

П.Б. Антоненко, В.И. Кресюн, Е.А. Антоненко

*Одесский национальный медицинский университет,
Валиховский пер., 2, Одесса, 65082, Украина*

КЛАСТЕРЫ ГЕНОТИПА *Mycobacterium* *TUBERCULOSIS* В ОДЕССКОМ РЕГИОНЕ

*Было проведено исследование генотипа 104 штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных из мокроты больных туберкулезом легких (ТБ), путем определения шести локусов VNTR (Variable Number Tandem Repeats), которые характеризовались наибольшим полиморфизмом – MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A. Согласно полученным результатам, в Одесском регионе наблюдается дальнейшее распространение штаммов семейства Beijing, которое характеризуется неблагоприятным течением ТБ и высокой медикаментозной резистентностью. Комбинированное определение шести локусов для генотипирования возбудителя ТБ было эффективным и информативным. Полиморфизм некоторых локусов *M. tuberculosis*, которые исследовались, снизился относительно 2006 года, что свидетельствует об усилении доминирования определенных кластеров возбудителя ТБ. Наибольший уровень мутаций, которые приводят к лекарственной резистентности, наблюдался среди изолятов семейства Beijing, в частности таких кластеров, как 355334, 365334, 375344 и 465334.*

Ключевые слова: *M. tuberculosis, MIRU-VNTR, Beijing.*

Основная роль в лабораторной диагностике резистентности возбудителя туберкулеза практически во всех странах мира принадлежит бактериологическим методам. Однако в последнее время все большее значение приобретают молекулярно-генетические методы, которые позволяют определять не только наличие мутаций в генотипе *Mycobacterium tuberculosis*, приводящих к лекарственной резистентности, но также отслеживать процесс распространения туберкулезной инфекции. Этому способствовало открытие полиморфных повторяющихся участков в цепи нуклеотидов в ДНК *M. tuberculosis* [10]. Применение генотипирования в клинико-эпидемиологических исследованиях является определяющим в тех случаях, когда необходимо различить первичную и вторичную (приобретенную) медикаментозную резистентность. Если генотипы образца *M. tuberculosis* до и во время лечения совпадают, то это свидетельствует о приобретении устойчивости во время лечения. Если «молекулярные отпечатки пальцев» отличаются, то это свидетельствует о повторном инфицировании (реинфекции) другим штаммом, что потребует коррекции противотуберкулезного лечения [8].

Одним из методов генотипирования является VNTR (Variable Number Tandem Repeats или вариативное количество тандемных повторов), который базируется на выявлении полиморфизма ряда минисателлитных участков с помощью индивидуальной пары праймеров [8]. Как правило, методом VNTR определяются 12, 15 или 24 локусов. По данным исследований, проведенных на Юге Украины в предыдущие годы, наибольшая чувствительность наблюдалась при исследовании таких локусов MIRU (*Mycobacterium Interspersed Repetitive Units* или вставленные повторяющиеся единицы микобактерий), как MIRU26, MIRU31, MIRU40, ETR-A (Exact Tandem Repeat) [1].

Целью данного исследования было изучение особенностей генотипа штаммов *M. tuberculosis* у больных туберкулезом путем определения шести локусов VNTR и сравнение полученных генотипов с результатами предыдущих годов.

Материалы и методы. Выделение культур возбудителя туберкулеза производили на базе бактериологической лаборатории Одесского областного противотуберкулезного диспансера (ООПТД) путем пассажей культур *Mycobacterium tuberculosis* из колоний, выросших на твердой питательной среде Левенштейна-Енсена после посева биоматериалов больных туберкулезом. В дальнейшем полученные колонии вносили в эппендорфы с последующим добавлением раствора хлороформа и помещением в термостат при 95 °С на 20 минут. В исследование были включены изоляты, полученные от больных, у которых впервые диагностирован туберкулез (длительность лечения не превышала 2-х месяцев), что позволило изучить первичную медикаментозную устойчивость.

Генотипирование проводили с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР) путем определения количества повторов определенных локусов – MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A, в генотипе *M. tuberculosis*. Для каждого локуса использовалась своя пара праймеров, при этом размер фрагмента зависел от наличия и количества повторов одинаковых ДНК-последовательностей [4] (рис. 1).

Принадлежность штаммов *M. tuberculosis* к семейству *Beijing* производили с использованием метода определения инсерционной последовательности IS6110 в регионе между генами *dnaA* и *dnaN* [7] на базе Одесского национального медицинского университета. Известно, что мутации в генах *katG* и *inhA* у *M. tuberculosis* наиболее часто сочетаются с нечувствительностью к изониазиду [9, 12]. Для определения мутаций в гене *katG* использовали ПЦР и три праймера (*katg5R*, *katg0F*, *katg4R*) [5, 12]. При отсутствии мутации в кодоне 315 гена *katG* амплифицировался фрагмент, который состоял из 292 пар нуклеотидов (п.н.), а при наличии мутации в указанном кодоне амплифицировался фрагмент из 435-п.н. С целью определения мутаций в гене *inhA* использовали пару праймеров *tabAF* и *inhARmut*; при наличии



Рис. 1. Полиморфизм количества tandemных повторов локуса MIRU31

М – маркер молекулярной массы; 1,3,8,12,14 – 212 пар нуклеотидов (2 tandemных повтора); 2,4,5,10 – 265 п.н. (3 tandemных повтора); 6,7,11,13,15 – 371 п.н. (5 tandemных повторов)

мутаций в данном гене происходила амплификация фрагмента в 146 п.н. [9]. Для определения мутаций в гене *rpoB*, а именно в кодонах 516, 526 и 531, которые ассоциируются с устойчивостью к рифампицину, проводили ПЦР с использованием трех праймеров (R516B, R526B и R1R) [13]. При отсутствии мутаций в кодоне 516, 526 и 531 гена *rpoB* амплифицировались фрагменты 214, 181 и 167-п.н. соответственно. Обработку статистических данных проводили с использованием Microsoft Excel, программы «Primer Biostatistica».

Результаты и их обсуждение. Всего было исследовано 104 ДНК-изолята. Из этого числа 57 образцов принадлежали к семейству *Beijing* (54,8 %), 47 изолятов – к другим семействам (группа non-*Beijing*) (45,2 %). В 2006 и 2003 годах, при аналогичном исследовании на базе Одесской областной противотуберкулезной клиники, распространенность *Beijing* семейства составляла 43,0 % и 39,6 %. Таким образом, наблюдается дальнейшее распространение штаммов семейства *Beijing*, которые характеризуются неблагоприятным течением заболевания и высокой лекарственной устойчивостью.

Были получены данные о распространении количества повторов в шести локусах, которые исследовались (табл. 1). По количеству повторов штаммы семейства *Beijing* наиболее отличались от штаммов группы non-*Beijing* согласно локусам MIRU10, MIRU31, MIRU39 и ETR-A.

Для определения эффективности метода VNTR-типирования путем определения 6-ти локусов был проведен анализ полиморфизма и разделительной способности локусов, которые исследовались в обеих группах с помощью вычисления индекса Хантера-Гастона. Значения индекса от 0,6 и более характеризовали высокую чувствительность метода генотипирования, от 0,3 до 0,6 – умеренную чувствительность, менее 0,3 – низкую чувствительность [4].

Так, среди изолятов семейства *Beijing* низкий полиморфизм (низкая чувствительность) наблюдался у MIRU31, MIRU39 и ETR-A; умеренный полиморфизм (умеренная чувствительность) – у MIRU10 и MIRU40; высокий полиморфизм (высокая чувствительность) – у MIRU26 (рис. 2). В сравнении с данными аналогичных исследований 2006 года было установлено уменьшение полиморфизма определенных локусов – MIRU26, MIRU31, MIRU40 и ETR-A, в тоже время вырос полиморфизм локусов MIRU10 и MIRU39 [1]. В частности, если в 2006 году локусы MIRU31 и ETR-A демонстрировали высокий и умеренный полиморфизм, то в 2012 году оба локуса отличались низким полиморфизмом.

Таблица 1
Количество повторов по 6 локусам в генотипе возбудителя туберкулеза

Локус	Штаммы семейства <i>Beijing</i>	Штаммы группы non- <i>Beijing</i>
MIRU10	3>4>2	4>3>5>7>2=9>6=8
MIRU26	5>6>7>1	5>1>2>4
MIRU31	5>4>6	3>2>4>5
MIRU39	3>4>1	2>3>1
MIRU40	3>4>5	4>3>2>1>5>6
ETR-A	4>3	2>3=4

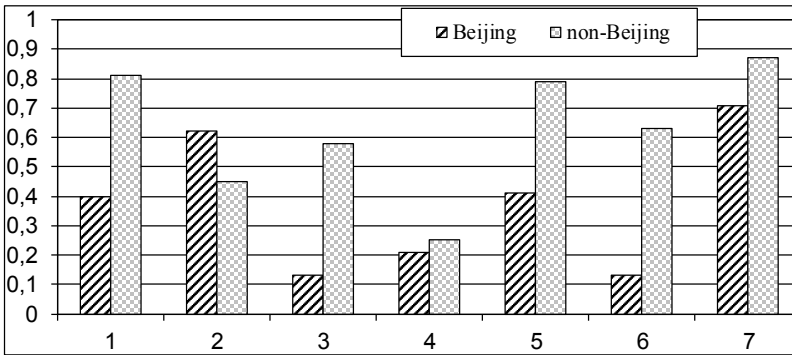


Рис. 2 Разделительная способность метода VNTR-типирования для изолятов возбудителя туберкулеза, которые принадлежат к семейству *Beijing* или группе non-*Beijing* (2012 г.)

Примечание: По оси абсцисс – показатель индекса Хантера-Гастона; по оси ординат – локусы, которые исследовались - 1-MIRU-10; 2-MIRU-26; 3-MIRU-31; 4-MIRU-39; 5-MIRU-40; 6-ETR-A; 7-вместе все шесть локусов.

В 2012 году использованный метод генотипирования имел большую чувствительность среди изолятов группы non-*Beijing*, чем среди штаммов семейства *Beijing*. Так, у штаммов группы non-*Beijing* низкий полиморфизм наблюдался у MIRU39; умеренный полиморфизм – у MIRU26 и MIRU31; высокий полиморфизм – у MIRU10, MIRU40 и ETR-A. При сравнении с данными 2006 года отмечалось определенное уменьшение полиморфизма MIRU26 и MIRU39 – так, в 2006 году эти локусы имели высокий и умеренный полиморфизм соответственно, в 2012 году – умеренный и низкий полиморфизм соответственно.

Комбинированное определение всех шести локусов для генотипирования как среди изолятов семейства *Beijing*, так и среди образцов группы non-*Beijing* было высокоэффективным (0,71 и 0,87 соответственно). В 2006 году эти показатели составляли 0,88 и 0,93 соответственно. Таким образом, идентификация *M. tuberculosis* путем определения шести локусов подтвердила, что этот метод является достаточно информативным и чувствительным способом генотипирования, особенно в условиях ограниченного материального обеспечения, когда определение всех 12, 15, или 24 локусов является достаточно сложным. В то же время при сравнении результатов, полученных в 2012 году, с аналогичными данными 2006 года следует отметить, что произошло определенное снижение полиморфизма локусов *M. tuberculosis*, особенно среди штаммов семейства *Beijing*, что свидетельствует об усилении доминирования определенных штаммов возбудителя туберкулеза.

По данным MIRU10-MIRU26-MIRU31-MIRU39-MIRU40-ETR-A-типирования, наиболее распространенными комбинациями в группе штаммов семейства *Beijing* были 355334, 365334 и 465334 (по 6-7 культур в каждой группе), реже встречались комбинации 375334, 355344 и 455334 (по 4–5 культур в каждой группе) (табл. 2). В 2003 и 2006 годах также распространенными были кластеры 355344, 355334, 365334, 375334 [1, 4]. Стабильное присутствие указанных кластеров среди штаммов возбудителя туберкулеза свидетельствует о значительной роли именно этих изолятов для эпидемиологического процесса в Одесском регионе. В об-

Таблица 2

Распространенность медикаментозной резистентности среди различных кластеров возбудителя туберкулеза (%)

VNTR-кластеры (количество изолятов)	Уровень мутаций в гене			Культуральная мультирезистентность
	<i>katG</i>	<i>inhA</i>	<i>rpoB</i>	
Семейство <i>Beijing</i>				
355334(6)	4/6	3/6	3/6	3/6
355344(5)	0/5	0/5	0/5	0/5
355444(4)	1/4	0/4	0/4	0/4
365334(7)	5/7	4/7	3/7	3/7
375334(5)	3/5	3/5	3/5	3/5
455334(5)	2/5	2/5	2/5	2/5
465334(6)	4/6	4/6	3/6	2/6
Все штаммы (57)	26/57	22/57	19/57	18/57
Группа non-Beijing				
353244(3)	0/3	1/3	0/3	0/3
353232(3)	0/3	0/3	0/3	-
452252(3)	1/3	0/3	0/3	0/3
553233(5)	4/5	3/5	2/5	2/5
712214(3)	0/3	0/3	0/3	0/3
913224(3)	0/3	0/3	0/3	0/3
Все штаммы (47)	10/47*	6/47*	3/47*	4/47*

Примечание: * - $P < 0,05$ (относительно семейства *Beijing*)

щем среди штаммов семейства *Beijing* было выявлено 17 кластеров, к которым принадлежало 86 образцов. Остальные 34 образца принадлежали к уникальным изолятам.

Согласно данным 2012 года, в группе non-Beijing наиболее часто отмечались комбинации 553233 (5 культур), 353244, 452252, 712214, 913224 (по 3 культуры для каждой комбинации). В целом к вышеуказанным 5 кластерам принадлежало 24 изолята группы non-Beijing. Остальные 48 культур принадлежали к малочисленным кластерам. По данным 2006 года более распространенными были кластеры 452242, 562242, 712234.

Согласно международной базе VNTR, которая представлена на сайте <http://www.MIRU-VNTRplus.org>, по данным MIRU10-MIRU26-MIRU31-MIRU39-MIRU40-ETR-A кластеры 353244 принадлежат к группе *Cameroon* (Евро-Американская группа); кластеры 452252 и 452252, и им подобные – к группе *LAM* (Евро-Американская группа); наиболее многочисленная группа кластеров 553233 близка к группе *Haarlem* (Евро-Американская группа); кластер 712214 – к группе *URAL* (Евро-Американская группа) [6]. В 2006 году исследования в Одесском регионе обнаружили распространение практически тех же групп кластеров [4]. Согласно литературным данным, в центральном регионе России среди изолятов возбудителя туберкулеза доминировали штаммы семейств *LAM* и *Beijing* [2]. Эти штаммы играют значительную роль в распространении туберкулезной эпидемии.

Среди изолятов семейства *Beijing* 45,6 % и 37,9 % имели мутацию в гене *katG* или в гене *inhA* соответственно; среди штаммов группы non-Beijing уровень вышеуказанных мутаций составлял 21,2 % и 12,8 % соответственно. Таким образом, у изолятов семейства *Beijing* мутации в

гене *katG* или в гене *inhA* наблюдались в 2,2 раза ($\chi^2=6,74$) и в 3,0 раза ($\chi^2=8,41$) чаще, чем у штаммов группы non-Beijing. Около 37,9 % и 6,4 % штаммов семейства *Beijing* и группы non-Beijing имели мутацию в гене *rpoB*. Таким образом, у изолятов семейства *Beijing* мутации в гене *rpoB* наблюдались в 5,9 раз чаще, чем у штаммов группы non-Beijing ($\chi^2=11,22$).

По данным культурального метода, среди 57 ДНК-изолятов семейства *Beijing*, 18 (31,6 %) изолятов были мультирезистентными (одновременно резистентными к изониазиду и рифампицину) (табл. 2). В группе штаммов non-Beijing уровень культуральной мультирезистентности составил 8,5 % (4 штамма из 47). Таким образом, штаммы семейства *Beijing* в 3,7 раз чаще имели, по данным культурального метода, мультирезистентность, чем изоляты группы non-Beijing ($\chi^2=8,22$).

Выяснилось, что более половины культур семейства *Beijing* с комбинациями 355334, 365334, 375344 и 465334 имели мутацию в гене *katG* или в гене *inhA*, а также в гене *rpoB*. Это совпадает с литературными данными, согласно которым изоляты с профилем 375334 характеризовались высоким уровнем мультирезистентности [3,11]. В то же время, у изолятов с кластером 355344 вышеуказанные мутации вообще отсутствовали. Среди ДНК-изолятов группы non-Beijing наибольший уровень мутаций в гене *katG* или в гене *inhA*, а также в гене *rpoB* наблюдался у штаммов с комбинацией 553233.

Выводы.

1. Комбинированное определение шести локусов MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40 и ETR-A для генотипирования возбудителя туберкулеза было эффективным и информативным.

2. Полиморфизм ряда исследованных локусов *M. tuberculosis* снизился относительно данных, полученных в 2006 году, что свидетельствует об усилении доминирования определенных кластеров возбудителя туберкулеза.

3. В Одесском регионе наблюдается дальнейшее распространение штаммов семейства *Beijing*, которое отличается неблагоприятным течением заболевания и высокой лекарственной устойчивостью.

4. Наибольший уровень мутаций, которые ассоциируются с лекарственной устойчивостью, наблюдался среди изолятов семейства *Beijing*, в частности таких кластеров, как 355334, 365334, 375344 и 465334.

П.Б. Антоненко, В.Й. Кресюн, К.О. Антоненко

*Одеський національний медичний університет,
Валіховський пров., 2, Одеса, 65082, Україна*

КЛАСТЕРИ ГЕНОТИПУ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* В ОДЕСЬКОМУ РЕГІОНІ

Резюме

Було досліджено генотип 104 штамів *Mycobacterium tuberculosis*, виділених з мокрот хворих на туберкульоз легень (ТБ), шляхом визначення шести локусів VNTR (Variable Number Tandem Repeats), які відзначались найбільшим поліморфізмом – MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A. Згідно отриманих результатів, в Одеському регіоні спостерігається подальше поширення штамів родини

Beijing, які характеризуються несприятливим перебігом ТБ і високою медикаментозною резистентністю. Комбіноване визначення запропонованих шести локусів для генотипування збудника ТБ було ефективним та інформативним. Поліморфізм деяких локусів *M. tuberculosis*, що досліджувались, знизився порівняно з 2006 роком, що свідчить про посилення домінування певних кластерів збудника ТБ. Найбільший рівень мутацій, що призводить до медикаментозної резистентності, спостерігався серед ізолятів родини *Beijing*, зокрема таких кластерів, як 355334, 365334, 375344 і 465334.

К л ю ч о в і с л о в а : *M. tuberculosis*, MIRU-VNTR, *Beijing*.

P.B. Antonenko, V.I. Kresyun, K.O. Antonenko

*Odesa National Medical University,
2 Valihovsky Lane, Odesa, 65082, Ukraine*

CLUSTERS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* GENOTYPES IN ODESA REGION

R e s u m e

It has been studied a genotype of 104 strains of *Mycobacterium tuberculosis*, obtained from sputum of patients with tuberculosis (TB), via detection of six loci VNTR (Variable Number Tandem Repeats), which are characterized by highest polymorphism – MIRU10, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A. According to received data in Odesa region one can see further increasing of spreading of *Beijing* family strains that are characterized by unfavourable course of TB and high drug-resistance. Polymorphism of certain detected loci of *M. tuberculosis* decreased relatively to 2006 year that has witnessed an increasing of predominance of certain *M. tuberculosis* clusters. The highest level of mutations that leads to drug-resistance, were among *Beijing* family isolates, for instance as 355334, 365334, 375344 and 465334.

К е у w o r d s : *M. tuberculosis*, VNTR, *Beijing*.

1. Антоненко П.Б., Кресюн В.И., Антоненко К.А. Способ генотипирования возбудителя туберкулеза // Туберкулез и болезни легких (РФ). – 2011. – № 12. – С. 47–50.
2. Иванов И.Ю., Степанишина В.Н., Степанишин М.Ю. Споліготипи клінічних штамів *Mycobacterium tuberculosis*, виділених у больних туберкульозом в центральном регионе России // Проблемы туберкулеза и болезней легких – 2004. – № 5. – С. 23–27.
3. Карачунский М.А., Черноусова Л.Н. Молекулярная эпидемиология туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – № 4. – С. 3–7.
4. Ніколаєвський В.В. Оптимізація стратегії генотипування *Mycobacterium tuberculosis* в Одеській області України: порівняння методів споліготипування та VNTR // Одеський медичний журнал. – 2005. – № 3. – С. 32–39.
5. Патент № 29211 України, МПК (2006) А61К 31/00; С12Q 1/68; С12R 1/32 Склад реактивної суміші для діагностики резистентності до ізоніазиду збудника туберкульозу: Антоненко К.О., Кресюн В.Й, Антоненко П.Б. (Україна) – Заявл. 30.07.2007; Опубл. 10.01.2008, Бюл. № 1. – 4 с.
6. Allix-Béguec C., Harmsen D., Weniger T. [et al.] Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data

- and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N 8. – P. 2692–2699.
7. Banu S., Stephen V. Gordon, Si Palmer, Islam Reazul Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in Bangladesh and prevalence of the Beijing strain // J Clin Microbiol. – 2004. – N 42 (2). – P. 674–682.
 8. de Beer J.L., Akkerman O.W., Schürch A.C., Mulder A. [et al.] Optimization of Standard In-House 24-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Typing for *Mycobacterium tuberculosis* and Its Direct Application to Clinical Material // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52, N 5. – P. 1338–1342.
 9. Herrera-Leon Laura, Molina Tamara, Saiz Pilar, Saez-Nieto Juan Antonio, Jimenez Maria Soledad New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2005. – Vol. 49, N 1. – P. 144–147.
 10. Jonsson J., Hoffner S., Berggren I., Bruchfeld J., Ghebremichael S. Comparison between RFLP and MIRU-VNTR Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Isolated in Stockholm 2009 to 2011 // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, N 4. – P. 1–6.
 11. Nikolayevskyy V.V., Brown T.J., Bazhora Y.I. [et al.] Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from the southern Ukraine // Clin. Microbiol. Infect. – 2007. – Vol. 13, N 2. – P. 129–138.
 12. Mokrousov Igor, Otten Tatiana, Filipenko Maxim, Vyazovaya Anna Detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting *katG* codon 315 variation // J Clin Microbiol. – 2002. – Vol., N 2. – P. 2509–2512.
 13. Mokrousov I., Otten T., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. Allele-specific *rpoB* assays for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2003. – Vol. 47, N 7. – P. 2231–2235.

Отримано 07.09.2015