

На правах рукописи

Липин Михаил Юрьевич



**ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ  
*Mycobacterium tuberculosis***

**03.00.07 - Микробиология**

**Автореферат диссертации  
на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук**

**Москва**

**2004 г.**

Работа выполнена в Федеральном Государственном Унитарном Предприятии Государственный Научный Центр Прикладной Микробиологии Министерства Здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук Шемякин И.Г.

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук Пчелинцев С.Ю.

кандидат биологических наук Скотникова О.И.

**Ведущая организация:** Научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится 27 мая 2004 года в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Московском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского МЗ РФ по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского

Автореферат разослан 20 апреля 2004 г.

Учбный секретарь диссертационного совета

кандидат биологических наук

Комбарова С.Ю.

Тираж 100 экз.

## ВВЕДЕНИЕ

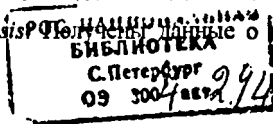
Распространение туберкулёза является одной из самых острых проблем здравоохранения как в экономически развитых, так и развивающихся странах. У одной трети населения Земли обнаруживаются признаки инфицирования *tuberculosis* (Sreevatsan, 1997) ежегодно у 8 миллионов человек развивается активная форма туберкулёза, и почти 3 миллиона человек умирают от этой болезни (Блум, 2002). Особую опасность представляет повсеместное распространение возбудителя туберкулёза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), то есть устойчивого к изониазиду и рифампицину (Dye, 2002). Общепринятые методы определения лекарственной устойчивости (ЛУ) возбудителя туберкулёза занимают от 3 до 12 недель (Nair, 1993), в течение которых больному не может быть обоснованно назначено адекватное лечение. В то же время устойчивость к основным противотуберкулёзным препаратам большинства клинических штаммов *M. tuberculosis* обусловлена мутациями в ДНК, выявить которые можно в течение нескольких часов (Viedma, 2003). Актуальность работы определяется исключительной важностью наличия данных о распространённости лекарственно-устойчивого туберкулёза и генетических механизмах лекарственной устойчивости *A. tuberculosis*, а также методов быстрого выявления мутаций в ДНК микобактерий для разработки и реализации эффективных противотуберкулёзных программ.

Цель диссертационной работы - определение геномных мутаций у изониазид-, рифампицин-, пиразинамид- и стрептомицин- устойчивых клинических штаммов *A. tuberculosis* и разработка метода быстрого выявления мутаций в ДНК Л/, *tuberculosis*.

Задачи исследования:

1. Анализ распространённости лекарственно-устойчивого туберкулёза среди городского населения (Тула, Богородицк, Дзержинск, Павлово) и заключённых (Озерки).
2. Определение вклада мутаций в генах *katG*, *rpoB*, *pncA*, *rpsL* и *16SrRNA* *A. tuberculosis* в формирование лекарственно-устойчивого туберкулёза.
3. Разработка метода быстрого определения точечных мутаций в ДНК *M. tuberculosis* блокированием ПЦР полипептидными нуклеиновыми кислотами (ПНК).

Научная новизна результатов. Выявлена высокая распространённость лекарственно-устойчивого возбудителя туберкулёза среди больных туберкулёзом лёгких средней полосы России: количество клинических штаммов *A. tuberculosis*, чувствительных ко всем препаратам, составляет менее  $25 \pm 5\%$ , а количество штаммов с множественной лекарственной устойчивостью - от  $42 \pm 15\%$  до  $79 \pm 11\%$ . Выявлены не описанные ранее мутации в генах *katG*, *rpoB*, *pncA* *M. tuberculosis* и определены их вклад в формирование



мутаций в формирование лекарственно-устойчивого туберкулёза. Показано наличие общих механизмов устойчивости у 1,8% штаммов *M. tuberculosis* к изониазиду и рифампицину. Разработан алгоритм фильтрации изображений секвенирования ДНК на рентгеновской плёнке. Выявлено отсутствие пониженной вирулентности у лекарственно-устойчивых клинических штаммов *M. tuberculosis* для мышей линии Balb/c. Разработан оригинальный метод быстрого выявления точечных мутаций в ДНК *M. tuberculosis*.

Научно-практическая значимость работы. Полученные данные о вкладе отдельных мутаций в формирование лекарственно-устойчивого туберкулёза необходимы для разработки и применения любых диагностических систем по определению мутаций, вызывающих лекарственную устойчивость у *M. tuberculosis*. Выявление не описанных ранее мутаций в генах *katG*, *rpoB*, *pncA* и штаммов с неспецифической множественной лекарственной устойчивостью дополняет известный набор механизмов возникновения лекарственной устойчивости у *M. tuberculosis*. Разработанный метод фильтрации изображений может быть применён в системах обработки информации в разных областях науки и техники. Полученные данные о распространении лекарственно-устойчивого туберкулёза путём инфицирования людей штаммами *M. tuberculosis* с ранее приобретённой лекарственной устойчивостью, а также о преимущественном приобретении множественной лекарственной устойчивости штаммами *M. tuberculosis* в процессе лечения могут служить основанием для\* разработки более эффективной противотуберкулёзной программы. Разработанный метод выявления точечных мутаций в геноме *M. tuberculosis* посредством ПНК-блокирования ПЦР может применяться в клинической практике.

Положения, выносимые на защиту.

1. Установлено, что основным генетическим механизмом устойчивости клинических штаммов *M. tuberculosis* в средней полосе России к изониазиду являются мутации в 315 кодоне гена *katG* (94,3±2,6%), к рифампицину - мутации в 516, 526 или 531 кодонах гена *rpoB* (86,7±3,8%), к стрептомицину - мутации в 43 кодоне гена *rpsL* (59±20%) или 516 нуклеотиде гена *16SrRNA* (35±19%).

2. Разработанный метод фильтрации изображений повышает разрешающую способность ПЦР- секвенирования по Сэнгеру.

3. Разработанный метод блокирования ПЦР полипептидными нуклеиновыми кислотами позволяет быстро выявлять мутации в ДНК *M. tuberculosis*.

Апробация работы произведена на 10<sup>я</sup> ежегодной конференции - Федерации Инфекционных Обществ (Кардиф, 19-21 ноября 2003 г.) и на научном семинаре отдела №38 ГНЦ ПМ 25 декабря 2003 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырёх глав, списка литературы из 187 наименований и двух приложений. Работа изложена на 141 странице, содержит 17 рисунков и 5 таблиц.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Материалы и методы.

**1.1. Культуральные и биохимические методы.** В работе исследовано 947 клинических штаммов *M tuberculosis*, выделенных как от городского населения (651 - из Тульской области, 36 - из г. Павлово Нижегородской области, 38 - из г. Дзержинск Нижегородской области), так и от заключённых (124 - из тюрьмы г. Серпухов Московской области и 98 - от больных из тюрьмы п. Озерки Тульской области, которые до заключения проживали в г. Тула). Принадлежность микроорганизмов к виду *M tuberculosis* определялась совместно с Коробовой О.В. культуральными (отсутствие роста на среде Левенштейна-Йенсена при 22°C, отсутствие роста на среде Левенштейна-Йенсена с салицилатом натрия) и биохимическими (ниациновый тест Кубика и Кильбурн в модификации Бараускене, наличие термолабильной каталазы) методами согласно приказу №558 МЗ СССР от 8 июня 1978 г. "Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулёзе". Определение устойчивости клинических штаммов *M tuberculosis* к стрептомицину (STR), изониазиду (INH), рифампицину (RIF), канамицину (KAN) и этамбутолу (EMB) производилось совместно с Коробовой О.В. на среде Левенштейна-Йенсена методом абсолютных концентраций согласно приказу №558 МЗ СССР от 8 июня 1978 г.

**1.2. ПЦР- секвенирование.** ПЦР- секвенирование генов, обуславливающих устойчивость штаммов *A. tuberculosis* к изониазиду - *katG* и *inhA* (регуляторная последовательность), рифампицину - *groB*, пиразинамиду - *pncA*, стрептомицину - *16SrRNA* и *rpsL*, канамицину - *16SrRNA* производилось совместно с Онасенко А.Г. по методу Сэнгера (1977). Прочитанные нуклеотидные последовательности сравнивались с соответствующими генами пггамма H37Rv (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.3. *Определение вирулентности клинических штаммов M. tuberculosis* для мышей линии Balb/c. Вирулентность 8 штаммов с ЛУ (6 из них - с МЛУ) и двух лекарственно-чувствительных штаммов *A. tuberculosis* изучалась на мышах линии Balb/c. Заражение мышей производилось совместно с Коробовой О.В. введением в хвостовую вену 0,2 мл суспензии *A. tuberculosis* с концентрацией  $5 \times 10^7$  КОЕ/мл. Микобактериальная культура перед заражением гомогенизировалась в физиологическом растворе с 0,01% Твин-80. Продолжительность опыта составляла 28 суток. Вирулентность штаммов оценивалась по обсеменённости лёгких и селезёнки каждого заражённого животного.

1.4. *Методы теории вероятности.* Статистическая значимость различия двух средних значений вычислялась с использованием t-критерия Стьюдента. Доверительный интервал с достоверностью 95% вычислялся на основании биномиального распределения.

## 2. Результаты.

2.1. *Лекарственная устойчивость.* Все 947 штаммов принадлежали виду *A. tuberculosis* по данным культуральных и биохимических тестов. Устойчивость *in vitro* к стрептомицину, изониазиду, рифампицину, канамицину и этамбутолу штаммов *A. tuberculosis* от больных из разных регионов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Лекарственная устойчивость штаммов  
*A. tuberculosis* от больных из разных регионов

Выборка ЛУ	п. Озерки, Тульская обл., заклю- чённые, 11/2000 - 11/2001 г., 98 штаммов	г. Тула, городское население, 06/2001 - 06/2002 г., 265 штаммов	г. Богородицк Тульская область, городское население 1998-2001 г., 67 штаммов	г. Павлово, Нижегород- ская обл., городское население, 2001 г., 36 штаммов	г. Дзержинск Нижегород- ская обл., городское население, 2001 г., 38 штаммов	г. Тула, городское население, 1998 - 2001г., 146 ЛУ штаммов	г. Серпухов, Московская обл., заклю- чённые, 11/2000 - 12/2001 г., 124 ЛУ штамма
INH	69 (70±8%)	144(54±6%)	49 (73±10%)	25 (69±14%)	33 (87±9%)	141(97±3%)	106 (85±6%)
RIF	70 (71±8%)	145 (55±6%)	42 (63±11%)	18 (50±15%)	33 (87±9%)	127 (87±5%)	102 (82±6%)
STR	83 (85±6%)	182 (69±5%)	51 (76±9%)	29 (81±11%)	36 (95±7%)	142 (97±2%)	123 (99±1%)
EMB	44 (45±9%)	91 (34±6%)	30 (45±11%)	12 (33±14%)	5 (13±9%)	101 (69±7%)	79 (64±8%)
KAN	59 (60±9%)	108 (41±6%)	27 (40±11%)	6 (17±11%)	15 (39±14%)	104 (71±7%)	64 (52±8%)
МЛУ	64 (65±9%)	117 (44±6%)	39 (58±11%)	15 (42±15%)	30 (79±11%)	124 (85±5%)	95 (77±7%)
чувствит.	11 (11±6%)	65 (25±5%)	13 (19±9%)	6 (17±11%)	2 (5±5%)	0	0

2.1.1. *Распространённость ЛУ туберкулёза среди городского населения (г. Тула, г. Богородицк, г. Павлово, г. Дзержинск).* Частота встречаемости штаммов с МЛУ от больных из любого города составляет более 42%, а частота встречаемости штаммов, чувствительных

ко всем препаратам - менее 25% (см. табл. 1, рис. 1). Частота встречаемости INH-, RIF-, STR-устойчивых, а также МЛУ штаммов *M. tuberculosis* от больных из г. Дзержинск выше, чем из других городов ( $P < 0,03$  в любом случае). Частота встречаемости ЕМВ-устойчивых и чувствительных ко всем препаратам штаммов от больных из г. Дзержинск» напротив, меньше, чем из г. Павлово, г. Богородицк и г. Тула ( $P$  от 0,0005 до 0,1). Частота встречаемости ШН-устойчивых штаммов от больных из г. Тула ниже, чем из г. Богородицк ( $P=0,005$ ) и г. Павлово ( $P < 0,09$ ). Частота встречаемости KAN-устойчивых штаммов от больных из г. Павлово ниже, чем из г. Дзержинск ( $P=0,03$ ), г. Богородицк ( $P=0,01$ ) и г. Тула ( $P=0,005$ ). Частота встречаемости штаммов с МЛУ от больных из г. Богородицк выше, чем из г. Тула ( $P < 0,04$ ) и г. Павлово ( $P=0,1$ ). Различия других показателей не являются значимыми (РХУ).

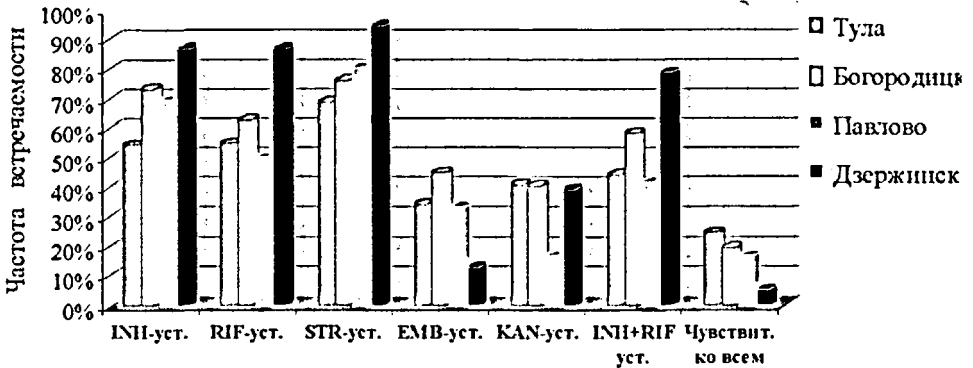


Рис. 1. Частота встречаемости ЛУ штаммов *M. tuberculosis* от больных из разных регионов

**2.1.2. Сравнение распространённости ЛУ туберкулёза среди городского населения г. Тула и заключённых - бывших жителей г. Тула.** Частота встречаемости штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к любому препарату, от заключённых выше, чем соответствующая частота встречаемости штаммов от городских жителей: INH ( $70 \pm 8\%$  против  $54 \pm 6\%$ ,  $P=0,005$ ), RIF ( $71 \pm 8\%$  против  $55 \pm 6\%$ ,  $P=0,004$ ), STR ( $85 \pm 7\%$  против  $69 \pm 5\%$ ,  $P=0,002$ ), ЕМВ ( $45 \pm 9\%$  против  $34 \pm 6\%$ ,  $P=0,06$ ), KAN ( $60 \pm 9\%$  против  $41 \pm 6\%$ ,  $P < 0,001$ ), INH+RIF ( $65 \pm 9\%$  против  $44 \pm 6\%$ ,  $P < 0,001$ ). Частота встречаемости штаммов *M. tuberculosis*, чувствительных ко всем препаратам, от городских жителей больше, чем соответствующая частота встречаемости штаммов от заключённых ( $25 \pm 5\%$  против  $11 \pm 6\%$ ,  $P=0,005$ ) (рис. 2).

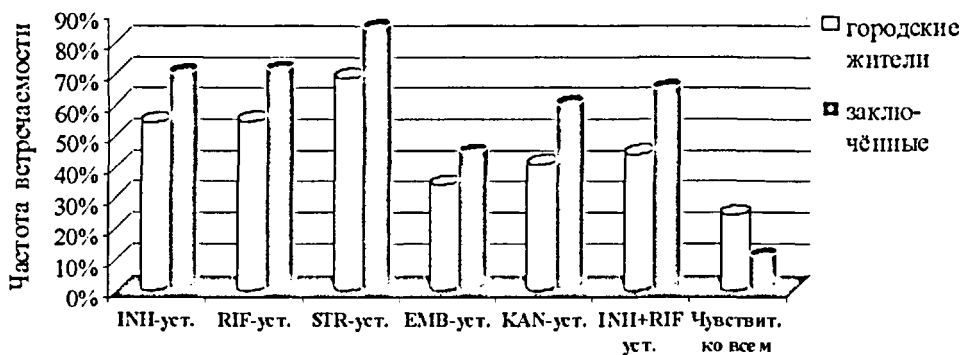


Рис. 2. Сравнение частот встречаемости ЛУ штаммов *M. tuberculosis* от городского населения и заключённых из г. Тулы

2.1.3. *Лекарственная устойчивость клинических штаммов M. tuberculosis от впервые выявленных больных в г. Тула, г. Богородицк и п. Озерки.* Частота встречаемости STR-устойчивых штаммов от больных га г. Богородицк ниже, чем га г. Тула ( $33 \pm 22\%$  против  $63 \pm 17\%$ ,  $P=0,09$ ) и п. Озерки ( $33 \pm 22\%$  против  $60 \pm 16\%$ ,  $P=0,1$ ). Частота встречаемости штаммов, чувствительных ко всем препаратам, от больных га г. Богородицк выше, чем га г. Тула ( $67 \pm 22\%$  против  $33 \pm 17\%$ ,  $P=0,05$ ) и п. Озерки ( $67 \pm 22\%$  против  $30 \pm 15\%$ ,  $P=0,02$ ) (рис. 3). Различия других показателей не являются значимыми ( $P > 0,16$ ). Штаммы с МЯУ составляют в среднем  $23 \pm 9\%$ .

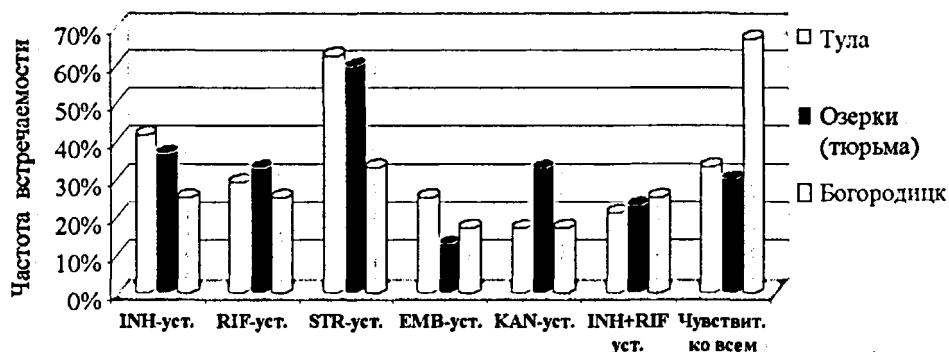


Рис. 3. Частота встречаемости ЛУ штаммов *M. tuberculosis* от впервые выявленных больных Тульской области

2.1.4. *Сравнение лекарственной чувствительности штаммов M. tuberculosis от впервые выявленных и хронических больных (г. Тула, г. Богородицк).* Частота встречаемости штаммов, чувствительных к любому препарату, от впервые выявленных больных больше, чем соответствующая частота встречаемости штаммов от хронических больных ( $P \leq 0,05$  в



любом случае) (рис. 4).

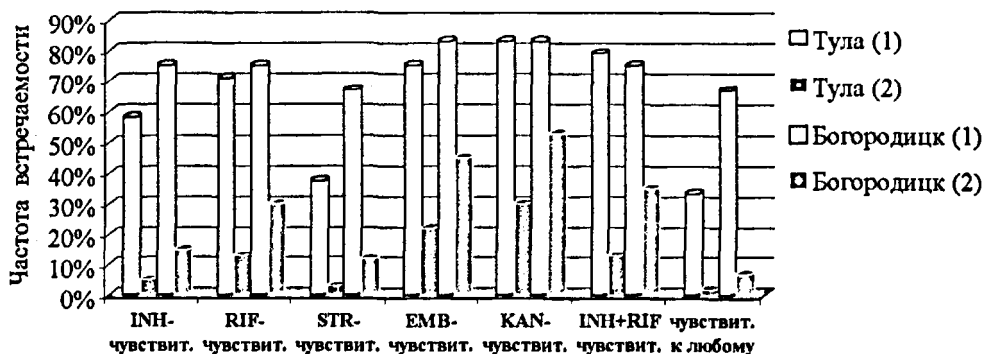
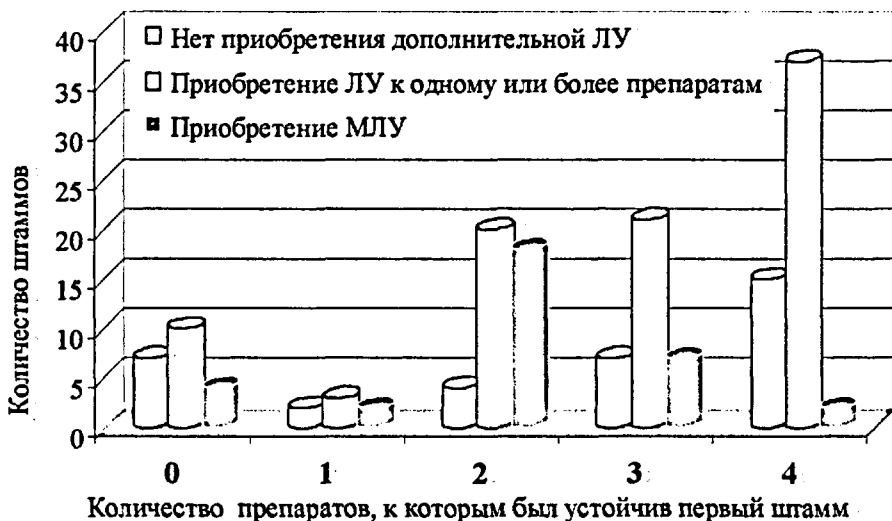


Рис. 4. Частота встречаемости лекарственно-чувствительных штаммов *M. tuberculosis* от впервые выявленных (1) и хронических (2) больных

Относительно небольшая частота встречаемости лекарственно-чувствительных штаммов от впервые выявленных больных туберкулёзом из г. Тула ( $33 \pm 17\%$ ) свидетельствует о преобладании в этом городе механизма распространения ЛУ туберкулёза посредством инфицирования людей штаммами *M. tuberculosis* с ранее приобретённой ЛУ, а не в результате лечения. Большинство ( $67 \pm 22\%$ ) впервые выявленных больных из г. Богородицк, напротив, были инфицированы штаммами *M. tuberculosis*, чувствительными ко всем препаратам, что указывает на преимущественное приобретение ЛУ штаммами *M. tuberculosis* в этом городе в процессе лечения больных. Частота встречаемости штаммов, чувствительных к изониазиду и рифампицину, выделенных от впервые выявленных больных, значительно больше, чем соответствующая частота встречаемости штаммов от хронических больных как из г. Тула ( $79 \pm 14\%$  против  $13 \pm 6\%$ ,  $P < 0,001$ ), так и из г. Богородицк ( $75 \pm 19\%$  против  $35 \pm 13\%$ ,  $P = 0,01$ ), что свидетельствует о преимущественном приобретении МЛУ штаммами *M. tuberculosis* именно в результате лечения больных.

2.1.5. *Приобретение дополнительной лекарственной устойчивости возбудителем туберкулёза в результате неудачного лечения больных.* Изучены данные по лекарственной устойчивости 346 штаммов *M. tuberculosis*, полученных от 173 больных (по 2 штамма от каждого больного с интервалом от 3 до 16 месяцев). У 47 пациентов как первичный, так и вторичный штамм имели устойчивость ко всем пяти препаратам. У 91 ( $72 \pm 7\%$ ) из 126 пациентов, первичные штаммы от которых имели устойчивость не более чем к четырём противотуберкулёзным препаратам, повторно выделенные штаммы приобрели дополнительную лекарственную устойчивость, по меньшей мере, к одному противотуберкулёзному

препарату (рис. 5). МЛУ была обнаружена у 33 (57±12%) из 58 вторичных штаммов от пациентов, первый штамм от которых не имел устойчивости к изониазиду или рифампицину. Наибольшая вероятность возникновения МЛУ выявлена у 18 (75±15%) из 24 клинических штаммов *M. tuberculosis*, ранее имевших ЛУ к двум противотуберкулёзным препаратам.



**Рис. 5. Появление дополнительной ЛУ у клинических штаммов *M. tuberculosis* в результате неудачного лечения больных**

## 2.2. ПЦР-секвенирование генов *katG*, *inhA*, *rpoB*, *pncA*, *16SrRNA* и *rpsL*.

### 2.2.1. Фильтрация изображения данных секвенирования. В тех случаях, когда

качество изображения на рентгеновской плёнке не позволяло однозначно различить фрагмент ДНК на фоне помех, плёнки сканировались при 600 dpi, 256 градаций яркости серого цвета. Оцифрованные данные подвергались одномерной линейной фильтрации. В процессе фильтрации изображение разлагалось на две составляющие - информационную и шумовую. В качестве информационной выбрана такая составляющая исходного сигнала, поведение которой в некоторой степени предсказуемо. Шумовая, то есть непредсказуемая, составляющая сигнала отбрасывалась. Фильтрация осуществлялась с помощью специально созданной в системе MATLAB (The MathWorks, Inc.) программы, реализующей рекурсивный цифровой фильтр размером 14 отсчётов, построенный на основе уравнения бегущей плоской электромагнитной волны. На рис. 6 приведены фрагменты оригинального и отфильтрованного изображения плёнки с данными секвенирования гена *pncA*.



Рис. 6. Фрагменты оригинального (слева) и отфильтрованного (справа) изображений плёнки с данными секвенирования гена *pncA* (CGCGGTACGCAATGGCTTGCC)

2.2.2. Гены *katG* (290-522 кодоны) и *inhA* (регуляторная последовательность с 1673291 по 1673497 нуклеотиды). Мутации в гене *katG* обнаружены у 251 (95,4±2,3%) из 263 ИН-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* от больных Тульской области и Серпуховского района Московской области (табл. 2).

Таблица 2

Мутации в *katG* гене 251 ИН-устойчивых клинических штаммов *M. tuberculosis*

Набор мутаций	Частота встречаемости, %
315AGC→ACC (Ser→Thr)	54,4±5,8%
315AGC→ACC (Ser→Thr) 463CGG→CTG (Arg→Leu)	38,0±5,7%
463CGG→CTG (Arg→Leu)	1,1±1,1%
315AGC→ACA (Ser→Thr)	0,8±0,8%
315AGC→AGA (Ser→Arg) 463CGG→CTG (Arg→Leu) 335ATC→GTC (Ile→Val)	0,4% +0,6/-0,4%
315AGC→AGA (Ser→Arg) 463CGG→CTG (Arg→Leu)	0,4% +0,6/-0,4%
315AGC→AGA (Ser→Arg)	0,4% +0,6/-0,4%

Наиболее часто встречались одиночная **315AGC→ACC (54,4±5,8%)** и парная **315AGC→ACC+463CGG→CTG (38,0±5,7%)** мутации. В целом изменениям наиболее подвержены 315 (94,3±2,6%) и 463 (39,9±5,7%) кодоны гена *katG*.

Мутации в регуляторной последовательности гена *inhA* не были выявлены ни у одного (0+14%) из 20 INH-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* от больных Серпуховского района Московской области, 10 из которых имели мутацию 315ACC, 3 - мутацию 463CTG, 6 - мутацию 315ACC+463CTG в гене *katG*, и один - фрагмент гена *katG* дикого типа.

2.2.3. Ген *groB* (472-585 кодоны). Мутации в гене *groB* обнаружены у 251 (90,3±3,3%) из 278 RIF-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* от больных Тульской области и Серпуховского района Московской области. Частоты встречаемости мутаций в кодонах 511 - 533 гена *groB* представлены на рис. 7. Вне 511 - 533 кодонов с частотой встречаемости 0,36+0,54/-0,36% были обнаружены следующие мутации: 479ATG→TTG (Met→Leu), 535CCC→CTC (Pro→Leu), 565GAG→AGT (Glu→Ser), делеция 566AGGG ( $\Delta$ Leu), 580CGG→CAG (Arg→Gln). Изменениям наиболее подвержены 516 (36,0±5,4%), 526 (15,5±4,1%) и 531 (35,3±5,4%) кодоны, мутации в которых обнаружены у 241 (86,7±3,8%) из 278 RIF-устойчивых штаммов.

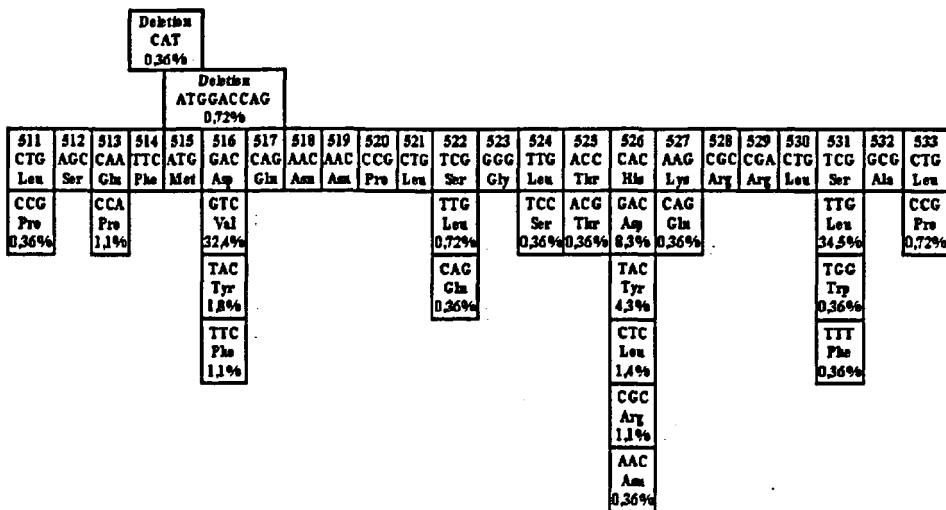


Рис. 7. Мутации в 511 - 533 кодонах гена *groB* 278 RIF-устойчивых штаммов *M. tuberculosis*. Над последовательностью дикого типа указаны делеции, под ней - точечные мутации. В каждом случае указана частота встречаемости мутации. Делеция CAT в кодонах 514-515 приводит к замене Phe-Met→Leu

2.2.4. Ген *pncA* (8-180 кодоны). Мутации в гене *pncA* обнаружены в равных количествах (по 1,2+1,8/-1,2%) у 15 (18±8%) из 84 случайно выбранных штаммов от больных Тульской области и Серпуховского района Московской области, из них 14 (17±7%) - значимые: 22ACC→ACT (Thr→Thr), 63GAC→GAA (Asp→Gly), 63GAC→GCC (Asp→Ala),

85CTG→CCG (Leu→Pro), 96AAG→AGG (Lys→Arg), 97GGT→AGT (Gly→Ser), 108GGA→GTA (Gly→Val), 132GGT→CGT (Gly→Arg), 134GCC→GTC (Ala→Val), 139GTG→GCG (Val→Ala), 164TCG→CCG (Ser→Pro), 175ATG→AGG (Met→Arg), 78ΔG, делеция с 87 по 148 кодоны и вставка 131GTC→GGTC.

2.2.5. *Гены 16SrRNA (149-320 кодоны) и rpsL (10-121 кодоны).* Гены *16SrRNA* и *rpsL* секвенированы у 17 STR-устойчивых клинических штаммов *M. tuberculosis* от больных Тульской области. В гене *16SrRNA* обнаружена мутация в 516 нуклеотиде **C→T y 6** (35±19%) штаммов. В гене *rpsL* обнаружена мутация в 43 кодоне **AAG→AGG** (Lys→\*Arg) у 10 (59±20%) штаммов. Одновременное наличие мутаций в обоих генах не выявлено ни у одного из 17 штаммов, причём вероятность такого случайного события составляет 0,0006. У одного (6+8/-6%) из 17 штаммов мутации в генах *16SrRNA* и *rpsL* отсутствовали.

2.2.6. *Ген 16SrKNA (423-515 кодоны).* Мутации в гене *16SrRNA* не выявлены ни у одного (0+24%) из 11 KAN-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* от больных Тульской области.

### 2.3. Связь мутаций в генах *katG* и *groB* суровняли устойчивости к изониазиду и рифампицину клинических штаммов *M. tuberculosis*.

2.3.1. *Связь мутаций в гене katG и уровня устойчивости к изониазиду.* Высокий уровень устойчивости к изониазиду (25 мкг/мл) был определен у значительно меньшего относительного количества штаммов, имеющих парную мутацию в 315 и 463 кодонах по сравнению с относительным количеством штаммов, имеющих одиночную мутацию в 315 кодоне гена *katG* (4±3% против 40±8%,  $P < 10^{-4}$ ), либо вовсе не имеющих мутаций в гене *katG* (4±3% против 58±23%,  $P < 10^{-5}$ ) (рис. 8).

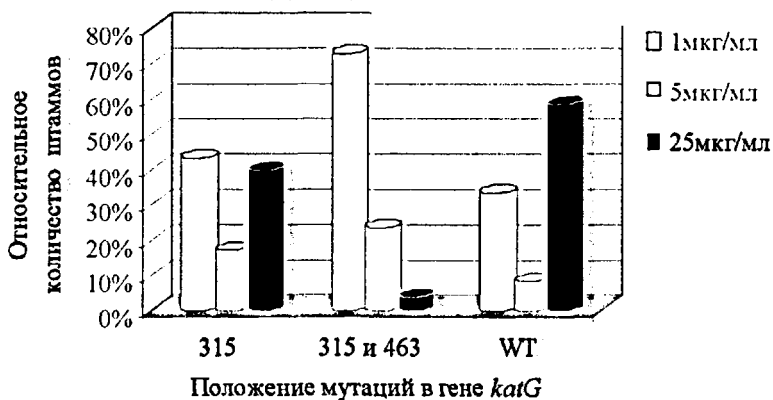


Рис. 8. Относительное количество штаммов *M. tuberculosis* с разными уровнями устойчивости к изониазиду

**2.3.2. Связь мутаций в гене *groB* и уровня устойчивости к рифампицину. Высокий** уровень устойчивости к рифампицину (50 мкг/мл) был определен у меньшего относительного количества штаммов, имеющих мутацию в 516 кодоне гена *groB* по сравнению с относительным количеством штаммов, имеющих мутацию в 526 кодоне (86% против 98±2/-4%, P=0,035), либо в 531 кодоне гена *groB* (86±6% против 97±2%, P=0,01), но всё же это количество оказалось большим, чем аналогичное количество штаммов с геном *groB* дикого типа (86±6% против 63±16%, P=0,006).

**2.4. Оценка количества штаммов *M. tuberculosis* с неспецифической МЛУ. Из** 225 МЛУ штаммов с секвенированными генами *katG* и *groB* у 9 штаммов не выявлены мутации в *katG* гене, у 19 штаммов не выявлены мутаций в *groB* гене, и у 6 штаммов не выявлены мутации как в *groB*, так и в *katG* гене. Коэффициент корреляции отсутствия мутаций в обоих генах  $\text{cov}(x,y)/\sqrt{(\text{cov}(x,x)*\text{cov}(y,y))}$  равен 0,43, что свидетельствует о наличии связи. Если предположить отсутствие корреляции между лекарственной устойчивостью штаммов к изониазиду и рифампицину, не обусловленной мутациями в генах *katG* и *groB*, то вероятность отсутствия мутаций в обоих генах у  $k$  штаммов была бы  $P(k) = C^k_p \cdot C^{a-k}_b / C^a_c$ , где  $p$  - общее количество МЛУ штаммов,  $a$  - количество штаммов, не имеющих мутаций в гене *groB*,  $b$  - количество штаммов, не имеющих мутаций в гене *katG*,  $C$  - биномиальные коэффициенты. Наибольшая вероятность отсутствия мутаций в обоих указанных генах была бы при  $k=0$ , то есть ни у одного штамма, а вероятность случайного появления более двух таких штаммов равна 0,03. Следовательно, у 6 минус 2, то есть у 4 (1,8%, P=0,03) из 225 штаммов *M. tuberculosis* возникновение МЛУ связано с наличием общих механизмов противодействия обоим лекарственным препаратам.

**2.5. Связь лекарственной устойчивости с вирулентностью. По уровню** вирулентности для мышей штаммы распределились на три группы. Первая группа включала наименее вирулентные клинические штаммы: H37Rv, 1462, 1481, 155/6, 1626 и 1397 с показателем обсемененности лёгких заражённых животных (lg(КОЕ/мл)) от 5,6 до 6,6 (таблица 3). Вторая группа включала штамм 1486 с показателем обсемененности лёгких 7,1. В третью группу вошли наиболее вирулентные штаммы с показателем обсемененности лёгких мышей, заражённых этими культурами, от 7,7 до 8,2: 1402, 1544, 1643 и 1540. В этой группе наряду с ЛУ оказались и лекарственно-чувствительные штаммы. Уровень смертности среди мышей, инфицированных штаммом 1540, составлял 50±31%. Какой-либо связи между вирулентностью для мышей с диагнозом пациента - источника микобактериальной культуры, лекарственной устойчивостью, либо мутациями в генах *katG* и *groB* у 10 клинических штаммов *A. tuberculosis* выявлено не было.

Таблица 3

Вирулентность клонических штаммов *A. tuberculosis*

Штамм	Диагноз больного - источника штамма	Лекарственная устойчивость	Мутации в гене <i>groB</i>	Мутации в гене <i>katG</i>	Обсе- нённость лёгких, lg[KOE]	Обсе- нённость селезёнки, lg[KOE]	Падёж мышей
H37Rv	-	чувствителен	-	-	5,6±0,5	5,4±0,4	0/6
1462	Фибр.-каверн.	STR, INH, RIF	531TTG	463CTG	5,9±0,2	5,3±0,1	0/6
1481	Инфильтр.	STR, INH, RIF, KAN, EMB	516GTC	315ACC	6,0±0,1	5,0±0,3	0/6
155/6	Инфильтр.	STR, RIF	531TTG	-	6,1±0,2	5,2±0,1	0/6
1626	Фибр.-каверн.	STR	-	-	6,3±0,3	5,2±0,3	0/6
1397	Диссеминир.	STR, INH, RIF, KAN, EMB	516GTC	315ACC	6,6±0,2	5,6±0,2	0/6
1486	Инфильтр.	STR, INH, RIF, KAN	526CGC	315ACC	7,1±0,1	5,9±0,1	0/6
1402	Диссеминир.	STR, INH	-	315ACC	7,7±0,2	6,8±0,2	0/6
1544	Инфильтр.	чувствителен	-	-	7,9±0,2	6,5±0,3	0/6
1643	Инфильтр.	чувствителен	-	-	8,0±0,1	6,7±0,2	0/6
1540	Фибр.-каверн.	STR, INH, RIF, KAN, EMB	531TTG	315ACC 463CTG	8,2±0,2	6,6±0,3	3/6

### 2.6. Разработка метода определения мутаций в 463 кодоне гена *katG* ПНК-блокированием ПЦР.

Была выбрана следующая последовательность ПНК, соответствующая участку ДНК, включающему 463 кодон гена *katG* дикого типа *A. tuberculosis*: CTACGGGCGCTAGACCG (подчёркнут триплет, соответствующий 463 кодону). Образец ПНК предоставлен Гаврюшкиным А.В. На основании данных по температурам плавления комплекса ПНК/ДНК (70°C; рассчитана согласно Thiede, 1996) и комплексов ДНК с прямыми и обратными праймерами генов *katG* и *groB* были выбраны следующие температурно-временные параметры проведения ПЦР: 1 цикл 94°C/3 мин.; 28 циклов 70°C/30 сек., 63°C/30 сек., 72°C/40 сек., 94°C/50 сек.; 1 цикл 94Т/1 мин., 63°C/30 сек., 72°C/10 мин., охлаждение до 10°C. Состав буфера для ПЦР был следующим (на 25 мкл реакционной смеси): 12 мкл воды, 2 мкл глицерина, 2,5 мкл dNTP (1,5 mM), 2,5 мкл 10x PCR буфера, по 1 мкл прямого (CTCCGCTGGAGCAGATGGGC) и обратного (TCTTCCAGGGTGC GAATGACCT) праймеров для секвенирования гена *katG* (10 пмоль/мкл), по 1 мкл прямого (GTCGGCGAGCTGATCCAAAAC) и обратного (GGTACGGCGTITCGATGAACC) праймеров для секвенирования гена *groB* (10 пмоль/мкл), 1 мкл ПНК (1 мг/мл), 1 мкл ДНК (5 нг/мкл), 0,25 мкл Taq-полимеразы (5 ед. активности/мкл).

Добавление глицерина в реакционную смесь приводит к более полной денатурации относительно богатой гуанином и цитозином ДНК *M. tuberculosis*, а также понижает давление паров воды над реакционной смесью, уменьшая скорость её испарения, что снижает колебания концентраций компонентов в процессе ПЦР. В случае отсутствия блокирования ПЦР в реакционной смеси должны обнаруживаться как фрагменты гена *groV* (379 п.н.о), так и фрагменты гена *katG* (697 п.н.о.). В случае же блокирования ПНК амплификации фрагмента гена *katG* на электрофорезном агарозном геле должен обнаруживаться только фрагмент гена *groV*.

Исследовано 20 клинических штаммов *M. tuberculosis*, не имеющих мутации в гене *katG* и 20 - с мутациями в 463 кодоне гена *katG* (по данным ПЦР- секвенирования). Фрагмент гена *katG* обнаруживался в ПЦР- смеси, содержащей образцы ДНК любого из 20 клинических штаммов, имевших мутации в 463 кодоне, и не обнаруживался при исследовании образцов ДНК штаммов, не имевших мутации в 463 кодоне (рис. 9).

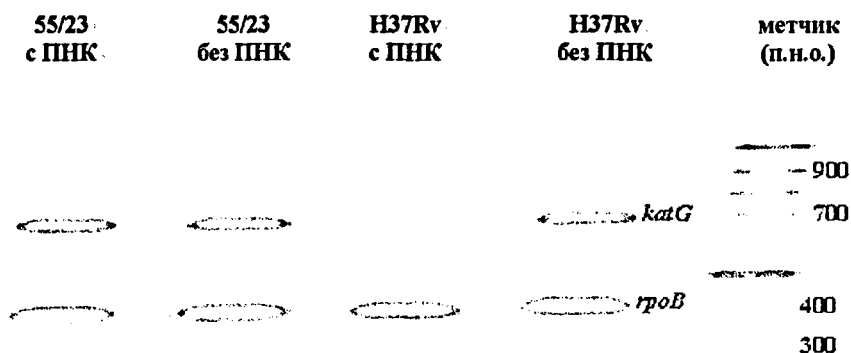


Рис. 9. Фотография (негатив) фрагмента 1% агарозного геля, содержащего электрофоретически разогнанные продукты ПЦР, окрашенные бромистым этидием.

ПНК соответствует участку гена *katG*, включающему 463 кодон.



## Выводы.

1. Частота встречаемости клинических штаммов *B. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью в средней полосе России составляет более 41,6%, а лекарственно-чувствительных штаммов - менее 24,5%. Частота встречаемости клинических штаммов *M. tuberculosis* с первичной множественной лекарственной устойчивостью составляет 22,7%.

2. Мутации в 315 кодоне гена *JcatG* (94,3%) являются основным генетическим механизмом устойчивости клинических штаммов *M. tuberculosis* к изониазиду.

3. Мутации в 516 (36,0%), 526 (15,5%) или 531 (35,3%) кодонах гена *spoB* являются основным генетическим механизмом устойчивости клинических штаммов *M. tuberculosis* к рифампицину.

4. Установлено наличие значимых мутаций в гене *pncA* у 16,7% клинических штаммов *M. tuberculosis*.

5. Мутации в 43 кодоне гена *rpsL* (58,8%) или в 516 нуклеотиде гена *16SrRNA* (35,3%) являются основным генетическим механизмом устойчивости клинических штаммов *M. tuberculosis* к стрептомицину.

6. Выявлены новые мутации в генах *katG* (335GTC), *spoB* (479TTG, 515-517 AATGGACCAG, 516TTC, 524TCC, 525ACG, 535CTC, 565AGT, 566AGGG, 580CAG) *upnA* (22ACT, 63GAA, 63GCC, 96AGG, 108GTA, 132CGT, 164CCG, 175AGG, 78ДО, делеция с 87 по 148 кодоны, вставка 131GGTC).

7. Разработан новый метод быстрого определения мутаций в ДНК *M. tuberculosis* блокированием ПЦР полипептидными нуклеиновыми кислотами.

## Список опубликованных работ по теме диссертации.

1. Иванов И.Ю., Степаншина В.Н., Липин М.Ю., Шемякин И.Г. Молекулярно-генетическое титрование методом RFLP-IS6110 клинических штаммов *A*, *tuberculosis*, выделенных от больных заключённых // Туберкулёз сегодня. Материалы VII Российского съезда фтизиатров. - Москва. - 2003. - С. 109-110.

2. Иванов И.Ю., Степаншина В.Н., Липин М.Ю., Шемякин И.Г. Молекулярно-генетическое типирование методом RFLP-IS6110 клинических штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от больных туберкулёзом в Центральном Регионе России // Туберкулёз сегодня. Материалы VII Российского съезда фтизиатров. - Москва. - 2003. - С. 109.

3. Липин М.Ю., Степаншина В.Н., Шемякин И.Г., Коробова О.В. Лекарственная устойчивость штаммов *A*, *tuberculosis*, выделенных от заключённых и от городского населения // Туберкулёз сегодня. Материалы W Российского съезда фтизиатров. - Москва. - 2003. - С. 87.

4. Липин М.Ю., Степаншина В.Н., Шемякин И.Г., Коробова О.В., Онасенко А.Г. Частота встречаемости мутаций в генах *rpoB*, *katG* и *pncA* клинических штаммов *A*. *tuberculosis* II Туберкулёз сегодня. Материалы VII Российского съезда фтизиатров. - Москва. - 2003.. С. 111.

5. Степаншина В.Н., Иванов И.Ю., Липин М.Ю., Шемякин И.Г. Сполиготипы клинических штаммов *A*, *tuberculosis*, выделенных от больных туберкулёзом Центрального Региона России // Туберкулёз сегодня. Материалы VII Российского съезда фтизиатров. - Москва. - 2003. - С. 115.

6. Степаншина В.Н., Липин М.Ю., Иванов И.Ю., Шемякин И.Г., Ильина Е.А. Характеристика клинических штаммов *A*, *tuberculosis*, выделенных от больных туберкулёзом в Нижегородской области // Туберкулёз сегодня. Материалы VII Российского съезда фтизиатров. - Москва. - 2003. - С. 114-115.

7. Шемякин И.Г., Степаншина В.Н., Иванов И.Ю., Липин М.Ю., Коробова О.В., Анисимова В.А. Характеристика клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с использованием молекулярно-биологических методов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2003. - № 1. - С. 32-40.

8. Шемякин И.Г., Степаншина В.Н., Коробова О.В., Анисимова В.А., Иванов И.Ю., Липин М.Ю., Лазарев А.А., Скалдина А.И., Чернавская Л.А., Тарасова Т.И. Генетическое типирование штаммов *Mycobacterium tuberculosis* методами сполиготипирования и геномной дактилоскопии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2002. - № 6. - С. 30-35.

9. Shemyakin I.G., Lipin M.Y., Stepanshina V.N., Korobova O.V. Prevalence of drug resistant tuberculosis in Tula (Russia) // 10<sup>th</sup> Anniversary Conference of the Federation of Infection Societies. Abstract book. - Cardiff. - 2003. - P. 24.

10. Shemyakin I.G., Stepanshina V.N., Korobova O.V., Lipin M.Y., Ivanov I.Y. Investigation of drug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* derived from TB prisoners // 23<sup>rd</sup> Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology. Abstract Book. - Dubrovnik. - 2002. - P. 73.



№ - 7340