



А.А. Ляшенко

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Методы генотипирования во фтизиатрии

Для решения эпидемиологических задач во фтизиатрии необходимы методики, позволяющие различать *M. tuberculosis* между собой. Одним из первых способов было деление микобактерий на основе их биохимических свойств, но из-за низкой эффективности и неоднозначности результатов методика не нашла применения. На более позднем этапе появились методы, основанные на различиях в геноме микобактерий с большей дискриминирующей способностью, а данные, полученные различными учеными, сопоставимы.

В статье описаны основные современные методы, применяющиеся для генотипирования *M. tuberculosis*, указаны их преимущества и недостатки.

Ключевые слова

M. tuberculosis, генотипирование, фтизиатрия, RFLP, VNTR, сполиготипирование.

Среди методов лабораторной диагностики, входящих в обязательный диагностический минимум для больного туберкулезом в Украине, является микроскопия и посев микобактерий туберкулеза (*M. tuberculosis*, МБТ) на твердые и жидкие питательные среды, которые позволяют отдифференцировать *M. tuberculosis* от нетуберкулезных микобактерий, однако не позволяют разграничивать *M. tuberculosis* между собой [6]. Одним из самых первых вариантов идентификации МБТ появился метод типирования фага [9]. Данная методика позволила дифференцировать микобактерии туберкулезного комплекса, но наряду с трудоемкостью метода большим и существенным его недостатком является то, что результаты типирования фага во многом зависят от биохимических свойств возбудителя и от устойчивости к противотуберкулезным препаратам [13]. Также были предложены методики типирования на основе биохимических свойств микобактерий, однако они показали себя неэффективными из-за очень низкой дискриминирующей способности (т. е. способности разделять микобактерию) [6].

Последние несколько десятилетий ознаменованы бурным прогрессом в изучении микобактерии и возможностью более тонкой ее

диагностики. Так, в конце прошлого столетия появился ряд дополнительных методов типирования *M. tuberculosis*, а в 1998 г. был полностью расшифрован H37Rv, затем *M. tuberculosis* CDC1551 и *M. bovis* AF2122/97, что позволило еще более расширить возможности типирования МБТ, уже основанные на знании генома [12, 33]. Идеальным вариантом генотипирования *M. tuberculosis* является полное секвенирование структуры ДНК возбудителя, т. е. полная расшифровка гена, однако на данном этапе развития генетических методов это не реализуемо из-за очень высокой дороговизны и трудоемкости процесса. Именно поэтому для генотипирования *M. tuberculosis* чаще используют короткие участки ДНК, способные решить поставленные задачи [2, 7]. В зависимости от метода генотипирования часто употребляют и различную терминологию — генотип, генетический профиль, паттерн, сполиготип, профиль МБТ и др. Так, например, если использовали методику полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP или ПДРФ), то употребляют термин RFLP-профиль или паттерн, при использовании сполиготипирования — сполиготип, в случае использования методики вариабельности количества tandemных повторов (VNTR) говорят о VNTR-профиле и т. д. [4, 34]. Сам процесс типирования микобактерий генотипирования имеет

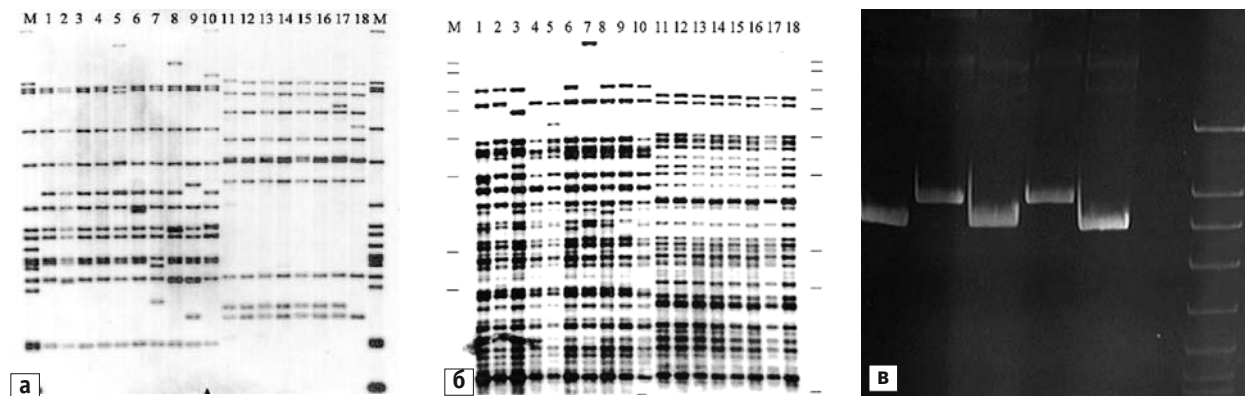


Рис. 1. Примеры результатов исследований *M. tuberculosis* с помощью различных методик:

а — RFLP-анализ с элементом IS6110. Образец М — паттерн-стандартного H37Rv-штамма; 1—18 — клинические образцы;
 б — RFLP-PGRS. Образец М — паттерн-стандартного H37Rv-штамма. М — профиль стандартного H37Rv-штамма; 1—18 — клинические образцы;
 в — VNTR-типирование клинических изолятов по ETRE локусу

такие синонимы, как фингерпринтинг, геномная дактилоскопия, генотипирование и др. [3].

В 1990-х годах появляется первая методика с мощной дискриминирующей способностью, основанная на различиях в геноме микобактерий — ПДРФ-анализ с меченым IS6110 зондом [14, 29]. Обнаружено, что в геноме *M. tuberculosis* в среднем насчитывают от 8 до 15 участков, содержащих IS6110-элемент в различных позициях ДНК [10]. Полученные фрагменты в результате ПДРФ-анализа различаются по количеству и молекулярной массе, на основании чего и разделяют микобактерии между собой (рис. 1а). Кроме элемента IS6110, можно использовать и другие зонды, однако на практике это применяют редко, т. к. результаты не стандартизованы, достаточно тяжело проводить сравнительный анализ с результатами, полученными другими авторами. ПДРФ с IS6110-зондом, напротив, стандартизирован, результаты, полученные различными авторами, могут быть сравнимы, а методика признана золотым стандартом в генотипировании *M. tuberculosis*, метод также является референтным и в отношении дискриминирующей способности. Несмотря на то что RFLP с IS6110-зондом достаточно часто применяют для типирования *M. tuberculosis*, методика имеет ряд существенных недостатков: необходим меченый IS6110-зонд, необходимо дополнительное специализированное оборудование, дороговизна, метод трудоемкий (3–5 сут для постановки), и для проведения исследования необходимо большое количество культуры. Кроме технических особенностей, в ряде регионов обнаружены особенности ДНК микобактерий, у которых низкая частота встречаемости элемента IS6110, в результате чего дискриминирующая эффективность методики резко снижается [8].

Низкое содержание элемента IS6110 характерно и для некоторых микобактерий нетуберкулезного комплекса [8, 23], а для корректной оценки результатов RFLP с элементом IS6110 необходима единая база, чтобы исключить появление одинаковых штаммов, отнесенных к разным RFLP-профилям. Несмотря на ряд некоторых существенных недостатков и сложностей методики RFLP с элементом IS6110, он остается золотым стандартом среди методов генотипирования МБТ. Возможно, это связано с тем, что данная методика была первой с мощной дискриминирующей способностью.

Наряду с элементом IS6110 в RFLP иногда используют такие элементы, как IS1081, IS987, IS3411, IS900, IS6100 и др. Однако в исследованиях эти элементы широко не применяют либо из-за низкой дискриминирующей способности, либо из-за трудностей в трактовке результатов [32].

Важным этапом развития технологий генотипирования *M. tuberculosis* стала полная расшифровка ее генома в 1998 г., в том числе лабораторного штамма H37Rv, что позволило выработать новые подходы генодиагностики во фтизиатрии [12]. В основе большинства методов лежит обыкновенная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Как правило, такие методы недорогие в сравнении с RFLP, менее трудоемкие, результаты легче воспроизводимы, для исследования не нужно большое количество биологического материала, а в некоторых случаях имеется возможность исследовать непосредственно клинические образцы.

Другой метод, также часто применяющийся в молекулярно-генетических исследованиях во фтизиатрии, — спוליготипирование. В основе лежит ПЦР, амплифицируется высокополиморфный участок ДНК *M. tuberculosis*, условно

Сполиготип	Условное название
	Редкий
	EAI5
	Beijing
	LAM9
	T1
	H3

Рис. 2. Примеры результатов сполиготипирования

названный DR-область, в которой находится до 50 повторов (DR — direct repeat, пер. с англ. — прямой повтор), имеющих длину 36 пар нуклеотид (п. н.), разделенных уникальными областями, именуемыми спейсерами, которые имеют различное количество и длину, что и позволяет генотипировать микобактерии [20, 22]. Метод разработан голландскими учеными и широко применяется в молекулярно-генетических исследованиях во фтизиатрии, а в США сполиготипирование проводят практически всем больным с впервые выявленным туберкулезом легких [22]. Результат такого исследования можно представить схематически с отсутствием или наличием сигнала в определенном участке (рис. 2). Результат можно записать и в виде двоичного числа, где 0 обозначает отсутствие сигнала, 1 — его наличие. Генетический профиль микобактерии или паттерн гибридизации, полученный по этому методу, называется сполиготипом. Метод обладает хорошей воспроизводимостью, результаты различных исследований достаточно легко сопоставимы, а дискриминирующая способность приближается к золотому стандарту RFLP с элементом IS6110 [15, 19, 30]. Недостатков у сполиготипирования меньше, чем у IS6110-RFLP, но все же для ее постановки необходимо дополнительно иметь специальную мембрану с олигонуклеотидными зондами, использовать которую можно до 10 раз [21]. Дискриминирующая способность метода не может быть увеличена в перспективе.

Следующим методом, все чаще используемым в молекулярно-эпидемиологических исследованиях, является методика вариабельности числа тандемных повторов (VNTR — variable number of tandem repeat). Она впервые была описана Frothingham и Meeker—O'Connell в 1998 г. в медицинском центре Дарема (Durham), основана также на полимеразной цепной реакции [18]. В основе метода лежит наличие у микобактерий участков (локусов) с различным содержанием повторяющихся последовательностей. Повторяющиеся последовательности, или тандемные

повторы, имеют известную длину, поэтому количество повторов легко рассчитывается и выражается в виде числа, обозначающего количество повторов в определенном локусе. Frothingham и Meeker—O'Connell описали 5 локусов — ETR A, B, C, D, E (ETR — exact tandem repeats, пер. с англ. — точные тандемные повторы), которые стали базовыми при использовании VNTR [16]. В последующем в геноме микобактерий было обнаружено около 40 подобных локусов, которые назвали микобактериальными вставными повторами, или MIRU (mycobacterial interspersed repetitive units), однако чаще всего применяют лишь 12 из них как наиболее эффективные [31]. Эти 12 локусов считают основными для MIRU-VNTR, а дискриминирующая способность при таком подходе не меньше, чем у IS6110-RFLP для изолятов *M. tuberculosis*, содержащих большое количество элемента IS6110 в своем геноме (высококопийные изоляты), и превосходит эту методику для низкокопийных образцов [25]. При использовании дополнительных локусов дискриминирующая способность MIRU-VNTR превосходит сполиготипирование и IS6110-RFLP [32]. Благодаря простоте в использовании, относительной дешевизне и воспроизводимости, методику можно применять для крупномасштабных эпидемиологических исследований [31]. После амплификации изучаемого фрагмента ДНК микобактерии проводят электрофорез и получают определенную массу продукта (рис. 1в). По размеру полученного фрагмента с использованием формулы, индивидуальной для каждого локуса (ETR или MIRU), рассчитывают число повторов. В формуле учитывают размер фланкирующей области, индивидуальный для каждого локуса, который вычитается из размера ПЦР-продукта. После определения размера ПЦР-продукта на электрофорезе число повторов высчитывают по общей формуле: $A = (n - B) : C$, где n — размер ПЦР-продукта, A — число повторов, B — размер фланкирующей области данного повтора, C — размер одного повтора. В результате получается число, отображающее количество повторов в каждом локусе. Так, для ETR A, B, C, D, E это пятизначное число, например 42432, обозначает, что по ETR A локусу у исследуемого изолята имеется 4 повтора, по ETR B — 2 и т. д. Полученный генетический профиль микобактерии с помощью этой методики называют VNTR-профилем. В результате многочисленных исследований с параллельным использованием VNTR по 5 локусам ETR A, B, C, D, E с IS6110-RFLP или сполиготипированием удалось установить, что VNTR-профили 42432, 42435, 42436, 42433, 42452, 42437

относятся к семейству *Beijing*, профили 32333, 32343, 31533, 31433, 33432, 31432, 22332, 31333 — к семейству *Haarlem*, 22232 и 42532 — к семейству LA-M. Для *M. africanum* характерны такие профили, как 41634, 41424, 31534, 42533, 32534, 42335, 42535 и 42434; *M. bovis* — 55533, 55523, 51543, 75543, 35543, 55623, 75543 [11, 28].

Кроме описанных выше методик, существует достаточно много других, не получивших широкого распространения в силу ряда причин, наиболее частые из них — малая дискриминирующая способность метода или сложности в сравнении результатов, полученных различными учеными. К таким способам генотипирования можно отнести PGRS (polymorphic GC-rich repetitive sequence) — метод, основанный на полиморфизме GC-элемента в ДНК микобактерии [26]. Графически результаты исследования напоминают IS6110-RFLP, но количество полос больше и на изображении характерны «шумы», что усложняет трактовку результатов (рис. 16). Также существуют RFLP с гибридизацией, 16S-и 23S rRNA и другие методы, которые практически не применяют, и представляют они интерес лишь с научной точки зрения [1, 17].

Кроме типирования внутри вида *M. tuberculosis*, все вышеперечисленные методы позволяют разделять *M. tuberculosis complex* между собой [5, 20]. Когда два или более штамма имеют идентичный профиль согласно какой-либо методике, их относят к одному кластеру и говорят

об их идентичности. То есть, если штаммы выделены от разных людей, но принадлежат к одному кластеру, с большой долей вероятности можно предположить эпидемическую связь между ними.

В молекулярно-эпидемиологических исследованиях часто используют термин «дискриминирующая способность метода». Он произошел от англ. слова discriminate, что в переводе означает «различать, распознавать». Дискриминирующая способность, или мощность метода, выражается индексом Hunter—Gaston. Так, например, для *M. bovis* дискриминирующий индекс Hunter—Gaston для RFLP-анализа с элементом IS6110 равен 0,927, для MIRU-VNTR — 0,918, для сполитипирования — 0,7 [27].

Выводы

1. Несмотря на ряд существенных недостатков, золотым стандартом генотипирования *M. tuberculosis* остается RFLP с зондом IS6110. Возможно, это связано с тем, что метод был первым с высокой дискриминирующей способностью.

2. Полученные различными методами результаты генотипирования микобактерии туберкулеза могут быть частично сравнимы.

3. Методика VNTR является перспективной, имеет потенциал, в то время как дискриминирующая способность наиболее часто используемых методов RFLP с зондом IS6110 и сполитипирования не может быть увеличена.

Список литературы

1. Майорова А.А., Степаншина В.Н., Шемякин И.Г., Коробова О.В. Исследование коллекции микобактерий нетуберкулезного комплекса рестрикционным анализом амплифицированного фрагмента спейсерной последовательности 16s-23s рибосомной ДНК // Пробл. туб. и бол. легких.— 2004.— № 11.— С. 34—37.
2. Нарвская О.В., Мокроусов И.В., Лимещенко Е.В. и др. Молекулярная эпидемиология туберкулеза // Большой целевой журнал о туберкулезе.— 2000.— № 7.— С. 4—6.
3. Оттен Т.Ф., Нарвская О.В., Олейник В.В. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных полиорганным и генерализованным туберкулезом // Пробл. туб. и бол. легких.— 2003.— № 10.— С. 44—47.
4. Сурикова О.В., Войтих Д.В., Курунов Ю.Н., Филипенко М.Л. Опыт использования VNTR-типирования *Mycobacterium tuberculosis* для решения клинических задач: контроля за качеством лечения и работой лабораторной службы // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.— 2005.— № 2.— С. 21—23.
5. Черноусова Л.Н. Современные тенденции и возможности микробиологической диагностики туберкулеза // РМЖ.— 2002.— № 16.— С. 21—25.
6. Шагинян И.А., Нестеренко Л.Н., Гришина Т.Д. и др. Исследование геномного полиморфизма штаммов *M. tuberculosis* // Журн. микробиол.— 1996.— № 3.— С. 65—68.
7. Шемякин И.Г., Степаншина В.Н., Манзенюк О.Ю. и др. Использование молекулярно-биологических методов для индивидуальной характеристики штаммов *M. tuberculosis* // Журн. микробиол.— 2000.— № 2.— С. 6—11.
8. Barlow R.E., Gascoyne-binzi D.M., Gillespie S.H. et al. Comparison of variable number tandem repeat and IS6110-restriction fragment length polymorphism analyses for discrimination of high and low-copy-number is6110 mycobacterium tuberculosis isolates // Journal of clinical microbiology.— 2001.— Vol. 39, N 7.— P. 2453—2457.
9. Bates J.H., Fitzhugh J.K. Subdivision of the species *M. tuberculosis* by mycobacteriophage typing // Am. Rev. Resp. Dis.— 1967.— Vol. 96.— P. 7—10.
10. Behr M.A., Small P.M. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: how can it help the clinician? // Clin. Infect. Dis.— 1997.— Vol. 25.— P. 806—810.
11. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains // Trends Microbiology.— 2002. Vol. 10, N 1.— P. 45—52.
12. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // Nature.— 1998.— Vol. 393, N 6685.— P. 537—544.
13. Collins C.H., Yates M.D., Grange J.M. Subdivision of *M. tuberculosis* in five variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature // Journal of Hygiene (London).— 1982.— Vol. 89.— P. 235—242.

14. Collins D.M., Lisle G.W. DNA restriction endonuclease analysis of *M. Tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG // *Journal of General Microbiology*.— 1984.— Vol. 130.— P. 1019–1021.
15. Diaz R., Kremer K., de Has P.E. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Cuba outside of Havana, July 1994–June 1995: utility of spoligotyping versus IS6110 restriction fragment length polymorphism // *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*— 1998.— Vol. 2.— P. 743–750.
16. Dymova M.A., Liashenko O.O., Poteiko P.I. et al. Genetic Diversity of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains Circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*.— 2011.— Vol. 26, N 1.— P. 21–26.
17. Farazi A., Jabbariasl M., Tadayon K. et al. Comparison of the genetic convergence between mycobacterium strains by three RFLP-based methods in central province of Iran // *Iran. J. Basic. Med. Sci.*— 2014.— Vol. 17, N 6.— P. 401–405.
18. Frothingham R., Meeker-O'Connell W.A. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats // *Microbiology*.— 1998.— Vol. 144, N 5.— P. 1189–1196.
19. Goyal M., Saunders N.A., van Embden J.D.A. et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism // *JCM*.— 1997.— Vol. 35.— P. 647–651.
20. Hermans P.W.M., van Soolingen D., Bik E.M. et al. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains // *Infect. Immun.*— 1991.— Vol. 59.— P. 2695–2705.
21. Jeffrey R. Driscoll. Spoligotyping for Molecular Epidemiology of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex // *Molecular Epidemiology of Microorganisms*.— 2009.— Vol. 551.— P. 117–128.
22. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *JCM*.— 1997.— Vol. 35.— P. 907–914.
23. Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R. 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 // *JCM*.—1999.— Vol. 37, N 8.— P. 2607–2618.
24. Le Fleche P., Fabre M., Denoed F. et al. High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing // *BMC Microbiology*.— 2002.— Vol. 2, N 1.— P. 37.
25. Liu Y., Tian M., Wang X. et al. Genotypic diversity analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains collected from Beijing in 2009, using spoligotyping and VNTR typing // *Plos one*.— 2014.— Vol. 9, N 9.— P. 1–12.
26. Madalene Richardson, Gian D. van der Spuy, Samantha L. Sampson et al. Stability of Polymorphic GC-Rich Repeat Sequence-Containing Regions of *Mycobacterium tuberculosis* // *JCM*.— 2004.— Vol. 42, N 3.— P. 1302–1304.
27. McLernon J., Costello E., Flynn O. et al. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing // *JCM*.— 2010.— Vol. 48, N 12.— P. 4541–4545.
28. Norkina O.V., Kinsht V.N., Mokrousov I.V. et al. The genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and an assessment of risk factors of tuberculosis spread in Russia's Siberian region by molecular epidemiological methods // *Molecular Genetic, Microbiology and Virology*.— 2003.— Vol. 3.— P. 9–18.
29. Patel S., Wale S., Saunders N. Hemi-nested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *M. tuberculosis* strains // *JCM*.— 1996.— Vol. 34.— P. 1686–1690.
30. Sola C., Horgen L., Maisetti J. et al. Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis // *JCM*.— 1998.— Vol. 36.— P. 1122–1124.
31. Sola C., Filliol I., Legrand E. et al. Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics // *Infection, Genetics and Evolution*.— 2003.— Vol. 3.— P. 125–133.
32. Sola C., Filliol I., Legrand E. et al. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-Based Spoligotyping Suggests the Existence of Two New Phylogeographical Clades // *J. Mol. Evol.*— 2001.— Vol. 53, N 6.— P. 680–689.
33. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E. et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. // *Proceed Natural Academic Science*.— 1997.— Vol. 94, N 18.— P. 9869–9874.
34. Zahra H., Mahnaz T., Akbar K. et al. Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Pakistan Reveals Predominance of Central Asian Strain 1 and Beijing Isolates // *JCM*.— 2006.— Vol. 44, N 5.— P. 1763–1768.

О.О. Ляшенко

Харківська медична академія післядипломної освіти

Методи генотипування у фтизіатрії

Для вирішення епідеміологічних завдань у фтизіатрії потрібні методики, що дають змогу розрізняти *M. tuberculosis* між собою. Одним із перших способів був поділ мікобактерій на основі їхніх біохімічних властивостей, але через низьку ефективність і неоднозначності результатів методика не знайшла застосування. Пізніше з'явилися методи, засновані на різниці в геномі мікобактерій з більшою дискримінантною можливістю, а дані, які отримують різні вчені, можна порівнювати.

У статті описано основні сучасні методи, що застосовують для генотипування *M. tuberculosis*, зазначено їхні переваги й недоліки.

Ключові слова: *M. tuberculosis*, генотипування, фтизіатрія, RFLP, VNTR, споліготипування.

O.O. Liashenko

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

Genotyping methods in phthisiology

To resolve problems in epidemiology of tuberculosis required methods that allow to distinguish *M. tuberculosis*. One of the first methods was the division of mycobacteria based on their biochemical properties but because of low efficiency and ambiguity of results technique is not using now. Later appeared methods with more discriminate ability based on difference in the genome of mycobacteria. Moreover data that received from different scientists can be compared.

Key words: *M. tuberculosis*, genotyping, phthisiology, RFLP, VNTR, spoligotyping.

Контактна інформація:

Ляшенко Олександр Олексійович, к. мед. н., доц. кафедри фтизіатрії та пульмонології
61176, м. Харків, вул. Корчагінців, 58
Тел. (057) 738-71-87
E-mail: thepulmonolog@gmail.com

Стаття надійшла до редакції 10 грудня 2014 р.