

Генотипическая характеристика *M. tuberculosis* — возбудителей остропрогрессирующего деструктивного туберкулеза легких

Воронкова О.В., Уразова О.И., Хасанова Р.Р., Новицкий В.В., Чурина Е.Г., Наследникова И.О., Филинчук О.В., Серебрякова В.А., Колобовникова Ю.В.

The genotypical characteristic of *M. tuberculosis* — aetiological agents of acute progressive destructive pulmonary tuberculosis

Voronkova O.V., Urazova O.I., Khasanova R.R., Novitsky V.V., Churina Ye.G., Naslednikova I.O., Filinyuk O.V., Serebryakova V.A., Kolobovnikova Yu.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Воронкова О.В., Уразова О.И., Хасанова Р.Р. и др.

В статье представлены результаты генетического типирования 77 клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из мокроты больных распространенным деструктивным инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких. Установлено, что среди генетически неоднородных штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории г. Томска и Томской области, вызывающих остропрогрессирующий распространенный деструктивный туберкулез легких, 19% проявляют множественную лекарственную устойчивость. Штаммы семейства Beijing (пекинская группа) составляют 27% от общей популяции возбудителя, имеют высокий показатель кластеризации (74%), уровень их множественной лекарственной устойчивости в 3 раза превышает таковой у «непекинских» штаммов, для которых доля кластеризующихся штаммов составляет 11%.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, генотипирование, генотипический профиль, лекарственная устойчивость.

The results of 77 *M. tuberculosis* clinical isolates genetic typing, allocated from patients with extensive destructive infiltrative and disseminated pulmonary tuberculosis are presented in the article. It is established that among genetically non-uniform *Mycobacterium tuberculosis* strains, circulating in Tomsk and the Tomsk Region, and causing acute progressive destructive pulmonary tuberculosis, 19% show multi drug resistance. Beijing family strains make 27% from the general population, have a high clusterization index (74%), level of their multi drug resistance in 3 times exceeds that at «not Beijing» strains for which the share of clustering strains makes 11%.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, genetic typing, genetic profile, drug resistance.

УДК 616.24-002.53-036.111:579.873.21:578.274.3

Введение

В России ухудшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу с увеличением доли тяжелых распространенных форм патологии в структуре общей заболеваемости туберкулезной инфекцией началось с середины 80-х гг. прошлого века и продолжается по сей день [1, 8, 14]. На протяжении последних лет в микобактериологии широко используются молекулярные технологии генотипирования и дифференци-

рования *Mycobacterium tuberculosis* на уровне хромосомной ДНК [2, 4, 12, 16]. Создание библиотек генов микобактерий, а также накопление информации по нуклеиновым кислотам, видовой специфичности белков возбудителей туберкулеза, открытие вставочных элементов в геномном материале *M. tuberculosis* представляют возможность для внутривидовой дифференциации штаммов микобактерий и изучения их полиморфизма [12, 16].

Выявление источников инфекции служит основой для ограничения распространения микобактерий туберкулеза. Изучение эпидемиологии туберкулеза до последнего времени было затруднено и весьма несовершенно из-за отсутствия достоверных методов маркирования штаммов микобактерий в целях изучения гетерогенности популяции, определения ареалов распространения возбудителя, расшифровки путей передачи, миграции и механизмов формирования циркулирующих в определенном регионе полирезистентных штаммов.

Цель исследования — оценить генетическую гетерогенность клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, вызывающих распространенный деструктивный туберкулез легких.

Материал и методы

Проведено исследование генетического полиморфизма 77 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных из мокроты соответствующего количества пациентов с распространенным деструктивным инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких до назначения им специфической противотуберкулезной химиотерапии. Для видовой идентификации

M. tuberculosis и определения их чувствительности к противотуберкулезным химиопрепаратам (методом абсолютных концентраций) производился посев мокроты на плотные питательные среды Левенштейна—Йенсена и Финн-2. Типирование *M. tuberculosis* проводили с помощью MIRU-VNTR-анализа [15]. Генотипирование осуществляли, используя 12 пар праймеров для амплификации локусов микобактериального генома: MIRU 2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40. Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 10 мкл, содержащем 5—50 нг ДНК, буфер следующего состава: трис-HCl концентрацией 60 ммоль, pH 8,5, KCl концентрацией 25 ммоль, MgCl₂ концентрацией 1,5 ммоль, 0,1%-й тритон X-100, меркаптоэтанол концентрацией 10 ммоль; дНТФ концентрацией 0,2 ммоль, растворы праймеров концентрацией 0,2 мкмоль и 0,5 ед. акт. Таq-полимеразы, на амплификаторе БИС-110 (без масла) с начальной денатурацией при температуре 94 °С в течение 4 мин, далее — 34 цикла с денатурацией при температуре 94 °С 30 с, отжигом праймеров при температуре 55 °С 20 с и элонгацией при температуре 72 °С 1,5 мин и заключительной элонгацией при

температуре 72 °С в течение 5 мин. Аликвоты амплификатов фракционировали в 2%-м агарозном геле в присутствии бромистого этидия в трис-ацетатном буферном растворе в течение 45 мин при 100 В.

Обработку полученной электрофореграммы и оцифровку длин полос производили с помощью программы GelAnalysis пакета GelExplorer. Длины полос ампликонов подтверждали их положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам (100 п.о. — маркер). Для визуализации результатов генотипирования проводили построение дендрограммы кластеризации *M. tuberculosis*, которую рассчитывали с применением категориального коэффициента подобия методом UPGMA-невзвешенного попарного арифметического среднего по программе BioNumerics (Applied Math, США).

Результаты и обсуждение

Для генетического типирования были отобраны клинические изоляты *M. tuberculosis*, выделенные от 77 больных (26 (34%) женщин, 51 (66%) мужчина) распространенным деструктивным туберкулезом легких, проживающих на территории Томской области, включая городские и сельские территории. В результате исследования спектра лекарственной устойчивости микобактерий было установлено, что доля лекарственно-чувствительных изолятов *M. tuberculosis* составила 62%, лекарственно-устойчивых — 38%. Спектр лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* был представлен девятью вариантами. На долю изолятов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) (таблица) приходилось 19%.

Спектр лекарственной устойчивости 77 клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом легких

Спектр устойчивости		Количество изолятов	Номера изолятов в дендрограмме кластеризации (см. рисунок)
Монорезистентность	H	3	2966, 5712, 5524
	S	3	2884, 9619, 1565
	R	1	2685
Полирезистентность	HS	4	3764, 5841, 15799, 1931
	RS	2	2245, 10477
	RSK	1	5079
Множественная лекарственная	HRS	10	2431, 803, 3546, 4862, 4912, 5769, 5771, 1570, 4985, 5529
	HRSK	2	8915, 4818

Воронкова О.В., Уразова О.И., Хасанова Р.Р. и др.

устойчи- вость	HRSE	2	5295, 405
	HRSKE	1	1033

Генотипическая характеристика M. tuberculosis...

Примечание. Н — изониазид, R — рифампицин, S — стрептомицин, K — канамицин, E — этамбутол.

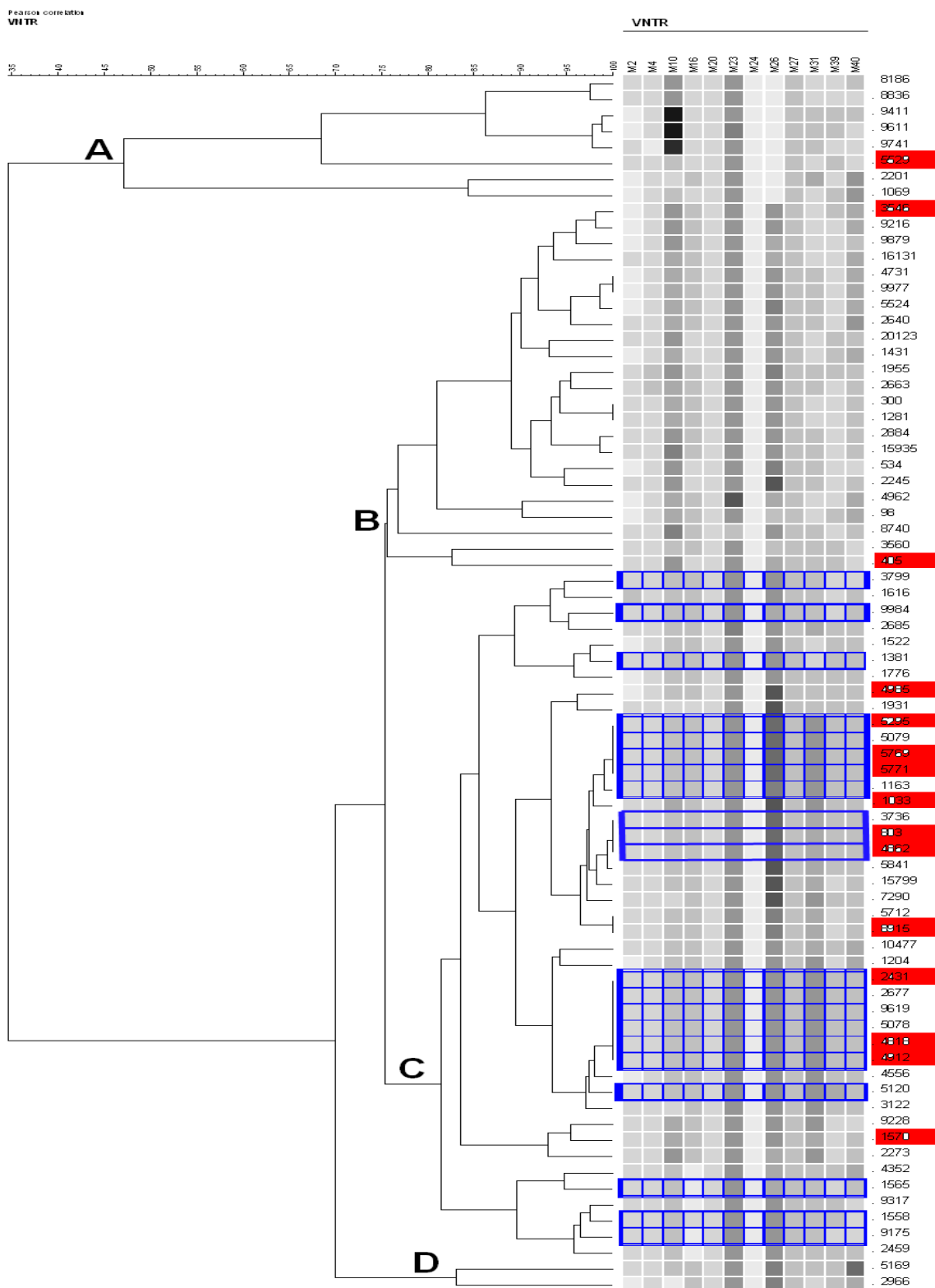


Рис. 1. Дендрограмма кластеризации *Mycobacterium tuberculosis* (по результатам MIRU-VNTR-типирования 77 клинических изолятов)

Все штаммы *M. tuberculosis* были проанализированы методом MIRU-VNTR с использованием основных генных локусов, содержащих различное количество tandemных повторов VNTR в качестве маркера микобактериального генома. Генотипы клинических изолятов

M. tuberculosis характеризовали по 12 MIRU локусам (M2, M4, M10, M16, M20, M23, M24, M26, M27, M31, M39, M40). В результате генетического типирования была построена дендрограмма кластеризации, отражающая степень генетического родства штаммов (слева) и схематическое цветное компьютерное изображение VNTR-паттернов (справа) (рисунок). Необходимо отметить, что все методы молекулярного генотипирования основаны на изучении области прямых повторов, различных вставочных последовательностей, делеций, мини-сателлитов и точечных мутаций.

На основании генетических маркеров штаммы *M. tuberculosis* со сходными генетическими паттернами были классифицированы в различные генетические семейства, в частности Beijing, Haarlem, ASU, Family II, Latin American Mediterranean, the Central Asian clade, East African Indian clade [5, 13, 15, 18]. В основе MIRU-VNTR-типирования лежит амплификация локусов, содержащих рассеянные (по геному) повторяющиеся микобактериальные элементы. Исходя из того факта, что каждый из этих локусов в различающихся штаммах *M. tuberculosis* представлен различным числом копий этих повторов, родственные штаммы могут быть объединены в кластеры [17].

Анализ дендрограммы позволил выявить четыре крупные ветви (кластера), условно обозначенные буквами А, В, С, D (рисунок).

Ветвь А (10% изолятов) оказалась наиболее гетерогенной — в нее входили изоляты со средней степенью гомологии около 48%. В данной ветви не было кластеризующихся (сходных по генотипу) изолятов, т.е. все штаммы *M. tuberculosis*, входящие в кластер А, являлись уникальными.

Ветвь В объединяла в себя 23 штамма со средней степенью гомологии 75%. Несмотря на высокую степень гомологии, штаммы ветви В в большинстве случаев были уникальными. В ходе исследования зарегистрировано только два кластера, идентичных по VNTR-профилю штаммов *M. tuberculosis*.

Ветвь С оказалась наиболее многочисленной. В нее входили 43 (56%) клинических изолята, характеризующиеся высокой степенью гомологии генотипического профиля — 82%. Ветвь С содержала в своем составе крупные кластеры изолятов с одинаковыми генотипами. Наиболее крупный из них состоял из 6 изолятов *M. tuberculosis*, самый мелкий — из 3.

Самой малочисленной оказалась ветвь D, состоящая из 2 (3%) клинических изолятов с уникальным VNTR-профилем и средней степенью гомологии 83%.

В целом в ходе исследования было выявлено шесть кластеров (содержащих 19 изолятов), идентичных по генетическому профилю штаммов *M. tuberculosis*. Таким образом, показатель кластеризации для представленной дендрограммы составил 25%. Наиболее крупный кластер содержал 6 изолятов, а самый малочисленный был представлен 2 изолятами.

Известно, что идентичные паттерны, как правило, имеют штаммы, выделенные в очагах или от больных, заразившихся от одного источника. Вместе с тем при массовых вспышках туберкулеза паттерны штаммов могут иметь небольшие различия [5, 17]. Это наиболее значимо для лекарственно-устойчивых штаммов, так как известно, что в силу некоторых своих биологических особенностей (в частности, повышенной вирулентности) они имеют преимущества в распространении перед лекарственно-чувствительными штаммами.

Распространенность в анализируемой выборке штаммов *M. tuberculosis* генетического семейства Beijing

Согласно данным, приведенным в ряде публикаций, в некоторых регионах России (в Северо-Западном федеральном округе и Восточной Сибири) среди микобактерий, выделяемых больными туберкулезом, преобладают штаммы *M. tuberculosis* семейства Beijing [3, 6, 7, 9—11]. Они характеризуются способностью вызывать тяжелые, трудно поддающиеся лечению случаи туберкулеза легких с высоким уровнем смертности, в том числе и благодаря наличию возможности обойти иммунологическую защиту организма, сформированную вакциной БЦЖ. Характерна также повышенная изменчивость

M. tuberculosis Beijing-семейства и ассоциированность с мультирезистентностью, что приводит к более продолжительному периоду контагиозности заболевания и специфической терапии [3, 5]. Для оценки степени рас-

пространения штаммов генетического семейства Beijing в Томской области были сопоставлены MIRU-коды штаммов из анализируемой выборки с кодами штаммов, относящихся к пекинскому семейству.

Черным цветом на рисунке отмечены изоляты, MIRU-VNTR-профиль которых полностью совпадает с генотипом штаммов Beijing, ранее выявленных в г. Новосибирске и Новосибирской области. Исходя из расположения данных изолятов на древе, штаммы, принадлежащие к семейству Beijing, содержит ветвь С — 22 клинических изолята, что составляет 51% от общего числа клинических изолятов данной ветви. Таким образом, доля штаммов *M. tuberculosis* Beijing-семейства в представленной выборке составляла 29%. Вместе с тем пекинские штаммы образовывали достаточно неоднородную группу по способности формировать кластеры: в группу Beijing-семейства вошло 36% уникальных изолятов *M. tuberculosis* и 64% кластеризующихся штаммов (см. рисунок).

Ассоциация лекарственной устойчивости *M. tuberculosis* с генотипом

По свидетельству ряда авторов, как уже отмечалось выше, *M. tuberculosis* пекинского семейства чаще всего характеризуются множественной лекарственной устойчивостью [3, 5]. Однако проведенные исследования, а именно сопоставление данных определения спектра лекарственной устойчивости и генотипического профиля, выявили, что из 21 клинического изолята *M. tuberculosis* с VNTR-профилем, характерным для Beijing-семейства, только 12 оказались лекарственно-резистентными (таблица), а остальные 9 изолятов оставались чувствительными к противотуберкулезным препаратам первого ряда. При детальном анализе дендрограммы установлено, что лекарственно-устойчивые штаммы *M. tuberculosis* чаще встречались среди клинических изолятов, принадлежащих к семейству Beijing. Среди 77 изолятов (вся выборка) в клинических образцах, входящих в состав ветви С, достоверно чаще ($p < 0,005$ по критерию χ^2) встречались изоляты с МЛУ (8 изолятов из 43, входящих в ветвь С), чем в среднем по выборке.

Заключение

Среди генетически неоднородных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории г. Томска и Томской области и вызывающих остро-

прогрессирующий распространенный деструктивный туберкулез легких, 19% проявляют множественную лекарственную устойчивость. Штаммы семейства Beijing составляют 27% от общей популяции возбудителя, имеют высокий показатель кластеризации (74%), уровень их множественной лекарственной устойчивости в 3 раза превышает таковой у «непекинских» штаммов, для которых доля кластеризующихся штаммов составляет 11%.

Исследования выполнены в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (ГК № П285 от 23.06.2009 г.).

Литература

1. Аксёнова В.А., Леви Д.Т., Фомина Е.В. и др. Вакцинопрофилактика туберкулеза: значение и проблемы // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2009. № 1. С. 10—16.
2. Александров А.А., Владимирский М.А., Шитина Л.К. и др. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики и оценки эффективности химиотерапии туберкулеза легких // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006. № 1. С. 52—55.
3. Балабанова Я.М., Николаевский В.В., Ради М. и др. Преобладание штаммов *Mycobacterium tuberculosis* семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2006. № 2. С. 31—36.
4. Баранов А.А., Марьяндышев А.О. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2008. № 4. С. 3—7.
5. Гвоздецкий Н.А., Ажикина Т.Л., Свердлов Е.Д. Делеционно-инсерционные различия геномов высоковирулентного штамма HN878 *Mycobacterium tuberculosis* и менее вирулентного штамма CDC1551 // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 1. С. 10—15.
6. Марьяндышев А.О., Тунгусова О.С., Баранов А.А. Молекулярная эпидемиология туберкулеза в Баренц-регионе Российской Федерации // Мед. академ. журн. 2007. Т. 7, № 4. С. 59—69.
7. Медведева Т.В., Огарков О.Б., Купелов О.М. и др. MIRU-VNTR-генотипирование штаммов *Mycobacterium tuberculosis* в Восточной Сибири: семейство Beijing против Kilimanjaro // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2004. № 4. С. 33—37.
8. Мишин В.Ю., Борисов С.Е., Аксёнова В.А. и др. Диагностика и химиотерапия туберкулеза органов дыхания // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2003. № 3. С. 47—64.
9. Нарвская О. В., Мокроусов И. В., Оттен Т. Ф. и др. Генетическое маркирование полирезистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных на северо-западе России // Проблемы туберкулеза. 1999. № 3. С. 39—41.

10. Норкина О.В., Кинит В.Н., Мокроусов И.В. и др. Генетическое разнообразие *Mycobacterium tuberculosis* и оценка факторов риска распространения заболевания туберкулезом в сибирском регионе России методами молекулярной эпидемиологии // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2003. № 3. С. 9—17.
11. Огарков О.Б., Медведев Т.В., Zozio T. и др. Молекулярное типирование штаммов микобактерий туберкулеза в Иркутской области (Восточная Сибирь) в 2000—2005 гг. // Молекул. медицина. 2007. № 2. С. 33—38.
12. Скотникова О.И. Молекулярно-биологические методы во фтизиатрии // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2005. № 8. С. 5—10.
13. Сурикова О.В., Войтих Д.В., Курунов Ю.Н. Опыт использования VNTR-типирования: *Mycobacterium tuberculosis* для решения клинических задач: контроля за качеством лечения и работой лабораторной службы // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. 2005. № 2. С. 21—24.
14. Тунгусова О.С., Марьяндышев А.О. Молекулярные механизмы формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (обзор литературы) // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2001. № 6. С. 48—49.
15. Cowan L.S., Mosher L., Diem L. et al. Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units // J. Clin. Microbiol. 2002. V. 40, №5. P. 1592—1602.
16. Embden J. D.A., Kremer K., Van Soolingen D. et al. Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility // J. Clin. Microbiol. 1993. V. 37, № 8. P. 2607—2618.
17. Filliol I., Driscoll J.R., Van S.D. et al. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes // Emerg. Infect. Dis. 2002. V. 8, № 11. P. 1347—1349.
18. Filliol I., Driscoll J.R., Van S.D. et al. Snapshot of moving and expanding clones of *Mycobacterium tuberculosis* and their global distribution assessed by spoligotyping in an international study // J. Clin. Microbiol. 2003. V. 41, № 5. P. 1963—1970.

Поступила в редакцию 21.12.2010 г.

Утверждена к печати 14.01.2011 г.

Сведения об авторах

О.В. Воронкова — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

О.И. Уразова — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Р.Р. Хасанова — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

В.В. Новицкий — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Е.Г. Чурина — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

И.О. Наследникова — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

О.В. Филинюк — канд. мед. наук, доцент кафедры фтизиатрии и пульмонологии СибГМУ (г. Томск).

В.А. Серебрякова — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Ю.В. Колобовникова — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Воронкова Ольга Владимировна, тел.: (382-2) 55-36-13, 8-905-990-4746; e-mail: Voronkova-ov@sibmail.com