

UDC 57.083.18:579.61:579.873.21:616.24-008.8.-078

Раннє виявлення та групова ідентифікація штамів *Mycobacterium tuberculosis* за допомогою SNP-аналізу зі шпилькоподібними праймерами

Ю. О. Чередник¹, О. В. Анопрієнко², Н. Г. Горovenko³, Ю. І. Фещенко¹

¹ДУ «Національний інститут фізіотерії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського НАМН України»
Вул. М. Амосова, 10, Київ, Україна, 03680

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

³Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України
Вул. Дорогожицька, 9, Київ, Україна, 03112

yurach@ukr.net

Мета. Провести диференційне виявлення у клінічному матеріалі штамів *M. tuberculosis* (МБТ), що належать до 1-ї або 2/3 принципівих генотипових груп (ПГГ) *M. tuberculosis*, для прискорення діагностики туберкульозу і раннього визначення клінічно і епідеміологічно значущих штамів. **Методи.** SNP (single-nucleotide polymorphism)-аналіз на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі шпилькоподібними праймерами до групоспецифічного SNP *katG*⁴⁶³ та статистичний аналіз клініко-епідеміологічних показників застосовано для дослідження клінічних зразків мокротиння хворих на туберкульоз легень м. Києва. **Результати.** За допомогою ПЛР-системи диференційного групоспецифічного виявлення МБТ з використанням шпилькоподібних праймерів до SNP *katG*⁴⁶³ *M. tuberculosis* детектовано в 47,8 % клінічних зразків, з яких 57,6 % становлять штами ПГГ-1 і 42,4 % – ПГГ-2/3. Встановлено асоціацію між приналежністю до ПГГ-1 і резистентністю до ізоніазиду (OR [95 % CI], 5,417 [1,196–24,522], $P = 0,0283$) та до будь-якого з препаратів першого ряду (рифампіцин/ізоніазид) (OR [95 % CI], 7,00 [1,493–32,82], $P = 0,014$). **Висновки.** SNP-аналіз зі шпилькоподібними SNP-специфічними праймерами до локусу *katG*⁴⁶³ групової приналежності штамів МБТ дозволяє ефективно виявляти у клінічному матеріалі епідеміологічно значущі штами *M. tuberculosis* ПГГ-1.

Ключові слова: SNP, *Mycobacterium tuberculosis*, *katG*, ПЛР-діагностика, туберкульоз.

Вступ. Дослідження еволюції і молекулярної епідеміології *M. tuberculosis* (МБТ), а також стійкості бактерій до протитуберкульозних препаратів (ПТП) робить все актуальнішим швидкий аналіз точкових мутацій і одонуклеотидних поліморфізмів – SNP, який дозволяє проводити широкомасштабні скринінги популяції МБТ. Існує досить різноманітна панель методів для пошуку нових і встановлення вже охарактеризованих SNP: методи на основі секвенування ДНК, метод мікрочип-детекції, алель-специфічна ампліфікація, мультиплексна лігаз-залежна ампліфікація та ін. [1–3]. Для скринінгу мутацій,

асоційованих зі стійкістю до ПТП, модифіковано метод ARMS (Amplification Refractory Mutation System) [4]. Алель-специфічні праймери сконструйовано за принципом «молекулярних буйків» (molecular beacons). Термодинамічні властивості таких шпилькоподібних («hairpin») праймерів дозволили значно підвищити здатність розрізняти мутантний і «дикий» варіанти [5].

Масштабне секвенування і аналіз різних за походженням клінічних ізолятів *M. tuberculosis* дали можливість поділити вид на групи предкових і сучасних штамів. Предкові штами включають ізоляти родини EAI (East African-Indian), що превалюють на території Сингапуру, Південно-Східної Азії та Пів-

денної Індії. Сучасні штами домінують у більшості регіонів світу, зокрема, у Китаї та країнах колишнього Радянського Союзу [6]. На основі локусів SNP двох генів – кодона 463 гена каталази-пероксидази *katG* (*katG*⁴⁶³; CTG → CGG) і кодона 95 гена *gyrA*, що кодує А-субодиницю ДНК-гірази (*gyrA*⁹⁵; AGC → ACC), – у межах групи сучасних штамів МБТ виділяють три «принципові генотипові групи» – ПГГ [7]. ПГГ-1 сучасних штамів МБТ вважають еволюційно старішою і різноманітнішою групою, яка включає в себе родину W-Beijing – еволюційно найуспішніших і найвірулентніших штамів МБТ. Для деяких регіонів світу показано, що серед штамів МБТ родини Beijing достовірно частіше зустрічається резистентність до ПТП [6, 8, 9]. Однак у цілому повного розуміння клінічної та епідеміологічної значущості поділу на такі три генетичні групи немає.

На основі методу визначення SNP за допомогою шпилькоподібних праймерів ми розробили просту методику диференційного виявлення у клінічному матеріалі штамів МБТ, що належать до 1-ї або 2/3 принципових генотипових груп *M. tuberculosis*, для прискорення діагностики туберкульозу і пошуку в клінічному матеріалі клінічно і епідеміологічно значущих штамів. Оцінено інформативність SNP-типуювання на основі статистичного аналізу асоціації генотипів штамів МБТ і клінічних та епідеміологічних показників пацієнтів – продуцентів цих штамів.

Матеріали і методи. *Клінічний матеріал.* Проаналізовано зразки мокротиння 69 хворих на легеневого туберкульозу пацієнтів, що проживають у м. Києві (табл. 1). Діагноз встановлено за даними рентгенологічно-флюорографічних і клінічних обстежень під час їхнього перебування в ДУ «Національний інститут фізйотерапії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського НАМН України» в 2011 році згідно з Наказом Міністерства охорони здоров'я України № 384 від 09.06.06. Епідеміологічні та клінічні дані (стать, вік, приналежність до груп вперше діагностованих випадків туберкульозу легень (ВДТБ) або рецидивуючого туберкульозу (РТБ), форма туберкульозного процесу, наявність деструктивних змін у легенях, дані бактеріоскопічного аналізу і культурального посіву) взято з анамнезу в історіях хвороби. Чутливість штамів МБТ до ПТП (рифампіцину та ізоніа-

зиду) встановлювали за допомогою ПЛР тест-системи «Magicplex TB/MDR Real-time Test (ver.2.0)» (Seegene Inc., Корея) [10].

SNP-типуювання штамів МБТ у клінічних зразках. Мокротиння обробляли розчином N-ацетилцистеїну/NaOH. ДНК виділяли відповідно до протоколу з інструкції виробника тест-системи «DNA extraction kit» (Seegene Inc., Корея). ПЛР виконували за допомогою Taq-полімерази («Fermentas», Литва) у 20 мкл реакційної суміші, що містить буфер для полімерази, 300 мкМ dNTP, по 10 пмоль прямого й зворотного праймерів, 1 од. Taq-полімерази і досліджувану ДНК.

Праймери до мішені SNP *katG*⁴⁶³ сконструйовано за використання програми Primer Express 3.0 з параметрами аннелінгу в межах температури 60 і 65 °С. Зовнішні праймери F463 (5'-ccgacgatgctggcactgacct-3') і R463 (5'-cgctgtgcctaccacggaacg-3') продукували ПЛР-фрагмент 344 п. н. і охоплювали ділянку, яка містить SNP *katG*463. З 5'-кінця SNP-специфічних внутрішніх праймерів додавали послідовності з 6–7 нуклеотидів, комплементарних до 3'-кінця праймера для утворення шпильки: k463-g 5'-GGGCATCgagacactcaatcccgatgccC-3' і k463-t 5'-TGGCATCgagacactcaatcccgatgccA-3' (великими літерами з 5'-кінця праймера позначено послідовності, додані для утворення шпильки; на 3'-кінці підкреслені великі літери відповідають нуклеотидам SNP). Замішували дві паралельні реакційні суміші з одним із шпилькоподібних SNP-специфічних праймерів і зустрічним зовнішнім праймером. Розмір ПЛР-фрагмента з внутрішніми праймерами становить 287 п. н. Параметри шпильки (вільна енергія (ΔG) між $-0,5$ і $-2,0$ за T_m 67–70 °С) перевіряли за допомогою програми mfold (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) (рис. 1).

Статистичну обробку даних проводили в програмі Statistica 6.0 (StatSoft inc.) і MedCalc (http://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Попарне порівняння частот здійснювали, використовуючи критерій χ^2 і точний критерій Фішера за необхідністю. Величину асоціації розраховано із застосуванням показника відношення шансів (OR, odds ratio) при 95 %-му довірчому інтервалі (95 % CI). Різницю між сукупностями даних вважали вірогідною за рівня статистичної значущості $P < 0,05$.

Таблиця 1

Характеристика клінічних зразків за соціально-демографічними та клінічними даними пацієнтів

Показник	ПЛР-позитивні n = 33 (47,8 %)		ПЛР-негативні n = 36 (52,2 %)		OR (95 % CI)	P
	n	%	n	%		
Стать						
Чоловіча	26	78,8	18	50,0	2,67 (0,1468–2,6614)	0,056
Жіноча	9	21,2	18	50,0		
Вікова група						
14\25	22	66,7	28	77,8	0,571 (0,196–1,663)	0,304
26\71	11	33,3	8	22,2		
Група хворих*						
ВДТБ	25	75,7	34	94,4	0,184 (0,036–0,941)	0,042
РТБ	8	24,3	2	5,6		
Форма ТБ						
Інфільтративна	24	72,7	29	80,5	1,554 (0,504–4,791)	0,443
інші	9	27,3	7	19,5		
Дисемінована	7	21,2	2	5,5	0,218 (0,042–1,140)	0,071
інші	26	78,8	34	94,5		
Вогнищева	1	3,0	4	11,1	4,00 (0,432–37,77)	0,226
інші	32	97,0	32	88,9		
Деструкція						
існує	27	81,8	23	63,9	0,399 (0,129–1,200)	0,100
відсутня	6	18,2	13	36,1		

*Статистично значущі відмінності при P < 0,05.

Результати і обговорення. Здатність сконструйованих шпилькоподібних праймерів до SNP *katG*⁴⁶³ розрізняти SNP-варіанти перевіряли на ДНК контрольного штаму *Mycobacterium bovis* BCG, яка дозволяє продукувати ПЛР-фрагмент з праймерами до ПГГ-1 (463-й кодон CTG) і *M. tuberculosis* H37Rv, що належить до ПГГ-3 (463-й кодон CGG). Використання праймерів дає можливість надійно відрізняти SNP-варіанти контрольних штамів і, таким чином, виявляти МБТ у клінічному матеріалі (рис. 2). Загалом 33 зразки (47,8 %) виявилися ПЛР-позитивними, з них 19 (57,6 %) містили штами, що належать до ПГГ-1 і 14 (42,4 %) – до другої або третьої ПГГ. Без урахування групспецифічної диферен-

ціації *katG* як загальний діагностичний маркер проявив ефективність на рівні інших геноспецифічних маркерів (наприклад *hsp65*, *hupB*, *mtp40*), хоча був менш ефективним, ніж маркер повторюваного елемента *IS6110* [10]. Для 8,7 % хворих з негативними даними мікроскопічного дослідження за допомогою маркера *katG* з'являється можливість прискорити підтвердження діагнозу туберкульоз і, відповідно, визначення резистентності збудника до ПТП.

ПЛР-позитивні і ПЛР-негативні зразки досліджено за соціально-демографічними та клінічними даними пацієнтів для встановлення можливих асоціацій з ПГГ і факторів ризику потрапляння у групу з непідтвердженим діагнозом (ПЛР-негативні) і,

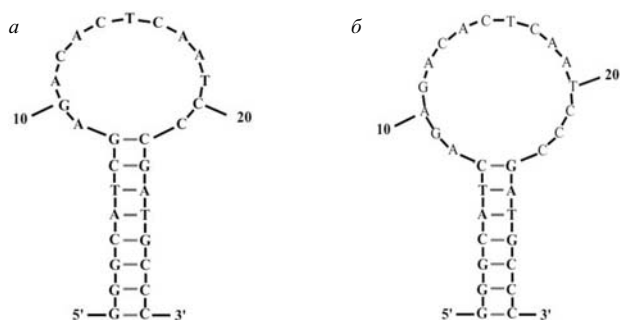


Рис. 1. Різні шпилькоподібні структури праймерів, виведені програмою mfold, сконструйовано на SNP *katG*⁴⁶³ (G-алель). Праймери *a* і *б* відрізняються за параметром вільної енергії зв'язку ΔG (*a* і *б* відповідно $-1,83$ і $-0,63$ ккал/моль за $t = 67^\circ\text{C}$), який залежить від кількості та складу доданих до 5'-кінця нуклеотидів. Праймер *б* використано для диференційного виявлення МБТ у клінічних зразках

відповідно, невиявленою резистентністю або чутливістю до ПТП (табл. 1). Не знайдено значущих відмінностей між групами для категорій статі, віку (аналізували й дрібніші групи, ніж представлені в таблиці), формою туберкульозного процесу та фактором наявності деструктивних змін у легенях. Досить прогнозовану статистично значущу відмінність виявлено між групами ВДТБ і РТБ (за точним критерієм Фішера $P = 0,04$). Тобто ризик входження до ПЛР-негативної групи вищий для випадків ВДТР, ніж РТБ ($OR = 0,184$; $CI (0,036-0,941)$ з вірогідністю $P = 0,042$).

При аналізі груп ВДТБ і РТБ за клінічними показниками у групі ВДТБ вищим є ризик отримати негативний результат бактеріоскопічного аналізу та культурального посіву (табл. 2). За генетичними характеристиками приналежності штамів до ПГГ-1 або ПГГ-2/3 групи ВДТБ і РТБ не продемонстрували статистично значущих відмінностей (табл. 2).

Незважаючи на те, що вірогідність підтвердження діагнозу і встановлення стійкості або чутливості до ПТП у групі РТБ вища, ця група є найнебезпечнішою через більший ризик спричинення рецидиву штамом, стійким до лікарських засобів. Аналіз розподілу клінічних штамів МБТ київського регіону за показниками стійкості до протитуберкульозних препаратів першого ряду – рифампіцину і ізоніазиду – між групами ВДТБ і РТБ підтвердив таку тенденцію для штамів, стійких до рифампіцину (за критерієм Фішера $P = 0,014$), та мультирезистентних штамів з одночасною стійкістю до обох препаратів ($P = 0,047$) (табл. 2). Вивчали також ре-

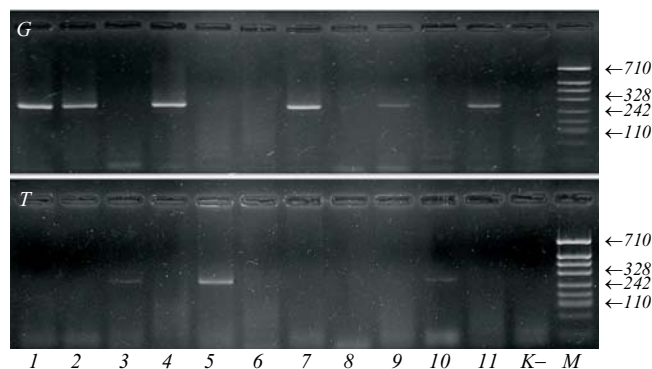


Рис. 2. Диференційне виявлення у клінічному матеріалі штамів, які належать до 1-ї або 2/3 принципів генотипових груп *M. tuberculosis* за допомогою шпилькоподібних праймерів до SNP *katG*⁴⁶³. Зразки у лунках 1, 2, 4, 7, 9, 11 виявляли МБТ, що належать до ПГГ-2/3; у лунках 3, 5, 10 – до ПГГ-1; лунки 6, 8 – ДНК МБТ не виявлено. Зліва показано SNP-варіанти (*G* або *T*), праворуч стрілками – розміри смуг маркера (*M*, п. н.); негативний контроль позначено *K*–

зультати мікробіологічних досліджень стійкості до стрептоміцину та етамбутолу, проте значущих відмінностей не виявлено (даних не наведено).

Аналіз факторів, асоційованих з приналежністю до ПГГ-1 або ПГГ-2/3, не виявив істотного зв'язку з демографічними показниками та клінічними проявами туберкульозу. Проте, що найважливіше, перша група мала статистично значущі відмінності за кількістю штамів, резистентних до ізоніазиду (за критерієм Фішера $P = 0,036$) та до будь-якого з препаратів першого ряду (R/H) (за критерієм Фішера $P = 0,015$). Таким чином, незважаючи на приналежність до груп РТБ або ВДТБ, наявність штаму МБТ ПГГ-1 є фактором ризику того, що цей штам матиме стійкість до ізоніазиду або до ізоніазиду чи рифампіцину (табл. 3).

За нашими даними, у популяції штамів МБТ Київської області частка штамів ПГГ-1 становить більше 55 %, серед яких щонайменш 92,6% – це штам родини Beijing (власні неопубліковані дані). Отже, виявлення у клінічному матеріалі штаму, який належить до ПГГ-1, з великою ймовірністю буде означати присутність штаму родини Beijing. Вірогідно, асоціація зі стійкістю до ізоніазиду ПГГ-1 спричинена саме превалюванням цієї родини. Однак таке припущення потребує ретельніших досліджень. Різні популяції клінічних штамів МБТ на території України виявляють дещо відмінні асоціації. Так, у харківської популяції зв'язок з мультирезистентністю встановлено для штамів родини LAM (однієї з

Таблиця 2

Розподіл деяких клінічних даних пацієнтів і генетичних характеристик штамів МБТ між групами ВДТБ і РТБ

Показник	ВДТБ n = 59 (85,5 %)		РТБ n = 10 (14,5 %)		OR (95 % CI)	P
	n	%	n	%		
Бактеріоскопія*						
Позитивний	19	32,2	8	80,0	8,42 (1,629–43,539)	0,011
Негативний	40	67,8	2	20,0		
Культуральний посів*						
Позитивний	28	47,5	9	90,0	9,96 (1,186–83,704)	0,034
Негативний	31	52,5	1	10,0		
ПГГ⁺						
1-ПГГ	14	56,0	5	62,5	0,76 (0,149–3,916)	0,746
2/3-ПГГ	11	44,0	3	37,5		
Стійкість/чутливість⁺⁺						
R-стійкі*	8	22,9	6	66,6	6,75 (1,370–33,258)	0,019
R-чутливі	27	77,1	3	33,4		
H-стійкі	14	40,0	6	66,6	3,00 (0,642–14,024)	0,1626
H-чутливі	21	60,0	3	33,4		
RH-стійкі*	7	20,0	5	55,5	5,00 (1,057–23,650)	0,042
інші	28	80,0	4	44,5		
R/H-стійкі	15	42,8	7	77,8	4,67 (0,846–25,754)	0,077
R/H-чутливі	20	57,2	2	22,2		

*Статистично значущі відмінності при $P < 0,05$; [†]дані для 33 ПЛР-позитивних за маркером *katG* зразків; ⁺⁺дані для 44 ізолятів, встановлених за результатами Real-Time PCR тесту; R – рифампіцин; H – ізоніазид; RH – мультирезистентні штами зі стійкістю одночасно до двох препаратів; R/H – стійкість до будь-якого з препаратів.

найпоширеніших родин ПГГ-2) [11]. Проте підвищена трансмісивність штамів родини Beijing та абсолютне їхнє домінування серед штамів ПГГ-1 київської популяції робить цю групу найнебезпечнішою і клінічно та епідеміологічно значущою в регіоні.

Одним із швидких і зручних методів виявлення і типування штамів МБТ безпосередньо в клінічному матеріалі є метод споліготипування (типування за олігонуклеотидними спейсерами), мішенню якого є локус кластеризованих коротких паліндромних повторів [12]. Проте загальною властивістю повторюваних мішеней є їхня менша стабільність порівняно з SNP-маркерами, що робить вірогіднішими

конвергентні події, які в свою чергу можуть призводити до фальш-ідентичних генотипів. Зокрема, накопичуються дані щодо виявлення штамів псевдо-Beijing споліготипів [13]. Типування стабільніших SNP-маркерів ефективно використовують у довготривалих і широкомасштабних дослідженнях популяційної структури мікобактерій, еволюції їхньої патогенності, встановленні джерел клональної дисемінації штамів мікобактерій у світі [14]. Однак для практичних цілей клінічної медицини користь одночасного виявлення і SNP-типування штамів МБТ у клінічному матеріалі полягає у певній можливості встановлення лабораторної крос-контрами-

Таблиця 3

Стійкість/чутливість до протитуберкульозних препаратів клінічних штамів, що розподілені за принциповими генотипічними групами

Стійкість/чутливість	Генотип		OR (95 % CI)	P
	ПГГ-1 (%)	ПГГ-2/3 (%)		
R-стійкі	7 (36,8)	3 (21,4)	2,139 (0,440–10,392)	0,346
R-чутливі	12 (63,1)	11 (78,6)		
H-стійкі	13 (68,4)	4 (28,6)	5,4167 (1,196–24,522)	0,0283
H-чутливі	6 (31,6)	10 (71,4)		
RH-стійкі	6 (31,6)	3 (21,4)	1,692 (0,341–8,396)	0,519
RH-чутливі	13 (68,4)	11 (78,6)		
R/H-стійкі	14 (73,7)	4 (28,6)	7,00 (1,493–32,82)	0,014
R/H-чутливі	5 (26,3)	10 (71,4)		

Примітка. R – рифампіцин; H – ізоніазид; RH – мультирезистентні штами зі стійкістю одночасно до двох препаратів; R/H – стійкість до будь-якого з препаратів.

нації при зміні групової приналежності штаму між клінічним зразком і отриманою згодом культурою.

Комплексний аналіз молекулярно-генетичних властивостей клінічних штамів *M. tuberculosis* і супутньої клініко-епідеміологічної інформації є важливим інструментом для оцінки можливого зв'язку між генотипом мікобактерійного штаму і клінічними та епідеміологічними особливостями перебігу захворювання [15, 16]. Сучасна стратегія боротьби з туберкульозом і моделі трансмісії МБТ засновані на припущенні, що всі клінічні штами мікобактерії туберкульозу мають більшою мірою однакові трансмісивні і вірулентні властивості [15, 17]. Проте, якщо штами, приналежні до різних генетичних груп або родин, відрізняються за біологічними властивостями, які в свою чергу мають неоднакові епідеміологічні і клінічні прояви, системи охорони громадського здоров'я повинні це враховувати.

Висновки. Розроблена методика SNP-аналізу зі шпилькоподібними SNP-специфічними праймерами до локуса *katG*⁴⁶³ штамів МБТ у клінічному матеріалі дозволяє на ранніх термінах прогнозувати частку епідеміологічно значущих штамів першої принципової генотипової групи і прискорювати впровадження запобіжних заходів проти розповсюдження подібних штамів. Поглиблення розуміння клінічної та епідеміологічної значущості генетичних груп МБТ у цілому і найпоширеніших ро-

дин, таких як Beijing, LAM та ін., може стати основою для створення більш ефективної стратегії боротьби з туберкульозом.

Yu. O. Cherednyk¹, O. V. Anopryenko², N. G. Gorovenko³, Yu. I. Feschenko¹

Early detection and group-specific identification of *Mycobacterium tuberculosis* strains by method of single-nucleotide polymorphism analysis with hairpin primers

¹State Institution «National Institute of Phthisiology and Pulmonology named after F. G. Yanovskiy, NAMS»

10, M. Amosova Str., Kyiv, Ukraine, 03680

²Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

³P. L. Shupik National Medical Academy of Post-Graduate Education
9, Dorohozhytska Str., Kyiv, Ukraine, 04112

Summary

Aim. Based on the method of single-nucleotide polymorphism (SNP) determination with hairpin primers to perform a differential identification in clinical material of *M. tuberculosis* (*Mtb*) strains, which belong to the 1st or 2/3 principal genotypic groups (PGG), with the aim of shortening the terms of tuberculosis diagnosing and early detection of most clinically and epidemiologically-significant strains. **Methods.** PCR with the SNP-specific hairpin primers to group-specific SNP *katG*⁴⁶³, and statistical analysis of clinical/epidemiological categories of the patients were used for study of sputum clinical samples from patients with pulmonary tuberculosis living in Kyiv. **Results.** PCR system of differential group-specific detection of *Mtb* in clinical samples using hairpin primers to SNP *katG*⁴⁶³ effectively detected *Mtb* in 47.8 % of samples of which 57.6 % were strains of the PGG-1 and 42.4 % – PGG-2/3. The association between belonging to the PGG-1 and resistance to isoniazid (OR [95 % CI], 5.417 [1.196–24.522] P = 0.0283) and to any of the first-line drugs (rifampicin/isoniazid) (OR [95 % CI], 7.00 [1.493–32.82] P = 0.014) was revealed. **Conclusions.** SNP-analysis with the

hairpin SNP-specific primers to locus *katG*⁴⁶³ of *Mtb* strains group membership in clinical material allows effective detection of epidemiologically important PGG-1 strains.

Keywords: SNP, *Mycobacterium tuberculosis*, *katG*, PCR-diagnostics, tuberculosis.

Ю. А. Чередник, О. В. Аноприенко, Н. Г. Горovenko, Ю. И. Фещенко

Раннее выявление и групповая идентификация штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с помощью SNP-анализа со шпилечными праймерами

Резюме

Цель. Провести дифференциальное выявление в клиническом материале штаммов *M. tuberculosis* (МБТ), относящихся к 1-й или 2/3 принципиальным генотипическим группам *M. tuberculosis*, для сокращения сроков диагностики туберкулеза и раннего выявления наиболее клинически и эпидемиологически значимых штаммов. **Методы.** SNP (single-nucleotide polymorphism)-анализ на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) со шпилечными праймерами к группоспецифическому SNP *katG*⁴⁶³ и статистический анализ клинико-эпидемиологических показателей применены для исследования клинических образцов мокрот больных туберкулезом легких г. Киева. **Результаты.** С помощью ПЦР-системы дифференциального группоспецифического выявления МБТ с использованием шпилечных праймеров к SNP *katG*⁴⁶³ *M. tuberculosis* обнаружена в 47,8 % клинических образцов, из которых 57,6 % составляют штаммы ПГГ-1 и 42,4 % – ПГГ-2/3. Установлена ассоциация между принадлежностью к ПГГ-1 и резистентностью к изониазиду (OR [95 % CI], 5,417 [1,196–24,522] P = 0,0283) и к лямбда-бому из препаратов первого ряда (рифампицин/изониазид) (OR [95 % CI], 7,00 [1,493–32,82] P = 0,014). **Выводы.** SNP-анализ со шпилечными SNP-специфическими праймерами к локусу *katG*⁴⁶³ групповой принадлежности штаммов МБТ позволяет эффективно выявлять в клиническом материале эпидемиологически значимые штаммы *M. tuberculosis* ПГГ-1.

Ключевые слова: SNP, *Mycobacterium tuberculosis*, *katG*, ПЦР-диагностика, туберкулез.

REFERENCES

1. Gutacker M. M., Smoot J. C., Migliaccio C. A., Ricklefs S. M., Hua S., Cousins D. V., Graviss E. A., Shashkina E., Kreiswirth B. N., Musser J. M. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains // *Genetics*.–2002.–**162**, N 4.–P. 1533–1543.
2. Waterfall C. M., Cobb B. D. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis // *Nucleic Acids Res.*–2001.–**29**, N 23.–E119.
3. Bergval I. L., Vijzelaar R. N., Dalla Costa E. R., Schuitema A. R., Oskam L., Kritski A. L., Klatser P. R., Anthony R. M. Development of multiplex assay for rapid characterization of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Clin. Microbiol.*–2008.–**46**, N 2.–P. 689–699.
4. Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E., Powell S. J., Summers C., Kalsheker N., Smith J. C., Markham A. F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) // *Nucleic Acids Res.*–1989.–**17**, N 7.–P. 2503–2516.
5. Hazbon M. H., Alland D. Hairpin primers for simplified single-nucleotide polymorphism analysis of *Mycobacterium tubercu-*

6. Kruuner A., Hoffner S. E., Sillastu H., Danilovits M., Levina K., Svenson S. B., Ghebremichael S., Koivula T., Kallenius G. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia // *J. Clin. Microbiol.*–2001.–**39**, N 9.–P. 3339–3345.
7. Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Deretic V., Musser J. M. Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and -susceptible *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities // *Antimicrob. Agents Chemother.*–1997.–**41**, N 3.–P. 600–606.
8. Toungoussova O. S., Sandven P., Mariandyshv A. O., Nizovtseva N. I., Bjune G., Caugant D. A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel oblast, Russia // *J. Clin. Microbiol.*–2002.–**40**, N 6.–P. 1930–1937.
9. Asmolov O. K., Nikolayevskyy V. V., Kresyyn V. Y., Bazhora Yu. I., Filyuk V. V., Lobanov O. K. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Odessa oblast of Ukraine and risk factors for drug resistant tuberculosis transmission: results of two year prospective study // *Ukrainian Pulmonology J.*–2005.–N 2.–P. 8–15.
10. Cherednyk Yu. O., Anopriyenko O. V., Gorovenko N. G., Feschenko Yu. I. Assessment of genetic markers for early detection of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to anti-TB drugs // *Visn. Ukr. Soc. of Geneticists and Selectionists.*–2013.–**11**, N 3.–P. 144–152.
11. Dymova M. A., Liashenko O. O., Poteiko P. I., Krutko V. S., Khrapov E. A., Filipenko M. L. Genetic variation of *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Kharkiv Oblast, Ukraine // *BMC Infect. Dis.*–2011.–**11**.–P. 77.
12. Streicher E. M., Victor T. C., van der Spuy G., Sola C., Rastogi N., van Helden P. D., Warren R. M. Spoligotype signatures in the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *J. Clin. Microbiol.*–2007.–**45**, N 1.–P. 237–240.
13. Fenner L., Malla B., Ninet B., Dubuis O., Stucki D., Borrell S., Huna T., Bodmer T., Egger M., Gagneux S. «Pseudo-Beijing»: evidence for convergent evolution in the direct repeat region of *Mycobacterium tuberculosis* // *PLoS One.*–2011.–**6**, N 9.–e24737.
14. Huard R. C., Fabre M., de Haas P., Lazzarini L. C., van Soolingen D., Cousins D., Ho J. L. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex // *J. Bacteriol.*–2006.–**188**, N 12.–P. 4271–4287.
15. Kong Y., Cave M. D., Zhang L., Foxman B., Marrs C. F., Bates J. H., Yang Z. H. Association between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing/W lineage strain infection and extrathoracic tuberculosis: Insights from epidemiologic and clinical characterization of the three principal genetic groups of *M. tuberculosis* clinical isolates // *J. Clin. Microbiol.*–2007.–**45**, N 2.–P. 409–414.
16. Norkina O. V., Kinsht V. N., Mokrousov I. V., Kurunov Iu. N., Krasnov V. A., Filipenko M. L. The genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and an assessment of risk factors of tuberculosis spread in Russia's Siberian region by molecular epidemiological methods // *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*–2003.–N 3.–P. 9–18.
17. Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K. E., Connell N. D., Kreiswirth B. N., Whittam T. S., Musser J. M. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*–1997.–**94**, N 18.–P. 9869–9874.

Received 28.03.13