



УДК 616-002.5-079.4:577.21:615.015.8

К. О. Антоненко

## РІВЕНЬ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗБУДНИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ ДО РИФАМПІЦИНУ І МОЖЛИВІСТЬ ЇЇ ГЕНОТИПІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

Одеський державний медичний університет

### Вступ

Як відомо, з 1995 р. в Україні зареєстровано епідемію туберкульозу. За останні чотири роки (2002–2005 рр.) захворюваність на усі форми туберкульозу збільшилася на 7,0 % (з 75,6 на 100 тис. населення у 2002 р. до 84,1 на 100 тис. населення у 2005 р.) [1–3], а смертність зростає на 23,4 % (в 2002 р. — 20,5 на 100 тис. населення; у 2005 р. — 25,3 на 100 тис. населення) [2; 3].

Одним із головних факторів, що сприяє зростанню захворюваності на туберкульоз, є швидке розповсюдження штамів мікобактерій туберкульозу (МБТ), резистентних до протитуберкульозних препаратів [4].

Феномен медикаментозної резистентності МБТ має важливе клінічне значення. Первинна резистентність прямо залежить від частоти виявлення набутої резистентності; чим більше хворих виділяє стійкі штами МБТ, тим більша ймовірність здорових осіб інфікуватися хіміорезистентними МБТ. Важливого практичного значення набуває поліхіміорезистентність, а особливо її різновид — мультирезистентність (резистентність до ізоніазиду та рифампіцину). За даними ВООЗ, у світі близько 50 млн людей інфіковано ре-

зистентними до антибактеріальних препаратів штамми МБТ; щороку відсоток виникнення нових випадків туберкульозу з первинною медикаментозною стійкістю збільшується [5; 6].

Для підвищення ефективності боротьби з туберкульозом рекомендуються розробка та вивчення закономірностей епідеміологічного процесу в країні, окремих її регіонах і методів керування ним. Розв'язання цього завдання переважно покладається на генетичні медико-біологічні лабораторії, що належать до IV рівня мікробіологічних лабораторій [7]. Зокрема, в літературі з'явилися дані про визначення медикаментозної чутливості мікобактерій до різних антибактеріальних препаратів за допомогою мультиплексної алель-специфічної полімеразно-ланцюгової реакції (МАС-ПЛР). У літературних джерелах описана методика визначення мутантних послідовностей у гені *rpoB* [8], виникнення яких спричиняє медикаментозну резистентність до рифампіцину. Головними перевагами цього методу є значно більша чутливість і швидкість отримання результатів, що відіграє вирішальну роль у призначенні адекватної фармакотерапії.

**Мета** даного дослідження — вивчити розповсюдженість

резистентності збудника туберкульозу до протитуберкульозного антибіотика першого ряду рифампіцину, визначити розповсюдженість мутації у гені *rpoB* серед різних груп хворих і розробити скринінговий метод виявлення резистентності збудника туберкульозу до рифампіцину.

### Матеріали та методи дослідження

Для вивчення розповсюдженості резистентних штамів *M. tuberculosis* був проведений ретроспективний аналіз бактеріологічних досліджень на стійкість до рифампіцину, виконаних у бактеріологічній лабораторії Одеської обласної клінічної протитуберкульозної лікарні (ОКТЛ) протягом 2006 р. Згідно з наказом МОЗ України № 384 від 09.06.2006 р, визначення медикаментозної чутливості виділених культур *M. tuberculosis* необхідно обов'язково проводити до стрептоміцину, ізоніазиду, етамбутолу, рифампіцину та піразинаміду [9]. Для визначення медикаментозної резистентності користувалися методом абсолютних концентрацій на твердому живильному середовищі Левенштейна — Єнсена із застосуванням стандартних концентрацій протитуберкульозних препаратів.



Для отримання статистичних даних вивчали медичні карти пацієнтів, що перебувають чи перебували на лікуванні в ОКТЛ.

Культури збудника туберкульозу виділяли на базі бактеріологічної лабораторії ОКТЛ шляхом пасажів одноразової мікробіологічної петлі по пророслих культурах збудника туберкульозу на твердому живильному середовищі Левенштейна — Єнсена. Отримані фрагменти культур поміщали до одноразової пробірки Еппіндорфа і додавали розчин хлороформу, а потім тримали у термостаті при 95 °С протягом 20 хв.

Для визначення мутацій у гені *groV*, а саме в кодонах 516, 526 та 531, проводили МАС-ПЛР із використанням трьох праймерів [8]. Для ампліфікації кодона 516 використовували праймери R516B і R1R, для ампліфікації кодона 526 — праймери R526B і R1R, а для ампліфікації кодона 531 — праймери R531B і R1R. За умов відсутності мутації в кодоні 516, 526 та 531 гена *groV* ампліфікувалися 214, 181 та 167 пар нуклеотидних (п. н.) фрагментів відповідно. При мутації в будь-якому з трьох кодонів, що досліджуються, відповідний фрагмент не ампліфікується.

Для виявлення належності штамів, які досліджуються, до

родини *Beijing* застосовували визначення інсерційної послідовності IS6110 у регіоні між генами *dnaA* і *dnaN* методом ПЛР [10].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакета програм Microsoft Excel.

### Результати дослідження та їх обговорення

Загалом було виділено 102 культури збудника туберкульозу.

Згідно з отриманими даними, серед 102 культур *M. tuberculosis* резистентність до рифампіцину спостерігалась у 87 (85,3 %), що значно перевищує рівень попередніх років — 19,5 % у 2000 р. та 31 % у 2004 р. [11; 12]. Вік хворих, які виділяли рифампіцин-чутливого або рифампіцин-резистентного збудника туберкульозу, істотно не різнився і становив приблизно 41 рік. В обох групах чоловіків було 75–77 % від усієї кількості хворих, переважали сільські мешканці. Поширеність таких факторів, як паління, зловживання алкоголем, була майже однаковою серед пацієнтів груп із резистентними та чутливими до рифампіцину збудниками туберкульозу (табл. 1). Водночас, перебування в місцях позбавлення волі та попереднє протитубер-

кульозне лікування значно збільшували ризик виявлення резистентного штамів ( $P < 0,05$ ). У більшості хворих обох груп туберкульоз діагностований вперше (табл. 2). Однак серед хворих, які виділяли мутований штам збудника туберкульозу, більш ніж утричі частіше виявлялися хронічні форми туберкульозу ( $P < 0,05$ ).

За даними МАС-ПЛР, розповсюдженість мутацій у гені *groV*, що досліджувалися, сягала 45,1 % (рис. 1). Із них 4,8 % становили мутації в кодоні 516 гена *groV*; 14,3 % — мутації в кодоні 526 і решта — 80,9 % — мутації в кодоні 531. У попередніх дослідженнях, проведених у 2003–2004 рр., мутації в кодонах 516, 526 та 531 дорівнювали 5,9; 17,6 і 76,5 % відповідно; розповсюдженість мутацій у гені *groV* сягала 31,1 % [13].

Серед мутованих штамів збудника туберкульозу 93,5 % належали до рифампіцин-резистентних за культуральними даними штамів, а серед рифампіцин-чутливих штамів 80 % не мали мутацій, що досліджувалися.

Деякі показники, такі як вік, стать, місце мешкання, зловживання алкоголем, паління, не відрізнялися у хворих, які виділяли штами збудника туберкульозу з мутаціями в гені *groV*, і

Таблиця 1

### Вплив певних факторів на рівень резистентності до рифампіцину та розповсюдженість мутацій у гені *groV*

Чутливість штамів	Фактори ризику			
	Паління	Зловживання алкоголем	Перебування в місцях позбавлення волі	Попереднє протитуберкульозне лікування
За даними культурального методу				
Резистентність до рифампіцину, n=87	75 (86,2 %)	41 (47,1 %)	30 (34,5 %)	49 (56,3 %)
Чутливість до рифампіцину, n=15	13 (86,7 %)	6 (40,0 %)	1 (6,7 %)*	4 (26,7 %)*
За даними полімеразно-ланцюгової реакції				
Наявність мутації в гені <i>groV</i> , n=46	37 (80,4 %)	22 (47,8 %)	18 (39,1 %)	30 (65,2 %)
Відсутність мутації в гені <i>groV</i> , n=56	51 (91,1 %)	25 (44,6 %)	13 (23,2 %)#	23 (41,1 %)#

Примітка. \* —  $P < 0,05$  (відносно відповідних показників у групі, що мала резистентність до рифампіцину); # —  $P < 0,05$  (відносно відповідних показників у групі з мутаціями в гені *groV*).



## Розподіл хворих, що виділяли збудника туберкульозу, серед різних форм хвороби

Чутливість штамів	Група хворих			
	ВДТБ, кількість	ХТБ, кількість	РТБ, кількість	Загалом, кількість
За даними культурального методу				
Резистентність до рифампіцину	58/87 (66,7 %)	22/87 (25,3 %)	7/87 (8,0 %)	87 (100 %)
Чутливість до рифампіцину	13/15 (86,7 %)	1/15 (6,7 %)*	1/15 (6,7 %)	15 (100 %)
За даними полімеразно-ланцюгової реакції				
Наявність мутації в гені <i>groV</i>	23/46 (50,0 %)	20/46 (43,5 %)	3/46 (6,5 %)	46 (100 %)
Відсутність мутації в гені <i>groV</i>	48/56 (85,7 %)#	3/56 (5,4 %)#	5/56 (8,9 %)	56 (100 %)

Примітка. \* —  $P < 0,05$  (відносно відповідних показників групи, що мала резистентність до рифампіцину); # —  $P < 0,05$  (відносно відповідних показників у групі з мутаціями в гені *groV*); ВДТБ — туберкульоз, вперше діагностований; ХТБ — хронічний туберкульоз; РДБ — рецидивний туберкульоз.

тих, які не мали мутацій (див. табл. 1).

Хворі з мутаціями в гені *groV* збудника туберкульозу більш ніж у 1,5 рази частіше відбували покарання в місцях позбавлення волі та проходили раніше протитуберкульозне лікування ( $P < 0,05$ , див. табл. 1).

Серед хворих, що виділяли штамми з мутаціями, майже в 8 разів частіше спостерігалися хронічні форми туберкульозу ( $P < 0,05$ ) і у 1,7 разу рідше вперше діагностований туберкульоз легень ( $P < 0,05$ , див. табл. 2).

Щодо наслідків протитуберкульозного лікування слід відзначити, що у хворих, які не мали мутацій в гені *groV*, майже утричі частіше спостерігалися процеси розсмоктування туберкульозних інфільтратів і вогнищ та рубцювання туберкульозних порожнин, ніж у хворих із мутаціями, що досліджувалися ( $P < 0,05$ , рис. 2). Також у першій групі майже удвічі частіше досягалась абацилярність хворих на момент виписування ( $P < 0,05$ ). Нарешті, серед причин виписування у хворих, що виділяли мутований штам, переважало переривання терапії (порушення лікарняного режиму, самовільне полишення лікарні), тимчасом як у хворих із немутуваними штамми — переведення на амбулаторне лікування ( $P < 0,05$ ).

Згідно з отриманими даними, розповсюдженість штамів з ро-

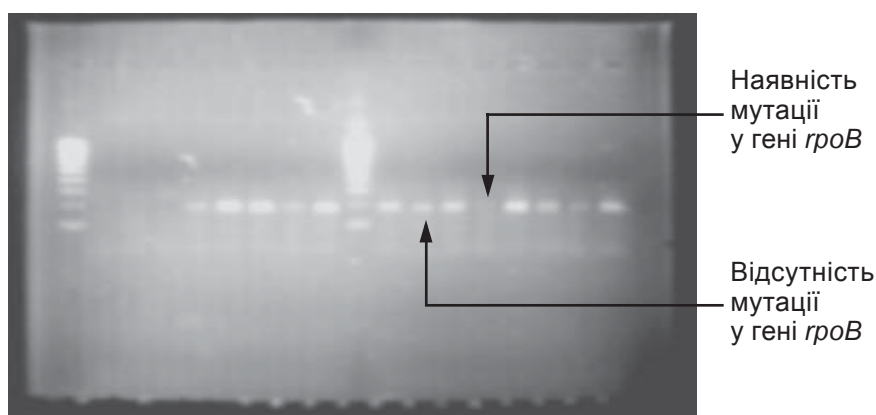


Рис. 1. Мультиплексна ПЛР для визначення мутації в кодоні 531 гена *groV*

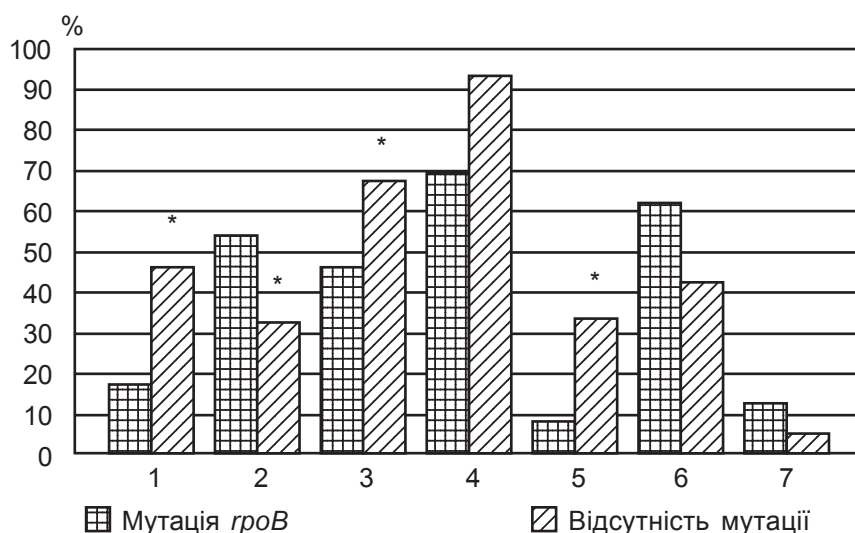


Рис. 2. Ефективність лікування та причини виписування хворих на туберкульоз, які виділяли *M. tuberculosis* з мутацією в гені *groV* (кодони 516/526/531) і без неї

Примітка. \* —  $P < 0,05$ ; 1 — часткове розсмоктування та рубцювання; 2 —  $M^+$ ;  $K^+$  на час виписування; 3 — припинення бактеріовиділення за мікроскопією на час виписування; 4 —  $M^-$  до 120 днів; 5 — виписування хворих на амбулаторне лікування; 6 — перерва лікування; 7 — смерть хворого (2006 р.).

дини *Beijing* становила 43,1 %, що дещо вище даних 2003 р. — 39,6 %. Якщо серед нематованих (диких або природних) штамів переважали ті, що не належать до родини *Beijing*, то більшість матованих штамів — представники саме цієї родини (табл. 3). Наші дані свідчать також про більшу розповсюдженість мутації серед родини *Beijing*, що також підтверджено в інших роботах [13].

Під час госпіталізації у 82–90 % хворих виявляли збудника туберкульозу за допомогою мікроскопії, що відповідає світовим вимогам, а саме: підтвердження діагнозу туберкульозу за допомогою мікроскопії не менш як у 75 % хворих.

На користь можливості розвитку мутації в кодонах 516/526/531 гена *rpoB* під час лікування свідчить більша частота мутацій серед хворих із хронічною формою та тих, що отримували попередню протитуберкульозну фармакотерапію.

Наявність мутації у 516/526/531 гена *rpoB* асоціювалась із меншою перспективою процесів розсмоктування туберкульозних інфільтратів і вогнищ та рубцювання туберкульозних порожнин, більшою можливістю бактеріовиділення під час виписування та підвищеною ймовірністю переривання лікування. Зважаючи на приблизно однаковий термін стаціонарного лікування хворих, які досліджувались і виділяли мутантний або немутантний штам збудника туберкульозу, це можна пояснити необхідністю більш трива-

лого лікування хворих із мутантним штамом.

### Висновки

1. Протягом 2000–2006 рр. в Одеському регіоні спостерігається зростання резистентності збудника туберкульозу до рифампіцину більш ніж удвічі, що підвищує ризик інфікування вже резистентними штамми *M. tuberculosis*.

2. Розповсюдженість штамів родини *Beijing* сягає 43,1 %, що перевищує дані 2003 р. — 39,6 %. Розповсюдженість мутацій у гені *rpoB*, що досліджувалися, становила 45,1 %, що майже в 1,5 рази перевищує аналогічний показник 2003 р. Це свідчить про зростання розповсюдженості резистентних до рифампіцину штамів *M. tuberculosis*.

3. У хворих, які раніше перебували в місцях позбавлення волі, частіше виявляли мутації в кодонах 516/526/531 гена *rpoB*.

4. Відзначалася більша частота мутацій *rpoB* штамів *M. tuberculosis*, виділених від хворих з хронічною формою туберкульозу, а також осіб, що раніше отримували протитуберкульозне лікування. У хворих, які виділяли штами *M. tuberculosis* без мутацій в кодонах 516/526/531 гена *rpoB*, частіше відбувалися процеси розсмоктування туберкульозних інфільтратів і вогнищ та рубцювання туберкульозних порожнин, рідше зберігалось бактеріовиділення на час виписування та траплялося переривання лікування. Отже, наявність мутацій у кодонах 516/526/531 гена *rpoB* є несприят-

ливим фактором для успішності лікування.

5. Серед матованих штамів збудника туберкульозу 93,5 % належали до рифампіцин-резистентних за культуральними даними штамів. Спосіб визначення мутацій у кодонах 516/526/531 гена *rpoB* за допомогою мультиплексної алель-специфічної ПЛР може бути рекомендований як експрес-метод визначення резистентності до рифампіцину.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Від ефективного контролю за туберкульозом залежить національна безпека // Прес-реліз МОЗ України від 24.03.2005 (<http://www.moz.gov.ua/ua/main/press/?docID=3027>)

2. Лалтєва Н. О. Епідеміологічна ситуація з туберкульозу в Україні за 2004 рік // Доповідь на засіданні Вченої ради Інституту фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України 27 вересня 2005 року.

3. Показники здоров'я населення та діяльності закладів охорони здоров'я Одеської області за 2004–2005 рр. — Одеса, 2006. — 337 с.

4. Епідеміологія туберкульозу у світі, сучасні підходи до організації протитуберкульозних заходів / Ю. І. Феценко, В. М. Мельник, В. Г. Матусевич, Л. М. Антоненко // Укр. пульмонол. журнал. — 2003. — № 4. — С. 5-10.

5. Laszlo A. The correlation between clinically resistant tuberculosis and laboratory drug resistance // Intern. J. Tuberc. and Lung Dis. — 2001. — Vol. 5, N 11. — P. 3-4.

6. Global tuberculosis control: WHO Report 2002. — Geneva, 2002. — 295 p.

7. Феценко Ю. І., Мельник В. М. Стан і проблеми протитуберкульозної допомоги населенню України та шляхи її поліпшення // Укр. пульмонол. журнал. — 2004. — № 2. — С. 6-11.

Таблиця 3

Розповсюдженість штамів *M. tuberculosis* родини *Beijing* серед рифампіцин-резистентних і рифампіцин-чутливих ізолятів за даними культурального та ПЛР методів

Штам <i>M. tuberculosis</i>	ПЛР		Культуральний метод	
	<i>rpoB</i> мутація	<i>rpoB</i> дикий тип	рифампіцин-резистентність	рифампіцин-чутливість
<i>Beijing</i>	27 (58,7 %)	18 (32,1 %)*	39 (44,8 %)	6 (40,0 %)
non <i>Beijing</i>	19 (41,3 %)	38 (67,9 %)*	48 (55,2 %)	9 (60,0 %)
Всього	46 (100 %)	56 (100 %)	87 (100 %)	15 (100 %)

Примітка. \* —  $P < 0,05$  (відносно штамів з *rpoB* мутаціями).





8. *Allele-specific rpoB assays for detection of Rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Sputum Smears* / I. Mokrousov, T. Otten, B. Vyshnevskiy, O. Narvskaya // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. — 2003. — Vol. 47, N 7. — P. 2231-2235.

9. *Наказ МОЗ України № 384 від 09.06.2006 р. «Протокол надання медичної допомоги хворим на туберкульоз»* / Укл. під керівництвом Ю. І. Феценка, Л. В. Кучугура-Кучеренко, В. М. Петренко та ін. — К., 2006. — 87 с.

10. *Genotypic Analysis of Mycobacterium tuberculosis in Bangladesh and Prevalence of the Beijing Strain* / S. Banu, Stephen V. Gordon, Si Palmer et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — N 42 (2). — P. 1861.

11. *Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis strains from the southern Ukraine* / V. V. Nikolayevskyy, T. J. Brown, Y. I. Bazhora et al. // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2006. — N 6. — P. 1-10.

12. *Показники стійкості мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозних препаратів першого ряду в м. Одесі та Одеській області* / В. В. Николаєвський, В. Й. Кресюн, К. О. Пруднікова, О. К. Асмолов // *Одес. мед. журнал*. — 2004. — № 3. — С. 59-63.

13. *Николаевский В. В., Дробневский Ф. А., Бажора Ю. И. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов микобактерий, выделенных в Южном регионе Украины* // *Цитология и генетика*. — 2004. — № 4. — С. 29-33.

УДК 616.248-053.2-08:616.233

Л. О. Безруков, О. К. Колоскова, М. Н. Гарас

## ПОКАЗНИКИ ЛАБІЛЬНОСТІ БРОНХІВ ЗА РІЗНОГО СТУПЕНЯ ТЯЖКОСТІ БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ В ДІТЕЙ ШКІЛЬНОГО ВІКУ

Буковинський державний медичний університет, Чернівці

Наразі ключові завдання ступінчастої терапії бронхіальної астми (БА) в дітей до кінця не вирішені, оскільки єдиним об'єктивним критерієм ступеня тяжкості та рівня контролю над хворобою, відповідно до сучасних рекомендацій [1], залишається показник швидкості видиху (ПШВ) чи об'єм форсованого видиху за 1 с (ФОВ<sub>1</sub>). Проте слід визнати, що самі по собі ці показники мають недостатню діагностичну цінність у вирішенні даних ключових завдань лікування БА. Враховуючи, що гіперсприйнятливість дихальних шляхів (ГСДШ) є характерною особливістю хворих на БА дітей, використання її показників можна вважати перспективним. Втім, зважаючи на те, що бронхопровокаційні проби з гістаміном і метахоліном, які використовуються для її оцінки, несуть у собі значний ризик ускладнень, особливу зацікавленість викликає застосування більш «фізіологічних» тестів, зокрема, проби з фізичним навантаженням [2; 3]. Водночас, у зв'язку з труднощами в стандартизації даного тесту, отримані результати є суперечливими.

**Мета** дослідження — визначення діагностичної цінності показників лабільності бронхів у дітей шкільного віку, хворих на БА різного ступеня тяжкості, за даними проби з фізичним навантаженням та інгаляцією сальбутамолу.

### Матеріали та методи дослідження

Для досягнення мети у позапрístupному періоді обстежено 111 дітей шкільного віку, хво-

рих на БА. Виходячи із тяжкості БА, сформовано 3 клінічні групи спостереження. До першої (I) групи увійшли діти з легким (контрольованим) перебігом БА, до складу другої (II) — пацієнти із середньотяжким персистуючим перебігом (частково контрольована БА), а до третьої (III) — хворі на тяжку персистуючу (неконтрольовану) астму [4].

За основними клінічними характеристиками групи порівняння суттєво не відрізнялися. Так, у I клінічній групі хлопчиків було 84,2 %, у II — 84,3 % та у III — 87,8 %. Середній вік хворих I групи становив (13,6±0,5) року, II групи — (12,5±0,4) року та III — (11,9±0,4) року (P:I:III>0,05). Тривалість захворювання в групах порівняння суттєво не відрізнялася. Так, у I групі вона дорівнювала в середньому (6,8±0,7) року, у II — (5,7±0,5) року та в III — (6,8±0,6) року (P>0,05).

Лабільність дихальних шляхів вивчали за допомогою діагностичного автоматизованого комплексу «КАРДИО+». Результати оцінювали за допомогою показника лабільності бронхів (ПЛБ), який можна розглядати як сумарну величину зниження їх прохідності у відповідь на фізичне навантаження та зменшення прихованого бронхоспазму після інгаляції сальбутамолу. Цей спірографічний індекс розраховували за формулою:

$$\text{ПЛБ} = \left[ \frac{(\text{ФОВ}_1 \text{ після інгаляції} - \text{ФОВ}_1 \text{ вих}) + (\text{ФОВ}_1 \text{ після інгаляції} - \text{ФОВ}_1 \text{ після бігу})}{\text{ФОВ}_1 \text{ вих}} \right] \cdot 100 \%$$

