

УДК 616.-002.6+577.21

А.Ж. Ахметова¹, С.Е. Рахимова¹, В.Л. Бісмiлда², М.А. Даришева³, А.Р. Ақылжанова¹¹ Өмір туралы ғылымдар орталығы, Назарбаев Университеті, Астана² Қазақстан Республикасы Туберкулез Проблемаларының Ұлттық орталығы, Алматы³ Орталық Азиядағы Ғаламдық Денсаулықты Зерттеу Орталығы, Алматы

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ӘР ТҮРЛІ ОБЛЫСТАРЫНДА ТАРАЛҒАН M. TUBERCULOSIS ИЗОЛЯТТАРЫНЫҢ РИФАМПИЦИНГЕ ТӨЗІМДІЛІГІН АНЫҚТАЙТЫН rpoB ГЕНІНДЕ МУТАЦИЯЛАРДЫ АНЫҚТАУ

Түйін

Бұл жұмыста Алматы, Қостанай және Қызылорда облыстарындағы жаңа жағдайлар арасынан бөлініп алынған штаммдардың *rpoB* генінде мутациялардың таралу сипаты мен спектрі бағаланды. Қазақстанның үш облысында таралған *M. Tuberculosis* популяциясына рифампицинге төзімділікті анықтайтын *rpoB* генінде Ser531 кодонындағы мутациялардың жоғары жиілікте (79,2%) кездесуі тән.

Негізгі сөздер: *rpoB* гені, рифампицин-төзімділік, *Mycobacterium tuberculosis*.

Кіріспе

M.tuberculosis штаммдарында дәрілік препараттарға төзімділіктің пайда болуы дүниежүзінде туберкулезге қарсы күрестегі негізгі кедергі болып табылады (1,2,3,4). Жаңадан инфекцияланғандар саны жылдан жылға көбеюде, және дәріге төзімді *M. tuberculosis* штаммдары кең таралуда. Өкінішке орай, Қазақстанда да туберкулездің дәріге төзімді түрімен ауыратын науқастар саны өсуде (5).

Рифампицин – туберкулезге қарсы қолданылатын негізгі препараттардың бірі. Белсенді түрде бөлінетін микобактерияларға, сонымен қатар белсенді емес күйдегі микобактерияларға да әсер етеді (6, 7). Препарат туберкулездің әр түрлі формаларын емдеуде кең қолданылады және қазіргі кезде барлық туберкулезге қарсы химиотерапиялық сызбанұсқалардың міндетті компоненттердің бірі болып табылады. Рифампицин микобактериялардың жасушалық қабықшасы арқылы өткеннен кейін, бактериялық РНҚ-полимеразаның β-суббірлігімен байланысады да, нәтижесінде транскрипция үрдісін тоқтатады (8).

M. tuberculosis штаммдарында рифампицинге төзімділіктің пайда болуы мен РНҚ-полимеразаның β-суббірлігін кодтайтын *rpoB* геніндегі мутациялардың арасындағы байланыс ең алғаш рет Telenti et al. (1993) жұмысында көрсетілді (9). Төзімділікке әкелетін нуклеотидтік алмасулар негізінде *rpoB* генінің 507 және 533 коддарының арасында кездесетіні анықталды, бұл аймақ RRDR (ағылш. rifampin resistance determinant region) деп аталады. 96% рифампицин-төзімді штаммдарда мутациялар осы аймақта кездеседі. Көптеген жағдайда (86 % жағдайға дейін) нуклеотидтік алмасулар 531, 526 және 516 коддарда табылады.

Зерттеу жұмысының мақсаты: Қазақстанның 3 облысынан (Алматы, Қызылорда, Қостанай облыстары) жаңа жағдайлар арасынан бөлініп алынған *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының *rpoB* генінде мутациялар жиілігін анықтау.

Материалдар мен әдістер

Зерттеу жұмысында Алматы, Қызылорда және Қостанай облыстарынан жиналған фенотиптік рифампицинге төзімді 48 және сезімтал 48 *M.tuberculosis* клиникалық изоляттары анализденді. Барлық изоляттардың рифампицинге дәрілік сезімталдығы Қазақстан Республикасы Туберкулез Проблемаларының Ұлттық Орталығы референс-

зертханасында (Алматы қаласы) абсолютті концентрациялар әдісімен анықталды. Бақылау ретінде *M.tuberculosis* H37Rv референтті штаммы (NC_000962) қолданылды. Жиналған *M.tuberculosis* клиникалық изоляттарының тіршілік белсенділігі 80°C температурада 30 минут зиянсыздандырылды. ДНҚ Supply, 2004 нұсқауына сәйкес бөлінді.

M. tuberculosis клиникалық изоляттарының рифампицин төзімділігіне жауап беретін *rpoB* генінің амплификациясын құрамында 10xdNTP, 10xbuffer, 2,5 mM MgCl₂, 1 бірлік Taq-полимераза (Fermentas, ЕС) және 10 пмоль әрбір праймер бар стандартталған реакциялық қоспада Eppendorf амплификаторында өткіздік. *rpoB* генінің нуклеотидтік тізбектерін анықтауды өндіруші-компания хаттамаларына сәйкес ABI 3730 (Applied Biosystems, АҚШ) генетикалық анализаторының көмегімен жүзеге асырдық. *rpoB* генінің алынған тізбектерінің салыстармалы анализін *M.tuberculosis* H37Rv штаммының референсті тізбегімен (NC_000962) SeqScape (Applied Biosystems) бағдарламасы көмегімен өткіздік.

Зерттеу нәтижелері

96 *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының (сезімтал және төзімді) рифампицинге төзімділікке жауап беретін мутациялар кездесетін *rpoB* генінің нуклеотидтік тізбектерін анықтау бойынша зерттеу жұмыстары өткізілді.

Барлық *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарының (сезімтал да, төзімді де) *rpoB* генінде мутациялар 46 (47,9%) изолятта анықталды.

Рифампицин - төзімді *M. tuberculosis* изоляттарының арасында *rpoB* генінде мутациялардың 5 түрлі нұсқалары 4 кодонда Ser531, Asp516, His526 және Leu533 анықталды (1-кесте).

Көптеген нуклеотидтік алмасулар *rpoB* генінің 531 кодонында (Ser→Leu аминқылдық алмасуы) орналасқан және 79,2% құрайды. Рифампицин-төзімді изоляттардың арасындағы қалған жағдайда мутациялар 10% төмен кездесті: 526 кодон – 8,3% (екі түрлі нуклеотидтер алмасу нұсқасында - His→Leu, His→Tyr) 533 кодонда - 4,17% және 516 кодонда - 2,08%. 3 жағдайда (6,25%) *rpoB* генінде мутациялар анықталмады. Бұл изоляттарда мутациялар рифампицинге төзімділікті анықтайтын басқа гендерде болуы мүмкін деп түсіндіруге болады.

Рифампицин-сезімтал 48 *M. tuberculosis* клиникалық изоляттарын зерттеу барысында *rpoB* генінде мутациялар анықталмады.

1-кесте.

Рифампицин-төзімді *M. tuberculosis* изоляттарының арасында рифампицин препаратына төзімділікті анықтайтын *rpoB* геніндегі мутациялар.

Кодон	Нуклеотидті алмасу	Аминқышқылдық алмасу	Мутациялар анықталған изоляттар саны (%)
531	TCG→TTG	Ser→Leu	38 (79,2)
			Барлығы: 38 (79,2)
526	CAC→CTC	His→Leu	3 (6,25)
	CAC→TAC	His→Tyr	1 (2,08)
			Барлығы: 4 (8,3)
533	CTG→CCG	Leu→Pro	2 (4,17)
			Барлығы: 2 (4,17)
516	GAC→GTC	Asp→Val	1 (2,08)
			Барлығы: 1 (2,08)
Мутациялар анықталмады	-	-	3 (6,25)

Қорытынды

Зерттеу жұмысының нәтижесінде, Алматы, Қостанай және Қызылорда облыстарындағы жаңа жағдайлар арасынан бөлініп алынған *M. tuberculosis* популяциясына туберкулезге қарсы қолданылатын бірінші қатардағы негізгі препараттардың бірі – рифампицинге төзімділікке жауап беретін *rpoB* генінің Ser531 кодондағы мутациялардың жоғары жиілікте (79,2%) кездесуі тән.

Әдебиеттер тізімі:

1. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009, 2009, p.303.
2. Shean K.P., Willcox P.A., Siwendu S.N., Laserson K.F., Gross L., Kammerer S., Wells C.D., Holtz T.H. Treatment outcome and follow-up of multidrug-resistant tuberculosis patients, West Coast/Winelands, South Africa, 1992–2002. INT J TUBERC LUNG DIS, 2008, 12(10):1182–1189.
3. Anti-tuberculosis drug resistance in the world Fourth Global Report: The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007. World Health Organization 2008.
4. Mohamed Abdel Aziz, Abigail Wright, Adalbert Laszlo, Aimé De Muynck, Françoise Portaels, Armand Van

Deun, Charles Wells, Paul Nunn, Leopold Blanc, Mario Raviglione Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis Lancet, 2006, 368: 2142–54.

5. Статистический сборник по туберкулезу по Республике Казахстан: Национальный центр проблем туберкулеза МЗ РК, - 2009, - 68 с.

6. Jindani A., Aber V.R., Edwards E.A., Mitchison D.A. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis., 1980, 121: 939–949.

7. Dickinson J.M., Mitchison D.A. Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in the chemotherapy of tuberculosis, Am. Rev. Respir. Dis., 1981, 123:367–371.

8. Gale E.F., Cundliffe E., Reynolds P.E., Richmond M.H., and Waring M.J. 1981. The molecular basis of antibiotic action. John Wiley & Sons, Inc., New York.

9. Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Matter L., Schopfer K., Bodmer T., Lowrie D., Colston M.J. and Cole S. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*, Lancet, 1993, 341 (8846): 647-651.

Резюме

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В RPOB ГЕНЕ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К РИФАМПИЦИНУ СРЕДИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ M. TUBERCULOSIS ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ОБЛАСТЕЙ КАЗАХСТАНА

А.Ж. Ахметова¹, С.Е. Рахимова¹, В.Л. Бисмильда², М.А. Даришева³, А.Р. Акилжанова¹

¹Центр Наук о жизни, Назарбаев Университет, Астана

²Национальный Центр Проблем Туберкулеза, Алматы

³Центр Изучения Глобального Здоровья Центральной Азии, Алматы

В данной работе проведена оценка спектра и характера распространенности мутаций в гене *rpoB*, обуславливающих устойчивость к одному из основных противотуберкулезных препаратов - рифампицину в штаммах, выделенных из трех областей (Алматинская, Костанайская и Кызылординская) Казахстана. Для популяции *M. tuberculosis*, циркулирующей в данных областях Казахстана, характерна высокая частота встречаемости мутаций в Ser531 кодоне гена *rpoB* (79,2 %), обуславливающих устойчивость к рифампицину.

Ключевые слова: ген *rpoB*, рифампицин-устойчивость, *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract

DETECTION OF MUTATIONS IN RPOB GENE RESPONSIBLE FOR RIFAMPICIN-RESISTANCE AMONG CLINICAL ISOLATES OF M. TUBERCULOSIS FROM DIFFERENT REGIONS OF KAZAKHSTAN

A.Zh. Akhmetova¹, S.E. Rakhimova¹, V.L. Bismilda², M.A. Darisheva³, A.R. Akilzhanova¹

¹Center for Life Sciences, Nazarbayev University, Astana

²National Center for Tuberculosis Problems, Almaty

³Global Health Research Center of Central Asia, Almaty

Spectrum of mutations in *rpoB* gene that cause resistance to one of the main antituberculosis drugs – rifampicin in clinical isolates of *M. tuberculosis* distributed in 3 regions (Almaty, Kostanay, Kyzylorda) of Kazakhstan was estimated in this study. High frequency of mutation at codon Ser531 of *rpoB* gene (79,2%) responsible for drug resistance to rifampicin was determined among *M. tuberculosis* population circulating in the mentioned regions.

Key words: *rpoB* gene, rifampicin-resistance, *Mycobacterium tuberculosis*.