova, O.S. Goncharova,  
N.M. Aldasheva, A.A. Aldashev*

**THE MAIN MUTATIONS IN THE rpoB, katG, inhA, ahpC AND gyrA GENES,  
CAUSING RIFAMPICIN-, ISONIASID-, AND FLUOROQUINOLONE-RESISTANCE OF  
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CIRCULATING IN THE KYRGYZ REPUBLIC**

УДК: 616.24-002.5:579.873.21:577.21 (575.2)

Изилдөөнүн жыйынтыгы боюнча Кыргыз Республикасында кездешүүчү, кургак учуктун микобактериясынын (КУМБ) штаммдардын көптөгөн жана кеңири тараган дарыга алып келүүчү rpoB, katG, inhA, ahpC жана gyrA гендериндеги негизги мутациялар келтирилген. Алынган натыйжалардын негизинде Кыргыз Республикасында кездешүүчү ФХга туруктуу МБТ штаммдар gyrA генинин Asp94Gly мутациясы менен шартталгандыгы аныкталган. МБТ штаммдардын рифампицинге туруктуулугу негизинен rpoB гениндеги 531, 526, 516 жана 511 кодондордогу мутациялар менен шартталган. МБТ штаммдардын рифампицин дарысына туруктуулукка алып келүүчү, rpoB гениндеги Ser531→Leu негизги мутациясы болуп саналса, ал эми МБТ штаммдардын изониазид дарысына туруктуулукка алып келүүчү katG гениндеги Ser315→Thr негизги мутациясы болуп эсептелет.

**Негизги сөздөр:** мутация, рифампицин, изониазид, фторхинолон, кеңири дарыга туруктуулук, биочип-талдоо, кургак учуктун микобактериясы.

Приведены результаты изучения основных мутаций в генах rpoB, katG, inhA, ahpC и gyrA, обуславливающих рифампицин-, изониазид- и фторхинолон-устойчивость микобактерий туберкулеза, циркулирующих в Кыргызской Республике. Установлено, что фторхинолон-устойчивость микобактерий туберкулеза, циркулирующих в Кыргызской Республике, обусловлена мутацией Asp94Gly гена gyrA. 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.

**Ключевые слова:** мутация, рифампицин, изониазид, фторхинолон, широкая лекарственная устойчивость, биочип-анализ, микобактерии туберкулеза.

The results of the study of the main mutations in rpoB, katG, inhA, ahpC and gyrA genes, causing rifampicin-, isoniazid-, and fluoroquinolone-resistance of mycobacterium tuberculosis circulating in the Kyrgyz Republic are presented. It was established that the fluoroquinolone-resistance of mycobacterium tuberculosis, circulating in the Kyrgyz Republic, is caused by the mutation of Asp94Gly gene gyrA. The resistance of MBT to rifampicin is due, mainly, to mutations in the 531, 526, 516 and 511 gene codons. The main mutation causing resistance of MBT to rifampicin is Ser531 → Leu of the rpoB gene, whereas the main mutation determining the resistance of MBT to isoniazid is Ser315 → Thr of the katG gene.

**Key words:** mutation in genes, rifampicin, isoniazid, fluoroquinolon, the broad drug resistance, biochip analysis, mycobacterium tuberculosis.

**Актуальность**

В Кыргызстане, как и в странах бывшего Советского союза, отмечается высокий уровень заболеваемости и смертности от туберкулеза. Показатель заболеваемости в 2015 г. составил 98,2 на 100 000 населения [1]. Напряженная эпидемиологическая обстановка по туберкулезу в республике обусловлена ухудшением социальных условий жизни населения, экономическим спадом, миграционным процессом, уменьшением государственного финансирования противотуберкулезных программ.

Особую опасность представляют штаммы микобактерий туберкулеза (МБТ) с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), т.е. устойчивые к основным противотуберкулезным препаратам первого ряда: рифампицину (R) и изониазиду (H). Для лечения больных туберкулезом с МЛУ используют препараты резервного ряда, среди которых наиболее эффективными являются препараты фторхинолонового ряда (FQ). Широкое использо-

вание препаратов этой группы привело к появлению МБТ резистентных к FQ, устойчивость к которым, совместно с HR – устойчивостью определяется как пре ШЛУ, а при наличии устойчивости еще и, как минимум к 1 из 3 инъекционных препаратов II ряда, определяется как широкая лекарственная устойчивость (ШЛУ).

Появление штаммов МБТ с МЛУ и ШЛУ является одной из причин роста заболеваемости туберкулезом по всему миру. Эффективность лечения больных туберкулезом с МЛУ низкая и составляет 50%, а эффективность лечения больных с ШЛУ еще хуже и составляет всего 10% [1].

Раннее выявление штаммов МБТ с МЛУ и ШЛУ является одним их необходимых условий для успешного лечения больного туберкулезом. В данное время разработаны молекулярно-генетические методы, позволяющие в течение короткого времени выявить МБТ с HR- устойчивостью и к FQ. Одним из таких методов является биочип-метод, который основан на выявлении мутаций в генах *groV*, *katG*, *inhA*, *ahpC* и *gugA*, приводящие к МЛУ и ШЛУ устойчивости МБТ [2].

**Цель работы** - определить основные мутации в генах *groV*, *katG*, *inhA*, *ahpC* и *gugA*, обуславливающие рифампицин-, изониазид- и фторхинолон-устойчивость микобактерий туберкулеза, циркулирующих в Кыргызской Республике.

**Материалы и методы**

Исследовались 170 образцов ДНК МБТ, полученные от больных с подтвержденным диагнозом легочного туберкулеза. Пациенты, включенные в данное исследование, ВИЧ-отрицательные. Всем больным в условиях стационара Национального Центра Фтизиатрии (г.Бишкек) 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. Молекулярно-генетическое исследование проводилось на базе Института молекулярной биологии и медицины. Выявление рифампицин, изониазид и фторхинолон-резистентных штаммов МБТ проводилось с помощью метода биологических микрочипов, разработанной в институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарта [2].

**Результаты и обсуждение**

В более 95% случаев резистентность МБТ к рифампицину обусловлена мутациями в гене *groV*, который кодирует β-субъединицу РНК-полимеразы [3]. Выявление места локализации и типа мутаций в гене *groV* является важным, поскольку микобактерии туберкулеза с различными типами мутаций требуют для предотвращения размножения разные дозы лекарственных препаратов. Среди всех типов мутаций, выявленных в гене *groV* мутация

Ser531→Leu встречалась чаще всего и составила 60% (табл.1). Вторым по частоте встречаемости является мутация в 526 кодоне 18,3 %. В 526 кодоне выявлено 5 различных типов мутаций: в том числе: His526→Tyr – 4,1%, His526→Asp – 5,9 %, His526→Arg – 5,9 %, His526→Leu – 1,8%, His526→Pro-0,6%. Третьими по частоте встречаемости являются мутации в 516 и 511 кодонах. В 516 кодоне встречались Asp516→Tyr – 4,1% и Asp516→Val– 0,6% случаев. В 511 кодоне основной мутацией является Leu 511→Pro – 8,2%. Мутации в 533, 522, 513 и 512 кодонах встречались редко и составили в сумме не более 5,3% среди всех рифампицин устойчивых штаммов. Таким образом, у больных туберкулезом, проживающих в Кыргызской Республике устойчивость МБТ к рифампицину чаще всего обусловлена мутациями в 531, 526 и 516 кодонах гена *groV*. Основной причиной устойчивости МБТ к рифампицину является мутация Ser531→Leu.

**Таблица 1. Спектр мутаций в гене *groV* МБТ, обуславливающих устойчивость *M. tuberculosis* к рифампицину у больных туберкулезом в Кыргызской Республике**

Кодоны гена <i>gro V</i>	Мутации	Впервые выявленные (n=170)	
		n (%)	n (%)
533	Leu533→Pro	4 (2,3)	4 (2,3)
531	Ser531→Leu	102 (60)	108 (63,5)
	Ser531→Trp	6 (3,5)	
526	His526→Tyr	7 (4,1)	31 (18,3)
	His526→Asp	10 (5,9)	
	His526→Leu	3 (1,8)	
	His526→Arg	10 (5,9)	
	His526→Pro	1 (0,6)	
522	Ser522→Leu	1 (0,6)	1 (0,6)
516	Asp516→Val	1(0,6)	8 (4,7)
	Asp516→Tyr	7(4,1)	
513	Gln513→Leu	1(0,6)	2 (1,2)
	Gln513→Gly	1(0,6)	
512	Ser512→Thr	2 (1,2)	2 (1,2)
511	Leu511→Pro	14 (8,2)	14 (8,2)

В отличие от рифампицина, устойчивость МБТ к изониазиду ассоциирована с мутациями в нескольких генах, главными из которых являются: *katG*, *inhA* и *ahpC* [4]. В данной выборке среди изониазид резистентных штаммов, мутации гена *katG* встречались в 91% случаев, *inhA* - 6% и *ahpC* – 3% случаев (табл.2). В гене *katG* выявлено 4 различных типа мутаций: Ser315→Thr встречалась в 85,3%, Ser315→Asn -1,8%, Ser315→Arg -2,9%, Ser315→Gly -0,6% случаев. В гене *inhA* обнаружены нуклеотидные замены в положении -15 относительно сайта инициации трансляции (*inhA* T<sub>-15</sub>). В промоторном участке гена *ahpC* мутация идентифи-

цирована в положении - 9 относительно сайта инициации транскрипции (ahpC<sub>-9</sub>).

При анализе сочетанных мутаций в генах groB, katG, inhA и ahpC, обуславливающих развитие МЛУ выявлено, что 52% штаммов МБТ с МЛУ имели сочетанный тип мутаций Ser531→Leu гена groB и Ser315→Thr гена katG.

**Таблица 2. Спектр мутаций в генах kat G, inhA и ahp C, обуславливающих устойчивость M. tuberculosis к изониазиду у больных туберкулезом в Кыргызской Республике**

Гены МБТ, обуславливающие устойчивость к изониазиду	Кодоны	Аминокислотные замены	Нуклеотидные замены	Образцы с мутациями	
				n=170	%
katG	315	Ser →Thr	AGC→ ACC	145*	85,3
	315	Ser →Arg	AGC →ACA	5	2,9
	315	Ser→Asn	AGC→AAC	3	1,8
	315	Ser→Gly	AGC→GGC	1	0,6
inhA	15		C →T	10	5,9
inhA	8		T→G	1	0,6
ahpC	9		G→A	5	2,9

Для лечения больных туберкулезом, выделяющих МЛУ-возбудитель, используют препараты фторхинолонового ряда. Фторхинолоны препятствуют синтезу ДНК бактерий, действуя на ДНК-гиразу и топоизомеразу IV рода, вызывая ломку нитей ДНК и гибель клетки [5]. В настоящее время фторхинолоны заняли прочное место в ряду препаратов резервного ряда, используемых в лечении больных лекарственно-резистентным и особенно мультирезистентным туберкулезом.

Однако некорректное и чрезмерное использование препаратов этой группы привели к появлению штаммов МБТ, устойчивых к фторхинолонам. Устойчивость МБТ к фторхинолонам возникает в результате одной или нескольких мутаций в гене, кодирующем ДНК-гиразу (gyrA) [6].

Среди штаммов с МЛУ 93% были чувствительными к FQ и 7% имели мутации в гене gyrA, приводящие к устойчивости к FQ. В гене gyrA были выявлены следующие мутации: Asp94Gly, Ala90Val и 1-двойная мутация Asp94Gly и Ala90Val. При этом мутация Asp94Gly гена gyrA чаще сочеталась с мутацией Ser531Leu гена groB и Ser315Thr гена katG, что свидетельствует о наличии МБТ с преШЛУ.

Таким образом, основным генетическим маркером устойчивости к FQ в штаммах МБТ, циркулирующих в Кыргызской Республике, является мутация Asp94Gly гена gyrA, а устойчивость МБТ к R и H обусловлена сочетанной мутацией Ser531Leu гена groB и Ser315Thr гена katG.

**Заключение.** Фторхинолон-устойчивость МБТ, циркулирующих в Кыргызской Республике, обусловлена мутацией Asp94Gly гена gyrA. Устойчивость МБТ к рифампицину обусловлена, в основном, мутациями в 531, 526, 516 и 511 кодонах гена groB. Основной мутацией, вызывающей устойчивость МБТ к рифампицину, является – Ser531→Leu гена groB, тогда как основной мутацией, обуславливающей устойчивость МБТ к изониазиду, является – Ser315→Thr гена katG.

Метод биочипов, основанный на выявлении мутаций в генах groB, katG, inhA, ahpC и gyrA, в достаточно короткие сроки, в течение 72 часов, позволяет идентифицировать устойчивые к R, H и FQ, что позволяет предположить наличие у больного ШЛУ, определить преШЛУ с устойчивостью к FQ и с самого начала лечения больного подобрать адекватный режим химиотерапии, что является основой успешного лечения больных, инфицированных штаммами МБТ с МЛУ и ШЛУ.

#### Литература:

1. Report of WHO. Estimates of TB and MDR-TB burden are produced by WHO in consultation with countries. 2014-08-15 Data: [www.who.int/tb/data](http://www.who.int/tb/data)
2. Mikhailovich V., Lapa S., Grydunov D., et al. Identification of Rifampicin-Resistant M. tuberculosis Strains by Hybridization, PCR, and Ligase Detection reaction on Oligonucleotide Microchips. J. Clin.Microbiol. 2001. №7. P. 2531-2540.
3. Ramaswamy S., Musser J.M. Molecular genetics basic of antimicrobial agent resistance in M. tuberculosis: 1998 update. Tubercle and Lung Disease. 1998. №79(1). P.3-29.
4. Mokrousov I., Isakova J., Valcheva V., Aldashev A., Rastogi N. [Molecular snapshot of Mycobacterium tuberculosis population structure and drug-resistance in Kyrgyzstan](#). Tuberculosis. 2013; 93(5):501-7.
5. Heddle J., Maxwell A. «Quinolone - Bilding Pocked of DNA Gyrase: Role of GyrB». Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002. № 46. P.1805-1815.
6. Hooper DC, Wolfson JS. The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans. Antimicrob Agents Chemother. 1985. № 28. P. 716–21.

Рецензент: к.м.н. Майназарова Э.С.