

УДК: 616-002.5: 579.252.55(574)
DOI 10.56834/26631504_2022_1_138

Л.Т. Чингисова, В.Л. Бисмилда, Ш.К. Игликова, Н.К. Токенов, К.А. Сулейменова
РГП на ПХВ «Национальный Научный центр фтизиопульмонологии РК», Алматы, Казахстан

ПРОВЕДЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ШТАММОВ M. TUBERCULOSIS, АССОЦИИРОВАННЫХ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ФТОРХИНОЛОНАМ И АМИНОГЛИКОЗИДАМ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Резюме: В Национальной референс лаборатории ННЦФ было проведено исследование ДНК 430 штаммов микобактерий туберкулеза, было установлено, что у 293 штаммов были обнаружены мутации в основном в гене *gyrA* ответственных за устойчивость к фторхинолонам и у 22 штаммов мутации в гене *rrs*, приводящих к устойчивости к амикацину, канамицину и капреомицину. При сопоставление информативности разных методов идентификации и определения лекарственной устойчивости МБТ установлено 7,0% случаев несовпадение между результатами фенотипических и генетических методов по аминогликозидам. Из 430 собранных и инактивированных изолятов были выделены ДНК и отобраны образцы для секвенирования целевых генов. Каждому штамму был присвоен индивидуальный код. Вся информация об отобранных штаммах (индивидуальный код и анкетные данные) были внесены в базу данных.

Ключевые слова: туберкулез, туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью, MTBDRsl, ZeeSan, Exiprep/Existation, ДНК.

Л.Т. Чингисова, В.Л. Бисмилда, Ш.К. Игликова, Н.К. Токенов, К.А. Сулейменова
"ҚР фтизиопульмонология Ұлттық ғылыми орталығы" ШЖҚ РМК, Алматы, Қазақстан

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ АУМАҒЫНДА ФТОРХИНОЛОНДАР МЕН АМИНОГЛИКОЗИДТЕРГЕ ТӨЗІМДІЛІГІМЕН БАЙЛАНЫСТЫ M. TUBERCULOSIS ШТАМДАРЫНА ГЕНЕТИКАЛЫҚ ПАСПОРТТАУ ЖҮРГІЗУ

Түйін: Ұлттық анықтамалық зертханасында *Mycobacterium tuberculosis*-тің 430 штаммына ДНК зерттеуі жүргізілді, 293 штаммда мутация негізінен фторхинолондарға төзімділікке жауап беретін *gyrA* генинде және 22 штаммдарда анықталғаны анықталды. *rrs* гениндегі мутация амикацинге, канамицинге және капреомицинге төзімділікке әкеледі. МБТ дәрілік төзімділігін анықтау және анықтаудың әртүрлі әдістерінің ақпараттық мазмұнын салыстыру кезінде 7,0% жағдайда аминогликозидтерге фенотиптік және генетикалық әдістердің нәтижелерінің сәйкессіздігі анықталды. ДНК жиналған және инактивацияланған 430 изоляттан бөлініп алынды және мақсатты гендердің секвенциясы үшін үлгілер алынды. Әрбір штаммға жеке код тағайындалды. Таңдалған штаммдар туралы барлық ақпарат (жеке код және жеке деректер) дерекқорға енгізілді.

Түйінді сөздер: туберкулез, кең дәріге төзімді туберкулез, MTBDRSL, ZeeSan, Exiprep/Existation, ДНК.

L.T. Chingisova, V.L. Bismilda, Sh.K. Iglkova, N.K. Tokenov, K.A. Suleymenova
RSE on PCV "National Scientific Center of Phthisiopulmonology of the Republic of Kazakhstan", Almaty, Kazakhstan

CARRYING OUT GENETIC CERTIFICATION OF M. TUBERCULOSIS STRAINS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO FLUOROQUINOLONES AND AMINOGLYCOSIDES IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

Resume: In the National Reference Laboratory of the NNCF, a DNA study of 430 strains of *Mycobacterium tuberculosis* was carried out, it was found that in 293 strains mutations were found mainly in the *gyrA* gene responsible for resistance to fluoroquinolones and in 22 strains of a mutation in the *rrs* gene leading to resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin. When comparing the information content of different methods of identification and determination of MBT drug resistance, 7.0% of cases found a discrepancy between the results of phenotypic and genetic methods for aminoglycosides. DNA was isolated from 430 collected and inactivated isolates and samples were taken for sequencing of target genes. Each strain was assigned an individual code. All information about the selected strains (individual code and personal data) were entered into the database.

Keywords: tuberculosis, tuberculosis with broad drug resistance, MTBDRsl, ZeeSan, Exiprep/Existence, DNA.

Введение. Несмотря на предпринимаемые усилия по туберкулезу, он продолжает оставаться одной из ведущих причин смерти в мире. Одним из наиболее важных факторов, препятствующих ликвидации туберкулеза, является ухудшение ситуации по лекарственно устойчивым формам туберкулеза. Казахстан входит в число стран с высоким бременем туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью (М/ШЛУ ТБ). Доля впервые выявленных больных с М/ШЛУ ТБ составляет 24,6%. Персонализированная медицина, молекулярно-генетическая паспорттизация, активно развивающиеся в настоящее время во всем мире, позволят отслеживать стабильность штамма возбудителя туберкулеза у каждого конкретного

пациента. Это, в свою очередь, позволит обеспечить персонафицированный подход к диагностике и лечению М/ШЛУ ТБ [1-12].

Цель исследования: создание системы генетической паспорттизации и комплексной оценки генетических детерминант лекарственной устойчивости *M. tuberculosis*.

Методы исследования. Исследования проводились на 430 штаммах микобактерий туберкулеза с преШЛУ/ШЛУ ТБ, которые были получены с клиники ННЦФ МЗ РК и из разных регионов Республики Казахстан (Восточно-Казахстанской, Северо-Казахстанской, Мангистауской, Павлодарской, Актюбинской, Алматинской, Туркестанской областей). Исследование лекарственной

устойчивости 430 штаммов микобактерий проводили с использованием жидкой питательной среды на автоматизированной системе Bactec MGIT-960. Для приготовления рабочих растворов противотуберкулезных препаратов использовались химически чистые субстанции с наличием сертификата качества для каждого препарата и сертификата анализа (Certificate of Analysis, COA).

Проведение молекулярно-генетических методов диагностики туберкулеза с определением генетической лекарственной чувствительности проводилось с использованием оборудования MTBDRsl, ZeeSan и Exiprep/Existation. MTBDRsl, Exiprep/Existation и ZeeSan, которые позволяют выявлять мутации в генах МБТ, ответственных за устойчивость к фторхинолонам и аминогликозидам. Результаты на Exiprep/Existation, ZeeSan выдаются через 3 часа, на MTBDRsl в течение 1-2 дней.

Из 430 собранных и инактивированных изолятов были выделены ДНК способом, предложенным Holmes D.S. и Bonner J., лизирующий буфер которого имеет следующий состав: 7M Urea, 100 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 350 mM NaCl, 2% SDS. Образец ткани подвергается гомогенизации при добавлении лизирующего буфера, далее следует фенол-хлороформная экстракция с незначительным добавлением изоамилового спирта (фенол: хлороформ: изоамиловый спирт (ФХИ)=25:24:1), и дальнейшая преципитация спиртом. Каждому штамму был присвоен индивидуальный код. Вся информация об отобранных штаммах (индивидуальный код и анкетные данные) были внесены в базу данных.

Результаты исследований: Из фенотипически протестированных 430 штаммов, было установлено 172 с преШЛУ, т.е. устойчивых к основным противотуберкулезным препаратам и фторхинолонам (левофлоксацину, моксифлоксацину), 60 ШЛУ штаммы, т.е. устойчивые к основным противотуберкулезным препаратам, фторхинолонам и линезалиду. Остальные 198 штаммов были моно и поли резистентные штаммы микобактерий туберкулеза. Все полученные результаты фенотипических тестов занесены в информационную базу данных.

Для выявления генетических детерминант лекарственной устойчивости изучаемых изолятов применялась технология мультиплексной ПЦР, амплификация генов: *gyrA*, *gyrB*, *grs*, *eis*, обратная гибридизация ампликонов со специфическими ДНК пробам дикого типа (WT probes) и мутантными участками (MUT probes), *gyrA* MUT пробы специфичны к мутациям в кодонах 90, 91 и 94; отсутствие зоны WT обусловлено мутациями в кодонах 85 – 96. Выявление мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* (уст. к фторхинолонам), *grs* (устойчивость к аминогликозидам и циклопептидам), *eis* (уст. к низким концентрациям канамицина), Из 430 протестированных ДНК микобактерий туберкулеза, было установлено, что у 293 штаммов

были обнаружены мутации в основном в гене *gyrA* ответственных за устойчивость к фторхинолонам и у 22 штаммов мутации в гене *grs*, приводящих к устойчивости к амикацину, канамицину и капреомицину. Так же проводилось сопоставление информативности разных методов идентификации и определения лекарственной устойчивости МБТ в клинической практике у больных туберкулезом. Установлено, что в 7,0% случаев есть несовпадение между результатами фенотипических и генетических методов. Эти случаи несовпадений были в основном среди аминогликозидов.

По результатам проведенных исследований подготовлен массив данных для сопоставления результатов бактериологических и генетических тестов лекарственной устойчивости проанализированных образцов и формирования выборки для секвенирования целевых генов.

Выводы. Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что у 293 штаммов были обнаружены мутации в основном в гене *gyrA* ответственных за устойчивость к фторхинолонам и у 22 штаммов мутации в гене *grs*, приводящих к устойчивости к амикацину, канамицину и капреомицину. При сопоставлении информативности разных методов идентификации и определения лекарственной устойчивости МБТ в клинической практике у больных туберкулезом установлено в 7,0% случаев несовпадение между результатами фенотипических и генетическими методами по устойчивости к аминогликозидам. Из 430 собранных и инактивированных изолятов были выделены ДНК и отобраны образцы для секвенирования целевых генов. Каждому штамму был присвоен индивидуальный код. Вся информация об отобранных штаммах (индивидуальный код и анкетные данные) были внесены в базу данных. Расшировка природы множественной лекарственной устойчивости будет способствовать выявлению особенностей приспособляемости микобактерий туберкулеза к неблагоприятным факторам внешней среды, а также позволит предупредить формирование и распространение лекарственной устойчивости за счет рационализации тактики антибиотикотерапии больных туберкулезом. Исследование проводилось в рамках выполнения НТП «Национальная программа внедрения персонализированной и превентивной медицины в Республике Казахстан» по задаче 2.4. Проведение генетической паспортизации и анализа полиморфизмов в генах, ассоциированных с резистентностью к фторхинолонам и аминогликозидам, для выборки штаммов *M. tuberculosis*, выделенных от пациентов на территории Республики Казахстан, а также таргетное секвенирование генов в случае расхождения фенотипических и генетических признаков лекарственной устойчивости этих штаммов для определения новых статистически значимых маркеров и разработки рекомендаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

- 1 Стратегия ВОЗ по ликвидации туберкулеза в мире к 2035г.
- 2 The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin, WHO, 2016.
- 3 Implementing tuberculosis diagnostics. Policy framework, WHO, 2015.

- 4 The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Policy guidance WHO, 2016.
- 5 On the road to ending TB: Highlights from the 30 highest TB burden countries. WHO, 2016.

6 Rapid diagnostic test and shorter, cheaper treatment signal new hope for multidrug-resistant tuberculosis patients, WHO, 2016.

7 Bridging the growing gap between diagnosis and treatment in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), WHO, 2016.

8 Руководство по менеджменту случаев туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью в Республике Казахстан. НЦПТ МЗ СР РК/USAID/KNCV TB Care, 2014.

9 Фтизиатрия. А.С. Ракишева, Г. Цогт. Алматы 2014.

10 Структура и алгоритмы новейших и молекулярно-генетических технологий экспресс диагностики туберкулеза и лекарственной устойчивости в Казахстане. Методические рекомендации НЦПТ МЗ РК, 2013.

11 Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L. et al. Heart disease and stroke statistics: a report from the American Heart Association. Circulation. 2013. Vol. 127.

12 Global tuberculosis report, WHO, 2019.

REFERENCES

1 Strategija VOZ po likvidaciji tuberkuleza v mire k 2035g.

2 The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin, WHO, 2016.

Вклад авторов. Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи.

Конфликт интересов – не заявлен.

Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами. При проведении данной работы не было финансирования сторонними организациями и медицинскими представительствами. Финансирование – не проводилось.

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers. There was no third-party funding or medical representation in the conduct of this work. Funding - no funding was provided.

3 Implementing tuberculosis diagnostics. Policy framework, WHO, 2015.

4 The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. Policy guidance WHO, 2016.

5 On the road to ending TB: Highlights from the 30 highest TB burden countries. WHO, 2016.

6 Rapid diagnostic test and shorter, cheaper treatment signal new hope for multidrug-resistant tuberculosis patients, WHO, 2016.

7 Bridging the growing gap between diagnosis and treatment in multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), WHO, 2016.

8 Rukovodstvo po menedzhmentu sluchaev tuberkuleza s mnozhestvennoj i shirokoj lekarstvennoj ustojchivost'ju v Respublike Kazahstan. NCPT MZ SR RK/USAID/KNCV TB Care, 2014.

9 Ftiziatrija. A.S. Rakisheva, G. Cogt. Almaty 2014.

10 Struktura i algoritmy novejsih i molekularno-geneticheskikh tehnologij jekspress diagnostiki tuberkuleza i lekarstvennoj ustojchivosti v Kazahstane. Metodicheskie rekomendacii NCPT MZ RK, 2013.

11 Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L. et al. Heart disease and stroke statistics: a report from the American Heart Association. Circulation. 2013. Vol. 127.

12 Global tuberculosis report, WHO, 2019.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.

Мүдделер қақтығысы – мәлімделген жоқ.

Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған. Осы жұмысты жүргізу кезінде сыртқы ұйымдар мен медициналық өкілдіктердің қаржыландыруы жасалған жоқ. Қаржыландыру жүргізілмеді.

No conflicts of interest have been declared.

Информация об авторах:

№	ФИО полностью	Должность полностью	Место работы полностью	Ученое звание (если имеется)	Эл. почта	Номер телефона
1	Чингисова Ляйля Турсунбековна	Руководитель НРЛ	Национальный научный центр фтизиопульмонологии	Кандидат мед. наук	lchingisova@mail.ru	+77019878986
2	Бісімлда Венера Лазарьқызы	Лабораторный специалист	Национальный научный центр фтизиопульмонологии	Кандидат биологических наук	venerabismilda@mail.ru	+77075703652
3	Игликова Шолпан Кенбаевна	Врач- бактериолог	Национальный научный центр фтизиопульмонологии	Кандидат мед. наук	shigliкова@gmail.com	+77071841634
4	Сулейменова Кулзира Асылбеовна	Лабораторный специалист	Национальный научный центр фтизиопульмонологии	-	Zhanna.25.1970@mail.ru	+77020472870
5	Такенов Нурлан Кайратович	Лабораторный специалист	Национальный научный центр фтизиопульмонологии	магистр	takenovnur@gmail.com	+77477588546