

А.А. Лац¹, О.Б. Огарков¹, С.Н. Жданова¹, А.Н. Зарбуев², Л.С. Унтанова², М.В. Бадлеева³,
Б.Д. Занаева¹, О.Ц. Цыдыпова¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМОТНОШЕНИЙ ОСНОВНЫХ ГЕНОТИПОВ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ПО 24 ЛОКУСАМ MIRU-VNTR

¹ ФГБУ «Научный центр проблем семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

² Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер им. Г.Д. Дугаровой (Иркутск)

³ ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (Улан-Удэ)

С помощью MIRU-VNTR типирования по 24 локусам и делеционного анализа по RD105 и RD207 среди тридцати одного изолята выявлены основные генотипы *M. tuberculosis* в Бурятии. Штаммы семейства Beijing составили 67,4 % и имели разнообразные профили с превалированием в выборке (22,6 %) двух современных эпидемически значимых субтипов Beijing MIT17 и MIT16. Обнаружены штаммы Beijing MIT 642, которые отличались числом повторов в переменных локусах, что может отражать более давнюю циркуляцию этих субтипов без формирования у них свойств эпидемически распространяющихся штаммов в современной популяции или имевших эпидемическое значение в прошлом. Так же проявилась неоднородность в ряде локусов среди штаммов, отнесенных к группе LAM, T и X, требующая дополнительных исследований. Целью настоящей работы было выявление современных эпидемически значимых генотипов возбудителя туберкулеза, а так же генотипов, имевших эпидемическое значение в прошлом на примере региона с высокими уровнями распространенности туберкулеза – республики Бурятия.

Ключевые слова: молекулярная эпидемиология, туберкулез, пандемический генотип *M. tuberculosis*, реконструкция истории эпидемий, филогения

INVESTIGATION PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS MAJOR GENOTYPES MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BY MIRU-VNTR-24 GENOTYPING

A.A. Lats¹, O.B. Ogarkov¹, S.N. Zhdanova¹, A.N. Zarbuev², L.S. Untanova²,
M.V. Badleeva³, B.D. Zanaeva¹, O.Ts. Tsydyпова¹

¹ Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Irkutsk

² Republican Clinical TB Dispensary, Irkutsk

³ Buryatian State University, Ulan-Ude

Thirty-one isolates of *M. tuberculosis* was identified in Buryatia by MIRU-VNTR-24 typing and deletion analysis by RD105 and RD207. Beijing family strains accounted for 67,4 % and had a variety of profiles with a prevalence (22,6 %) of two modern epidemic subtype Beijing MIT17 and MIT16. Strains Beijing MIT 642 differed in the number of repeats of the variable loci, it may reflect a longer circulation of these subtypes without shaping their properties of epidemic circulating strains in modern populations, or they had epidemic importance in the past. It is also apparent heterogeneity in the number of loci among strains according to group LAM, T, and X, which requires additional research. The aim of this work was to determine the current epidemiologically important genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*, as well as the genotypes had an epidemic importance in the past as an example of the region with a high prevalence of tuberculosis – the Republic of Buryatia.

Key words: molecular epidemiology of tuberculosis, pandemic genotype *M. tuberculosis*, reconstruction of the history epidemic, phylogeny

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-31475 «Исследование филогенетических взаимоотношений основных генотипов *Mycobacterium tuberculosis* по 24 локусам MIRU-VNTR для реконструкции истории эпидемий туберкулеза в прошлом и настоящем на территории Якутии, Бурятии и Иркутской области».

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы все большее признание и практическое применение находят результаты работ, посвященных изучению разнообразия, которое существует среди клинических изолятов МБТ. Новые и совершенствующиеся молекулярные методы позволяют осуществляться пространственно-временной мониторинг за циркулирующими клонами микобактерий туберкулеза. Продемонстрированы ассоциации определенных генетических вариантов микобактерий

туберкулеза в России с их патогенными свойствами. Наиболее подробно охарактеризовано семейство штаммов генотипа Пекин. На сегодняшний день популяция штаммов микобактерий туберкулеза, циркулирующих в России, была описана рядом методов. Однако использование различных методик в аналогичных исследованиях делает трудным сопоставимость их выводов. Тем не менее, поддается анализу информация, полученная на основании IS6110-RFLP, 12-ти и 24-MIRU-VNTR типирования и сполитотипирования во многих регионах России и в соседствующих с ней странах. Большинство исследований проведено на обширной территории северо-запада России: Санкт-Петербург [13], Карелия [11]), Архангельск [15], Мурманск [5], Псков [12]. Также мониторинговые исследования проводились в Сибири – в Новосибирской [16], Свердловской [8], Иркутской области [2] и республиках Саха (Якутия) и Бурятия [3].

Среди ПЦР-подходов, разработанных для определения микобактерий туберкулеза, MIRU-VNTR типирование является мировым стандартом, рекомендованным ВОЗ [18]. Этот метод с высокой пропускной способностью анализа клинических изолятов [14] в настоящее время широко используется, в том числе заложен в программу универсальных систем генотипирования в США [4]. Недавно оптимизированная 15 до 24-локусов MIRU-VNTR-схема была предложена для международной стандартизации [14]. С помощью 24-локусного MIRU-VNTR типирования может быть достигнута высокая степень дискриминации эпидемических штаммов, особенно для таких однородных групп как генетическое семейство Beijing [17].

На основании вышеизложенного, актуальным является изучение распространенности различных генотипов МБТ с целью расшифровки влияния полиморфизма штаммов на течение эпидемического процесса туберкулеза, установление истории инфекции и прогноза ее развития. В настоящее время такого рода исследования, безусловно, могут существенным образом улучшить диагностику туберкулеза и будут иметь прогностическое значение на исход заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включена выборка из 31 случайно отобранного штамма МБТ, которые выделены от больных с различными формами легочного туберкулеза, находившихся на лечении в специализированном стационаре Республики Бурятия в январе–декабре 2012 г. ДНК собранных нами изолятов выделяли, генотипировали по 24 локусам MIRU-VNTR и регионам делеций RD 105 и RD207 и идентифицировали как описано ранее [1, 2]. Статистическую обработку данных проводили в редакторе электронных таблиц MS Excel 7.0 и пакете статистических программ «Statistica for Windows» (версия 6.0). Значимость различий между параметрами оценивали с помощью непараметрического критерия χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы использовали делеционный анализ на наличие делеции в RD105 вместо сполиготипирования и обнаружили, что 21 из 31 изолята (67,4 %) принадлежали семейству Beijing, а 10 (32,6 %) отнесены к другим семействам. Следует также отметить, что RD105 маркер служит для идентификации Восточно-Азиатской линии штаммов, которая включает две сублинии, в том числе штаммы семейства сполиготипов Beijing [10]. В дополнение к делеции в RD105, классические штаммы W/Beijing также имеют уникальную делецию в RD207, приводящую к потере спейсеров 1–34, что характерно именно для этого семейства сполиготипов [9]. Все исследуемые нами штаммы с делецией RD105 имели также делецию и RD 207.

Использование открытой базы данных SITVIT для идентификации генетических семейств по 12 локусам MIRU-VNTR позволило присвоить международные идентификационные номера (MIT) двадцати одному штамму (15 из 21 штаммов семейства

Beijing и 6 из 10 других семейств). Частота наиболее распространенных подтипов Beijing MIT17 и MIT16, циркулирующих на территории России, составила для Beijing MIT17 – 12,9 % (4/31) и MIT16 – 9,7 % (3/31) от общей выборки штаммов. Эти два подтипа составили суммарно 22,6 % (7/31), что является нехарактерным для структуры популяции МБТ генотипа Beijing, циркулирующих на территории России [5, 11–13, 15, 16]. Это вызвано присутствием в выборке штаммов Beijing MIT642 в 12,9 % (4/31) случаев, Beijing MIT137 – в 6,5 % (2/31), Beijing MIT245 и MIT82 – по 3,2 % (1/31), которые в более крупных исследованиях Бурятии области имели меньшее представительство [2]. Также были описаны уникальные профили MIRU-VNTR клинических штаммов МБТ с делецией в RD105/207, не имевшихся в базе данных SITVIT (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVITDemo/outilsConsultation.jsp>), но ранее описанных на изучаемой территории [3]. Кроме представителей семейства Beijing были обнаружены два изолята, относящиеся к семейству LAM (MIT326), по одному штамму семейства Ural (MIT647), T1 (MIT15) и T2 (MIT325).

С помощью MIRU-VNTR генотипирования на 24 локуса тридцати одного изолята были обнаружены 26 различных VNTR профилей. Число копий каждого локуса варьировало от 1 до 10. Профили были сгруппированы путем построения NJ-tree (Онлайн-инструменты MIRUVNTRplus базы данных (<http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>)) в четыре основных кластера на основе филогенетической кластеризации и генотипических характеристик. Кластер, принадлежащий семейству Beijing, имел изоляты с идентичными профилями только среди Beijing MIT17. Один штамм Beijing MIT17 отличался дополнительным повтором в Mtub21. Аналогичная вариация в одном локусе (Mtub21 или Mtub04) была выявлена и для Beijing MIT16. Выявленный факт наличия только одного мутационного события у вышеописанных штаммов может характеризовать их как эпидемический вариант МБТ, передающийся активно в популяции. Эти штаммы могут быть эпидемиологически связаны недавними заражениями из популяционного резервуара инфекции, несмотря на отсутствие контактов в отдельных очагах. Вместе с тем можно переоценить принадлежность этой группы штаммов к эпидемиологически связанной цепи случаев ТБ. Для разрешения этого вопроса на следующем этапе исследования мы в дальнейшем оценим антибиотикорезистентность изолятов с профилями Beijing MIT17 и Beijing MIT16, полученных от впервые выявленных больных ТБ.

Четыре (12,9 %) штамма Beijing MIT642 и два (6,5 %) штамма Beijing MIT137 проявили неоднородность в целом ряде локусов. Штаммы Beijing MIT642 отличались числом повторов в Qub26, Mtub04, ETR C, Mtub21 и Qub415bc локусах. Этот профиль впервые был получен согласно базе SITVIT из Японии [8] и описан среди штаммов из Тайваня [7].

Подобным образом ситуация сложилась с пятью изолятами, отнесенными к семейству LAM, составляющими другой кластер. Два изолята LAM (MIT326),

имеющие идентичные профили, находились в группе со штаммами LAM-подобными, для которых MIT определен как Orphan (в базе SITVIT представлен только один штамм с такими характеристиками) (нами обозначен как LAM-Orphan). Профиль одного штамма в базе SITVIT не был представлен, но согласно сходству и кластеризации со штаммами семейства LAM был обозначен как Orphan LAM-Like.

Особого внимания заслуживают два штамма, отнесенные к семействам T: изолят T2 (MIT325) по сходству профиля отнесен к кластеру LAM, изолят T1 (MIT15) – кластеру Camerooon. Но для уточнения принадлежности изолятов с выявленным профилем потребуются дополнительное исследование на наличие специфических для LAM маркеров [10] для исключения гомоплазии. Изолят X (MIT36), отнесенный к кластеру Beijing, не имел специфических делеций RD 105/207, поэтому его сходство профиля с представителями группы носит характер гомоплазии. Как видно из представленного описания, для ряда штаммов идентификация штаммов потребовала комплексного использования баз данных (SITVIT и MIRU-VNTRplus), результатов делеционного анализа и рассмотрения подробностей филогенетического древа.

Таким образом, изучение генетического разнообразия популяции возбудителя туберкулеза по 24 локусам MIRU-VNTR позволило выявить эпидемически значимые генотипы данного микроорганизма. Широко распространенные в России штаммы семейства Beijing, на изучаемой территории характеризуются разнообразными профилями с превалированием двух субтипов, имеющими клональное распространение. Это субтипы Beijing MIT17 и Beijing MIT16, с которыми связывают основные проявления современной пандемии туберкулеза в России [12]. Также обнаружены штаммы субтипа Beijing MIT642, которые отличались числом повторов в варибельных локусах (Qub 26, Mtub04, ETR C, Mtub21 и Qub 4156c), что может отражать более давнюю циркуляцию этих субтипов Beijing без формирования у них свойств эпидемически распространяющихся штаммов. Обнаружение вариационного ряда субтипов Beijing, в том числе MIT642, послужит одним из направлений дальнейшего установления пути распространения эпидемически значимых генотипов *M. tuberculosis* (в первую очередь генотипа Beijing) из стран Восточной Азии в Россию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Молекулярное типирование штаммов микобактерий туберкулеза в Иркутской области (Восточная Сибирь) в 2000–2005 гг. / О.Б. Огарков [и др.] // Молекулярная медицина. – 2007. – № 2. – С. 33–38.
2. Полиморфизм *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных от больных туберкулезом в пенитенциарной системе Бурятии: высокая распространенность генотипа пекин / О.Б. Огарков [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – № 6. – С. 54–57.
3. Характеристика лекарственно устойчивых штаммов *Mycobacterium tuberculosis* с помощью молекулярно-генетических методов / С.Н. Жданова [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2011. – № 6. – С. 228–230.

4. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States / L. Cowan [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – № 43. – P. 688–695.
5. Extremely high prevalence of multidrug resistant tuberculosis in Murmansk, Russia: a population-based study / J. Ma'kinen [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2011. – № 30 –P. 1119–1126.
6. Genetic analysis of mycobacterium tuberculosis strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping / S.Y. Kovalev [et al.] // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2005. – № 9. – P. 746–752.
7. Genetic Diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Family Based on SNP and VNTR Typing Profiles in Asian Countries / Y.-Y. Chen [et al.] // PLoS ONE 7(7):e39792. doi:10.1371/journal.pone.0039792.
8. Hypervariable loci that enhance the discriminatory ability of newly proposed 15-loci and 24-loci variable-number tandem repeat typing method on *Mycobacterium tuberculosis* strains predominated by the Beijing family / T. Iwamoto [et al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2007. – № 270. – P. 67–74.
9. Large Sequence Polymorphisms Classify *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Ancestral Spoligotyping Patterns / L. Flores [et al.] // J. Of Clin. Microbiol. – 2007. – № 45. – P. 3393–3395.
10. Major *Mycobacterium tuberculosis* Lineages Associate with Patient Country of Origin / M. Reed [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2009. – № 47. – P. 1119–1128.
11. Markelov Y., Narvskaya O. Circulation of multidrug-resistant tuberculosis pathogen strains in the Republic of Karelia // Tuberk. Bolezn. Legk. – 2010. – № 2. – P. 54–56.
12. *Mycobacterium tuberculosis* population in northwestern Russia: an update from Russian-EU-Latvian border region / I. Mokrousov [et al.] // PLoS One. 2012;7(7):e41318. doi: 10.1371/journal.pone.0041318.
13. Narvskaya O., Mokrousov I., Otten T., Vishnevsky B. Molecular markers: application for studies of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia / Read M.M., editor. Trends in DNA fingerprinting research // Nova Science Publishers. – 2005. – №7. – P. 111–125.
14. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* / P. Supply [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – № 44. – P. 498–510.
15. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia / O.S. Toungoussova [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2002. – № 40. – P. 1930–1937.
16. The genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and an assessment of risk factors of tuberculosis spread in Russia's Siberian region by molecular epidemiological methods / O.V. Norkina [et al.] // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. – 2003. – № 3. – P. 9–18.
17. Velji P, Nikolayevskyy V., Brown T, Drobniowski F. Discriminatory ability of hypervariable variable number

tandem repeat loci in population-based analysis of Mycobacterium tuberculosis strains, London, UK // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – № 15. – P. 1609–1616.

18. World Health Organization, Annual Meeting of the European Network for TB Surveillance in Europe, Dubrovnik, Croatia 25–26 May: Tech. rep.: WHO. – 2009.

Сведения об авторах

Лац Анна Александровна – младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций ИЭМ ФГБУ «Научного центра проблем семьи СО РАМН (664025, Иркутск, К. Маркса, 3, тел. (3952) 333425, e-mail: hh0413@yandex.ru)

Огарков Олег Борисович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией эпидемиологически и социально значимых инфекций ИЭМ ФГБУ «Научного центра проблем семьи СО РАМН»

Жданова Светлана Николаевна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций ИЭМ ФГБУ «Научного центра проблем семьи СО РАМН»

Зарбуев Антон Найданович – кандидат медицинских наук, главный врач Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер им. Г.Д. Дугаровой

Унтанова Лариса Семеновна – кандидат медицинских наук, заведующий организационно-методическим отделом Республиканского клинического противотуберкулезного диспансера им. Г.Д. Дугаровой

Бадлеева Мария Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент, Бурятский государственный университет

Занаева Баярма Дугдановна – лаборант, сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций ИЭМ ФГБУ «Научного центра проблем семьи СО РАМН»

Цыдыпова Ольга Цыренжаповна – лаборант, сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций ИЭМ ФГБУ «Научного центра проблем семьи СО РАМН, (664025, Иркутск, Карла Маркса, 3)