

УДК: 616.24-002.5:616.9

Цапенко Ю.П., Бойко М.Г., Алієва Н.М., Красношанка Ю.О., Буслик Т. В., Краєвська О.О., Новіков С.В.

ПЕРЕВАГА ШТАМІВ *M. TUBERCULOSIS* РОДИНИ BEIJING СЕРЕД ВПЕРШЕ ВИЯВЛЕНИХ ХВОРИХ ТУБЕРКУЛЬОЗОМ В ПОЛТАВСЬКІЙ ОБЛАСТІ

Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*Метою дослідження було проведення генотипічного аналізу та вивчення розповсюдженості штамів *M. Tuberculosis* родини *Beijing* серед вперше виявлених хворих туберкульозом в Полтавській області. Матеріали і методи. У дослідженні брали участь хворі із вперше виявленим туберкульозом легень (n=100). Визначення належності ізолятів *M. Tuberculosis* до родини *Beijing* проводилося за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Продукт ампліфікації аналізували за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі. Результати та їх обговорення. Частота інфікування штамми родини *Beijing* у досліджуваній групі хворих на вперше виявлений туберкульоз по Полтавській області сягала 70,8 %. Серед вперше виявлених хворих туберкульозом резистентність в 2 рази частіше спостерігалася в ізолятах родини *Beijing* порівняно з іншими штамми *M. Tuberculosis*. Також спостерігався більший показник полірезистентності серед штамів родини *Beijing*. Висновок. Виражена асоційованість генотипу *Beijing* з резистентністю до основних протитуберкульозних препаратів потребує впровадження молекулярно-генетичної діагностики в фтизіатричну практику.*

Ключові слова: туберкульоз, молекулярна біологія, родина *Beijing*.

Робота є фрагментом науково-дослідної теми НДР «Клініко-функціональні та морфологічні особливості перебігу захворювань респіраторної системи (туберкульозу, саркоїдозу, дисемінованих процесів та ХНЗЛ) та розробити методи корекції виявлених порушень на різних етапах лікування, реабілітації та профілактики», № держ.реєстрації 0110U008151.

Вступ

Молекулярна клінічна діагностика — наука, що виявляє причини та механізми інфекційних та соматичних захворювань на молекулярному рівні шляхом визначення генів і продуктів їх діяльності — білків та нуклеїнових кислот, перебуває на етапі бурхливого розвитку. Молекулярна біологія вважається молодого наукою. Не дивлячись на відносну молодість, за роки свого існування вона здійснила значний вплив на розвиток науки про інфекційні хвороби і зокрема на розвиток фтизіатрії [10].

До 1990 року відмінність між окремими штамми збудника туберкульозу визначалася переважно за допомогою фаготипування та по характеру лікарської стійкості, що значно обмежувало можливості епідеміологічних досліджень, оскільки кількість фаготипів *M. tuberculosis* (МБТ) значно обмежена, а метод антибіограми застосовується тільки по відношенню до медикаментозно-стійких штамів [5, 7].

З середини 80-х років ХХ ст. проводилися численні дослідження з вивчення геному мікобактерій туберкульозного комплексу — *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* і *M. microti*. Визначена повна послідовність геномів *M. leprae* та двох штамів *M. tuberculosis*, зокрема лабораторного штаму H37Rv і клінічного ізоляту з високою вірулентністю CDC1551 [4, 5, 8].

Геном МБТ був повністю розшифрований в 1998 році групою авторів під керівництвом S. Cole. Він містить близько 4000 рамок зчитування, які кодуєть білки та 4 411 529 п. н., 65,6 % яких становлять гуанін і цитозин [4, 8]. Після розшифрування геному H37Rv визначено функ-

цію близько 40 % генів і доведено ймовірні функції ще 20 % із них. Однією з особливостей геному *M. tuberculosis* є присутність генів, що багаторазово дублюють функціонування ключових ферментних систем. Доведено, що МБТ синтезує всі необхідні складові для обміну речовин: незамінні амінокислоти, вітаміни, ферменти і кофактори. Генний апарат *M. tuberculosis* сприяє швидкій адаптації мікроорганізму до різних змін довкілля [8]. В наш час молекулярна генетика МБТ вважається однією з найбільш вивчених серед інших мікроорганізмів [4].

Вивчення циркуляції і розповсюдження штамів туберкульозу як спосіб епідемічного контролю є важливою задачею, котра не вирішена до цього часу. Завдяки генетичним відмінностям серед штамів *M. tuberculosis* можна встановити вогнища, шляхи передачі та трансмісію штамів МБТ [1, 4, 7, 8].

Методи генотипування *M. tuberculosis*, які застосовуються в молекулярній епідеміології, досить різні. Мікобактерії, що належать до туберкульозного комплексу, генетично досить консервативні. Для них характерна ідентична нуклеотидна послідовність гена 16S PНК, і вони на 99,9 % гомологічні на генетичному рівні. Основним джерелом їх генетичного поліморфізму є мобільні генетичні елементи (IS — елементи, профаги), елементи, що повторюються (DR, MIRU) та делеції [1, 8].

Золотим стандартом для вивчення генетичних перебудов *M. tuberculosis* є типування по поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів хромосомної ДНК, які містять IS6110. Окрім цьо-

го, застосовуються методи, засновані на полімеразній ланцюговій реакції: типування по числу спейсорних послідовностей DR — регіону (сполінготипування), по варіабельному числу тандемних повторів (VNTR), по числу розсіяних повторів (MIRU), поліморфну збагачену G-C повторами послідовність (PGRS) [1, 4, 5, 7, 8].

Методи молекулярної епідеміології дали також нові можливості для встановлення асоціації між генотипом збудника й особливостями клінічного перебігу захворювання, вивчення чинників ризику трансмісії медикаментозно резистентних штамів і штамів із підвищеною патогенністю. Несприятлива епідеміологічна ситуація з туберкульозу залежить від поширеності, у першу чергу, штамів генетичної родини Beijing (W) [2, 3, 4, 5, 6, 8, 9]. Генотип Beijing (W) був виявлений в багатьох частинах світу. Вперше даний штам був виявлений в Китаї, а подальші дослідження продемонстрували широку розповсюдженість даного сімейства в країнах Азії та минулого Радянського Союзу [2, 3, 4, 5]. Штам W став причиною більше 500 випадків захворювання в Нью-Йорку [5]. Доведено, що коли штам родини Beijing вперше упроваджується в популяцію, він швидко починає розповсюджуватися. Прикладом є спалах туберкульозу на острові Гран-Канарія в 1993 році, коли після потраплення на острів пацієнта, інфікованого штамом родини Beijing, потрібно було лише 3 роки для швидкої дисемінації даного генотипу [3]. В Російській Федерації генотип Beijing є превалюючим майже повсюдно – це було виявлено дослідженнями в багатьох округах [4]. За даним рядом експериментів, штам має підвищену вірулентність і можливість обійти імунологічний захист організму, та несе загрозу розвитку розповсюдження множинної лікарської стійкості [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9].

Мета дослідження

Проведення генотипового аналізу та вивчення розповсюдженості штамів M. Tuberculosis родини Beijing серед вперше виявлених хворих туберкульозом в Полтавській області.

Матеріали і методи

У дослідженні брали участь хворі із вперше виявленим туберкульозом легень (n=100) на базі Полтавського обласного клінічного протитуберкульозного диспансеру протягом травня - вересня 2012 року.

Посів, культивування, ідентифікація та визначення чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів були проведені у бактеріологічній лабораторії ПОКТД згідно з наказом МОЗ України № 45 від 06.02.02 р. Дослідження медикаментозної стійкості до препаратів першого та другого ряду препаратів здійснювалося з використанням методу абсолютних концентрацій на щільному живильному середовищі Левенштейна-Йенсена у відповідності до зазначеного наказу.

На базі інституту свинарства і агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України проводилося визначення належності ізолятів M. Tuberculosis до родини Beijing за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка базується на визначенні IS 6110 інсерції у міжгенній dnaA – dnaD ділянці. Продукт ампліфікації аналізували за допомогою електрофорезу в 1%-му агарозному гелі. За наявності інсерції розмір апліфікованого продукту складав 2000 пар нуклеотидів, що відповідало належності збудника до родини Beijing. За відсутності інсерції розмір апліфікованого фрагменту дорівнював 537 п.н. (рисунок 1).

pUC19/MspI 1 2 3 4 5 6 7 9 10 1kb

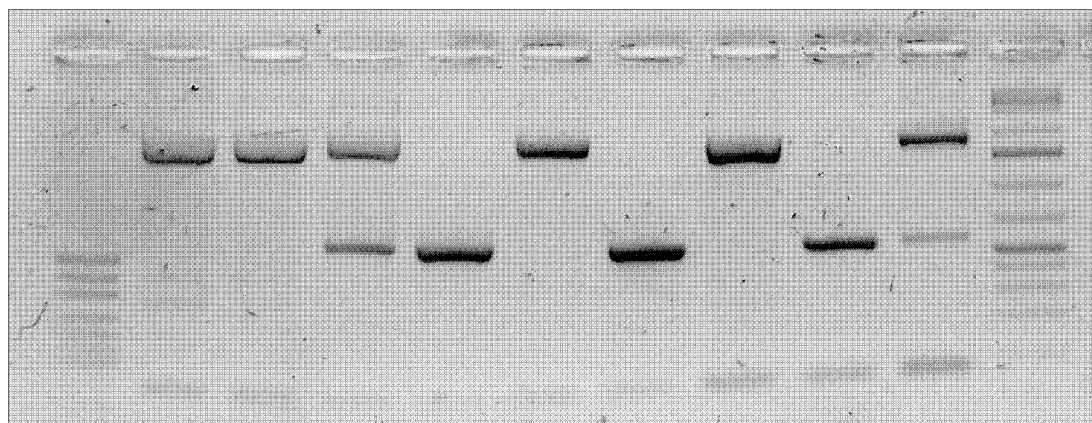


Рисунок. Електрофореграма зразків ДНК M. Tuberculosis: на 1, 2, 3, 5, 7, 10 доріжках ДНК належить до родини Beijing, 1kb – маркер молекулярної маси; стрілками вказані розміри фрагментів 2000, 537 пар нуклеотидів.

Результати та їх обговорення.

В результаті проведеної роботи всього культур було отримано від 100 хворих з вперше виявленим туберкульозом легень. Одинадцять культур внаслідок контамінації або інших причин були виключені з подальшого аналізу. Таким чином, апліфікація ДНК ізолятів, з метою ідентифікації штамів родини Beijing, була проведена на матеріалі 89 культур M. Tuberculosis хворих з вперше виявленим туберкульозом легень. Належність до родини Beijing виявлено 63 зразках (70,8 %). Належність ізоляту до інших родин M. Tuberculosis визначено у 26 (29,2 %) випад-

ках. Середній вік пацієнтів коливався у межах 44,7±1,4 років. Серед пацієнтів чоловіків було 79,8 %, жінок – 18 осіб (20,2%). Мешканці міста Полтави склали 36,9 %, інші (73,1 %) були мешканцями Полтавської області. У 8 пацієнтів (8,9 %) була наявна ВІЛ- інфекція.

В результаті проведеного аналізу резистентності M. Tuberculosis до хіміопрепаратів відмічаємо в 2 рази більший рівень резистентності мікобактерій в родині Beijing (38,1 %) у порівнянні з штамми інших генетичних груп (19,23 %) (p<0,001) (таб. 1).

Таблиця 1

Резистентність до протитуберкульозних препаратів штамів родини Beijing та інших родин

Резистентність або чутливість	Генотип	
	Beijing	Інший
Резистентність	24/63 (38,1%)	5/26 (19,23%)
Чутливість	19/63 (30,16%)	15/26 (57,69%)
Монорезистентність	7/63 (11,11%)	—
Полірезистентність	17/63 (27%)	5/26 (19,2%)

Чутливими до протитуберкульозних препаратів серед штамів іншого генотипу були 57,69%, що в 1,9 рази перевищувала чутливість серед штамів родини Beijing (30,16%) (p<0,005). Таким чином, результати нашого аналізу підтверджують дані попередніх досліджень [2, 3, 6, 9 та інш.] про виражену асоційованість генотипу Beijing з резистентністю до основних протитуберкульозних препаратів. При подальшому аналізі монорезистентність (стійкість до одного препарату) відмічалася лише серед штамів родини Beijing, і становила 11,11 %. В 1,4 рази перевищував показник полірезистентності (стійкість до двох і більше препаратів) серед штамів родини Beijing (27 %) у порівнянні з штамом іншого генотипу (19,2 %) (p<0,05). При цьому з них 6 ізолятів бактерій (9,5 %) в родині Beijing були мультирезистентними (стійкими до рифампіцину та ізоніазиду одночасно), а серед ізолятів іншого генотипу цей показник становив 7,6 %. Поряд з цим, серед полірезистентних ізолятів бактерій родини Beijing стійкість до препаратів другого ряду спостерігалася у 9 (14,2 %) штамів, тоді як серед ізолятів іншого генотипу стійкість до другого ряду була відмічена у 3 (11,5 %) штамів.

Серед 8 ізолятів від хворих туберкульозом з наявною ВІЛ-інфекцією 2 ізоляти відносилися до іншого генотипу й були чутливими протитуберкульозних хіміопрепаратів. В свою чергу інші 6 ізолятів бактерій були штамми родини Beijing, та мали всі стійкість до препаратів першого та другого рядів.

Висновок

1. Частота інфікування штамми родини Beijing у досліджуваній групі хворих на вперше виявлений туберкульоз по Полтавській області сягала 70,8 %.

2. Серед вперше виявлених хворих туберкульозом резистентність в 2 рази частіше спостерігалася в ізолятах родини Beijing (38,1%) порівняно з іншими штамми M. Tuberculosis

(19,23%).

3. Показник полірезистентності був більший серед штамів родини Beijing (27 %) у порівнянні з штамом іншого генотипу (19,2 %).

4. Виражена асоційованість генотипу Beijing з резистентністю до основних протитуберкульозних препаратів потребує впровадження молекулярно-генетичної діагностики в фтизіатричну практику.

Література

1. Андреевская С.Н. Трансмиссия штаммов микобактерий туберкулеза, обусловленная миграционными процессами в Российской Федерации (на примере миграции населения из Кавказского Региона в Москву и Московскую область) / С.Н. Андреевская, Л.Н. Черноусова, Т.Г. Смирнова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2006. – № 1. – С. 29-35.
2. Асмолов О.К. Медикаментозна резистентність мікобактерій туберкульозу в Одеській області України та фактори ризику розповсюдження резистентного туберкульозу: дані перспективного дворічного дослідження / О.К. Асмолов, В.В. Николаевский, В.И. Кресюн [та ін.] // Український пульмонологічний журнал. – 2005. – № 2. – С. 9-15.
3. Балабанова Я.М. Преобладание штаммов Mycobacterium tuberculosis семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области / Я.М. Балабанова, В.В. Николаевский, М. Радди [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2006. – № 2. – С. 31-36.
4. Баранов А.А. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерии туберкулеза / А.А. Баранов, А.О. Марьяндышев // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2008. – № 4. – С. 3-8.
5. Карачунский М.А. Молекулярная эпидемиология туберкулеза / М.А. Карачунский, Л.Н. Черноусова // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2007. – № 4. – С. 3-8.
6. Ляшенко О.О. Мікобактерії різних генотипів та їх роль в клінічній картині туберкульозу легень: спец. 14.01.26. «Фтизіатрія» / О.О. Ляшенко. - К., 2008. – 20 с.
7. Матракин А. Г. Генотипическая характеристика штаммов Mycobacterium tuberculosis из Республики Тыва / А.Г. Матракин, Е.М. Месько, Н.К. Белякова [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2004. – № 3. – С. 37-40.
8. Пішак В.П. Туберкульоз: генетичні аспекти взаємодії організму людини і M. tuberculosis / В.П. Пішак, С.П. Польова, Ю.І. Бажора, М.М. Чеснокова // Інтегративна антропологія. – 2011. – № 1. – С. 4-11.
9. Тунгусова О.С. Влияние лекарственной устойчивости на фитнес микобактерий туберкулеза генотипа W- Beijing / О.С. Тунгусова, А.О. Марьяндышев, Д. А. Каугант [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2005. – № 8. – С. 46-50.
10. Чумак А.А. Молекулярно-генетичні дослідження в лабораторній діагностиці на сучасному етапі / А.А.Чумак // Лабораторна діагностика. – 2009. – № 1. – С. 3.

Реферат

ПРЕИМУЩЕСТВО ШТАММОВ M. TUBERCULOSIS СЕМЕЙСТВА BEIJING СРЕДИ ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫХ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЁЗОМ В ПОЛТАВСКОЙ ОБЛАСТИ

Цапенко Ю.П., Бойко Н.Г., Алиева Н.Н., Красношапка Ю.О., Буслик Т.В., Краевская А.А., Новиков С.В.

Ключевые слова: туберкулёз, молекулярная биология, семейство Beijing.

Целью исследования было проведение генотипического анализа и изучение распространения штаммов M. Tuberculosis семейства Beijing среди впервые выявленных больных туберкулёзом в Полтавской области. Материалы и методы. У исследовании принимали участие больные с впервые выявленным туберкулёзом лёгких (n=100). Определение отношения изолятов M. Tuberculosis к семейству Beijing проводилось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Продукт амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1% -ом агарном геле. Результаты и их обсуждение. Частота инфицирования штаммами семейства Beijing у исследованной группы больных на впервые выявленный туберкулёз по Полтавской области становила 70,8 %. Среди впервые выявленных больных туберкулёзом резистентность в 2 раза чаще наблюдалось у изолятов семейства Beijing в сравнении с другими штаммами M. Tuberculosis. Также наблюдался больший показатель полирезистентности среди штаммов семейства Beijing. Вывод. Выраженная ассоциативность генотипа Beijing с резистентностью к основным противотуберкулёзным препаратам требует внедрения молекулярно-генетической диагностики во фтизиатрическую практику.

Summary

PREVALENCE OF M. TUBERCULOSIS STRAINS OF BEIJING GENUS AMONG PATIENTS WITH FIRSTLY DIAGNOSED TUBERCULOSIS IN POLTAVA REGION

Tsapenko Y.P., Boiko M.G., Alieva N.M., Krasnoshapka Y.O., Buslyk T.V., Kraevska O.O., Novikov S.V.

Key-words: tuberculosis, molecular biology, Beijing genus.

The objective of the research is to carry out genotypic analysis and study of M. Tuberculosis strains of Beijing genus distribution among the patients with firstly diagnosed tuberculosis in Poltava region.

Materials and methods. The investigation involved patients with firstly diagnosed tuberculosis (n=100). The polymerase chain reaction (PCR) has been used to determine isolates of M. Tuberculosis strains belonging to Beijing genus. Amplification products have been analyzed by electrophoresis in 1% of agarose gel. The results and their discussion. The frequency of M. Tuberculosis strains of Beijing genus infecting in research group of patients with firstly diagnosed tuberculosis was 70,8 % in Poltava region. Among the patients with firstly diagnosed tuberculosis the resistance has been observed to be twice frequent in isolates of Beijing genus compared with other M. Tuberculosis strains. Higher index of polyresistance among strains of Beijing genus has been also observed. Conclusion. Marked associativity of Beijing genotype with the resistance to the main anti-tubercular pharmaceuticals requires molecular genetic diagnostics introduction into phthisiology practice.