

УДК 579.873.21:579.253.2

С.Н. Жданова<sup>1</sup>, О.Б. Огарков<sup>1</sup>, А.Н. Зарбуев<sup>2</sup>, Л.С. Унтанова<sup>2</sup>, Е.Д. Савилов<sup>1,3</sup>**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ПРИ СОЧЕТАННОЙ ПАТОЛОГИИ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В ВОСТОЧНО-СИБИРСКОМ РЕГИОНЕ**<sup>1</sup> ФГБУ «Научный центр проблем семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)<sup>2</sup> Республиканский клинический противотуберкулезный диспансер им. Г.Д. Дугаровой (Улан-Удэ)<sup>3</sup> ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (Иркутск)

Проведено исследование 61 клинического штамма *M. tuberculosis* методом MIRU-VNTR по 12-ми локусам. Продемонстрировано преобладание генетической группы Beijing (78,7 %) в популяции микобактерий, выделенных от больных с сочетанной инфекцией туберкулез–ВИЧ, проживающих на территории Иркутской области и республики Бурятия. Множественная лекарственная устойчивость проявлялась у трети (34,4 %) изученных изолятов без существенного отличия у представителей генотипа Пекин и не-Пекин.

**Ключевые слова:** *M. tuberculosis*, туберкулез, ВИЧ-инфекция, лекарственная устойчивость, генотип Пекин, MIRU-VNTR, SITVIT

**GENETIC POLYMORPHISM OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS AND HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION IN EASTEN SIBERIA**S.N. Zhdanova<sup>1</sup>, O.B. Ogarkov<sup>1</sup>, A.N. Zarbuev<sup>2</sup>, L.S. Untanova<sup>2</sup>, E.D. Savilov<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Irkutsk<sup>2</sup> Republican Clinical TB Dispensary, Ulan-Ude<sup>3</sup> Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

A total 61 randomly selected strains of *M. tuberculosis* were genotyped by the 12 loci of MIRU-VNTR. It was shown the predominance of the Beijing genetic group (78,4 %) in population of mycobacterium from the patients with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection in Irkutsk region and Buryatia. Multidrug resistance was observed in 34,4 % of the studied strains without significant differences among representatives of Beijing and non-Beijing.

**Key words:** *M. tuberculosis*, HIV-infection, MIRU-VNTR, Beijing genotype, drug resistant, SITVIT

Некоторые из ключевых особенностей туберкулеза — хронический характер заболевания, и, как правило, предшествующая многие годы латентная инфекция, приобрели в современных условиях развития двух эпидемий — туберкулеза (ТБ) и ВИЧ-инфекции, новые черты. У ВИЧ-инфицированных эффективное сдерживание клинических проявлений туберкулеза во время латентного периода становится недостижимым вследствие непосредственного поражения клеток иммунной системы вирусом иммунодефицита человека. Это приводит как к сокращению латентного периода туберкулеза, так и повышению риска нового заражения на фоне падения защитных сил организма. У ВИЧ-инфицированных больных с низким числом CD4 Т-клеток быстро развивается активная форма туберкулеза [14].

Проблема распространения туберкулеза усугубляется тем, что происходит расширение группы риска заражения и распространения инфекции за счет наблюдаемого в настоящий момент преодоления границ концентрированной эпидемии ВИЧ-инфекции и выхода ее в общую популяцию на ряде территорий РФ, в том числе и Сибирском Федеральном округе, где лидирующую позицию занимает Иркутская область.

Резервуар микобактерий туберкулеза (МБТ), обеспечиваемый больными ко-инфекцией ТБ/ВИЧ, неоднозначен. Значительное преобладание диссеминированных и распространенных форм ТБ у ВИЧ-инфицированных, по сравнению с ВИЧ-негативными больными ТБ, на фоне меньшей частоты и менее значительных размеров полостей распада при легочных формах может привести к тому, что активность передачи инфекта в этой специфической популяции может в целом остаться неизменной [9, 12]. Другая характерная черта — развитие множественной лекарственной устойчивости у больных ко-инфекцией ТБ/ВИЧ — повышает эпидемическое значение этой уязвимой группы в современном течении эпидемического процесса ТБ [23].

Современные исследования показали, что результат инфицирования и заболевания туберкулезом зависит от генотипа возбудителя и хозяина [13, 15]. При этом предполагается, что определенные генотипы МБТ могут иметь конкурентные преимущества среди ВИЧ-инфицированных. Целый ряд исследований показал, что штаммы генотипа Пекин, с которым связывают повышенные частоты резистентности к лекарственным средствам, стали эпидемическими за последние несколько

десятилетий на территории бывшего СССР [2, 6, 15], в том числе и в Восточно-Сибирском регионе [3]. На основании вышеизложенного, актуальным является изучение распространенности различных генотипов МБТ и оценки их лекарственной устойчивости среди больных ко-инфекцией ТБ/ВИЧ на территории эпидемиологического неблагополучия, что и явилось целью настоящего исследования.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включен 61 случайно отобранный штамм МБТ, выделенный от больных (взрослые мужчины (42) и женщины (19) 21 – 49 лет) с различными формами легочного туберкулеза, сочетанными с ВИЧ-инфекцией (46 – от впервые выявленных пациентов, 13 – от хронических больных и 2 – больных с рецидивом), находившихся на лечении в противотуберкулезных диспансерах Иркутской области и Республики Бурятия (РБ) в 2010 – 2012 гг. ДНК собранных нами изолятов выделяли и генотипировали по 12 локусам MIRU-VNTR как описано ранее [1]. Для идентификации генетических семейств использовали открытые базы данных MIRU-VNTRplus [17] и SITVIT [128]. Анализ на наличие или отсутствие делеции RD105 в геноме МБТ осуществляли по методике, описанной М. Reed и соавт. [16]. Оценка лекарственной устойчивости в исследуемой выборке была осуществлена по результатам использования метода абсолютных концентраций.

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  $\chi^2$ . Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  [4].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании скрининг-теста делеции RD105 в исследуемой выборке было обнаружено 78,7 % (48/61) представителей генотипа Beijing без значимого отличия среди впервые выявленных (80,4 % – 37 из 46 случаев), хронических и рецидивирующих (73,3 % – 11 из 14 случаев) больных туберкулезом с ВИЧ. Путем дальнейшей дифференциации штаммов с помощью MIRU-12 локусного типирования были обнаружены профили, свидетельствующие о циркуляции штаммов и других генетических семейств, большинство из которых были отнесены к известным: LAM (8,2 %), Ural (1,6 %), T18 (1,6 %). Доля неклассифицированных штаммов среди изученных образцов составила 9,8 % (6/61). Применение MIRU – VNTR типирования позволило выявить неоднородность преобладающей группы штаммов, отнесенных к генотипу Пекин. Около половины (45,9 %) из них имели профили 223325153533 и 223325173533, классифицированные как Beijing MIT16 и Beijing MIT17 [19] соответственно. Сравнение других MIRU-профилей Beijing с базой данных SITVIT позволило определить присутствие более редких классифицированных образцов и

уникальных профилей. Описанный нами ранее [3] среди больных туберкулезом Бурятии профиль 223325173423 (MIT642) встречался как среди больных коинфекцией ТБ/ВИЧ из Бурятии, так и в Иркутской области – 6,6 % (4/61). Обнаружены также единичные изоляты с профилями, которые отсутствуют в базе SITVIT. Выявленные особенности преобладания и разнообразия представителей генотипа Beijing среди исследуемой группы больных свидетельствуют об эпидемическом распространении этих штаммов. Структура распределения изолятов, выделенных от больных ТБ/ВИЧ, носит сходный характер с полученными нами ранее результатами по территории Иркутской области и Республике Бурятия [3].

В исследуемой выборке треть (34,4 % – 21/61) составляли штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (одновременная резистентность к рифампицину и изониазиду) без значительного перевеса хронических больных ТБ – 40,2 % (6/15) по сравнению с впервые выявленными – 32,6 % (15/46). На этом фоне чувствительность сохраняли только 18,0 % (11/61) штаммов, выделенных от больных с новыми случаями ТБ. Распределения частот МЛУ среди штаммов генотипа «Пекин» и «не-Пекин» не имели отличия, как от общей выборки ( $\chi^2 = 0,146$ ;  $p = 0,703$ ), так и в группах впервые выявленных и хронических больных с сочетанной патологией ( $\chi^2 = 0,768$ ;  $p = 0,375$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Условия ретроспективного сбора анамнестических данных пациентов не позволили нам выяснить, была ли у впервые выявленных больных первичная лекарственная устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам в исследуемой группе пациентов, которая являлась бы доказательством повышенного риска заражения антибиотикоустойчивыми МБТ у ВИЧ-инфицированных. Тем не менее, мы предприняли попытку оценить общее влияние МЛУ среди больных ТБ/ВИЧ по данным нашей выборки. Оценка исходов пациентов с МЛУ ТБ свидетельствует, что две трети перестали быть бактериовыделителями (вследствие смертельного исхода болезни – 33,3 % (7/21) или эффективного курса лечения – 33,3 % (7/21)), а у трети больных стационарный курс лечения был либо закончен, либо прерван с наличием бактериовыделения. На фоне этого, по нашим данным, стационар покинули 41,0 % (25/61) ВИЧ-позитивных бактериовыделителей МБТ, четвертая часть из которых (7/25) – носители МЛУ. Насколько большую эпидемическую опасность несут эти больные, оценить однозначно сложно.

Заразность ВИЧ/ТБ-инфицированных пациентов по сравнению с ВИЧ-отрицательными лицами была предметом многих исследований, которые, однако, дали противоречивые результаты. Эти данные, как внутрибольничные, так и внебольничные, были объединены в мета-анализе М. Cruciani с соавт., который заключил, что случаев повторного заражения туберкулезом в целом среди ВИЧ-

инфицированных пациентов было ни больше, ни меньше, чем среди ВИЧ-отрицательных больных [19]. Результаты другого исследования позволили выявить, что при домашних контактах с ВИЧ-отрицательными случаев повторного заражения было больше по сравнению с контактами с ВИЧ/ТБ-инфицированными в Рио-де-Жанейро [2].

Рядом авторов считается, что в некоторых ситуациях, ВИЧ-инфицированные пациенты с легочными заболеваниями могут передавать МБТ меньше, чем ВИЧ-неинфицированные больные. Эти предположения построены на том, что лица с сочетанной инфекцией ВИЧ/ТБ не в состоянии поддерживать туберкулезную инфекцию, в основном, потому что ВИЧ истощает CD4 T-клетки, которые необходимы для активации макрофагов и гранулема-образования [14]. Возможно, ВИЧ-инфицированные менее заразны, потому что в их мокроте содержится меньше бактерий за счет редуцированных полостей распада. Кроме того, из-за отсутствия иммунитета, средняя скорость прогрессирования заболевания у ВИЧ/ТБ-инфицированных ускоряется по отношению к больным туберкулезом, которые являются ВИЧ-отрицательными. Следовательно, у ВИЧ/ТБ пациентов клинические и рентгенологические признаки проявляются раньше [12]; и у них более короткий период, в течение которого они заразны до начала лечения, поэтому должны иметь, следовательно, меньше возможностей для распространения.

При этом следует иметь в виду, что, при легочном туберкулезе существует положительная связь между вирулентностью и активностью передачи, которая связана с образованием полостей, более часто приводящих не только к усилению бактериовыделения, но к смерти пациента с коинфекцией [10]. В то же время, туберкулезный менингит или внелегочный туберкулез, более характерные для ВИЧ-инфицированных, представляют собой тупиковый путь для передачи бактерий [8], т.е. МБТ штаммы, которые приводят к смертельному исходу, считаются более опасными, но эти штаммы теряют возможность эффективной передачи.

Другой оценкой опасности больных коинфекцией ТБ/ВИЧ, как резервуара МБТ, служит определение разнообразия генотипов, которые, поражая иммунокомпрометированных людей, могут расширить свои биологические ниши. Это подтверждают наблюдения из исследования, проведенного в Сан-Франциско, где выявлена повышенная вероятность заражения МБТ среди разных генетических линий у ВИЧ-инфицированных лиц, чем ВИЧ-отрицательных лиц [21]. В другой работе обнаружено, что генетическое разнообразие МБТ изолятов в обеих группах пациентов было одинаковым [11]. Последние данные согласуются с материалами, полученными нами в настоящей работе.

Обнаруженное абсолютное преобладание штаммов генотипа Beijing, представленного однородной группой MIRU – VNTR вариантов, отражает общую обстановку циркулирующих в Восточно-Сибирском регионе МБТ. Со штаммами этого генотипа связывают способность предраспо-

лагать к приобретению устойчивости к лекарственным препаратам, обеспечиваемых мутациями [6]. Тем не менее, доказательства повышения частоты мутаций штаммов Пекин до сих пор отсутствуют [22]. К тому же, следует учитывать, что данные об относительной трансмиссивности МЛУ штаммами по сравнению с лекарственно-чувствительными штаммами неоднозначны [7]. Лекарственно-устойчивые штаммы могут быть меньше размером, чем полностью чувствительные штаммы [7]. И, вместе с тем, в некоторых районах мира, таких как страны бывшего Советского Союза, где распространённость МЛУ особенно высока, МЛУ штаммы МБТ весьма успешны, и среди них преобладают штаммы генотипа Beijing [2, 23]. Одним из возможных объяснений служит то обстоятельство, что MDR штаммы достаточно длительно циркулируют в этих регионах, произошла компенсационная эволюция [5], которая облегчает начальный дефицит размеров бактерий.

Таким образом, выявленное преобладающее распространение штаммов генотипа Beijing среди больных ТБ/ВИЧ коинфекцией носит неоднозначный характер, требующий настороженного внимания специалистов и исследователей. Успешность распространения эпидемических штаммов этого генотипа на фоне высоких показателей первичной и приобретенной антибиотикорезистентности МБТ и расширения группы риска заражения за счет значительного увеличения числа ВИЧ-инфицированных создали весомые предпосылки для сохранения устойчивого резервуара этой опасной инфекции в регионе.

#### 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. Савилов Е.Д., Синьков В.В., Огарков О.Б. Пекинский генотип *M. tuberculosis* // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 4. – С. 50 – 53.
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. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала / Е.Д. Савилов [и др.]. – Новосибирск : Наука-Центр, 2011. – 156 с.
5. Andersson D.I., Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? // Na. Rev. Microbiol. – 2010. – Vol. 8. – P. 260 – 271.
6. Borrell S., Gagneux S. Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2009. – Vol. 13. – P. 1456 – 1466.
7. Cohen T., Sommers B., Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis* // Lancet Infect. Dis. – 2003. – Vol. 3. – P. 13 – 21.

8. Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection / R.W. Shafer [et al.] // *Medicine (Baltimore)*. — 1991. — Vol. 70. — P. 384–397.
9. Flynn J.L., Chan J. Immunology of tuberculosis // *Annu. Rev. Immunol.* — 2001. — Vol. 19. — P. 93–129.
10. Helke K.L., Mankowski J.L., Manabe Y.C. Animal models of cavitation in pulmonary tuberculosis // *Tuberculosis (Edinb.)*. — 2006. — Vol. 86. — P. 337–348.
11. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved / I. Comas [et al.] // *Nat. Genet.* — 2010. — Vol. 42. — P. 498–503.
12. Human immunodeficiency virus and the prevalence of undiagnosed tuberculosis in African gold miners / Corbett E.L. [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2004. — Vol. 170. — P. 673–679.
13. Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis / R. van Crevel [et al.] // *J. Infect. Dis.* — 2009. — Vol. 200. — P. 1671–1674.
14. Kwan C.K., Ernst J.D. HIV- and tuberculosis: a deadly human syndemic // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2011. — Vol. 24. — P. 351–376.
15. «Lethal» combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209-336G allele in Russian male population / O. Ogarkov [et al.] // *Infection, Genetics and Evolution.* — 2012. — Vol. 12. — P. 732–736.
16. Major *Mycobacterium tuberculosis* Lineages Associate with Patient Country of Origin / M. Reed [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2009. — Vol. 47 (4). — P. 1119–1128.
17. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria / T. Weniger [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Vol. 38. — P. 326–331. — <http://www.miru-vntrplus.org>
18. SITVITWEB — A publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology / C. Demay [et al.] // *Infect. Genet. Evol.* — 2012. — Vol. 12(4). — P. 755–766. — [http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/index.jsp](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/index.jsp)
19. The impact of human immunodeficiency virus type 1 on infectiousness of tuberculosis: a meta-analysis / M. Cruciani [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2001. — Vol. 33. — P. 1922–1930.
20. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* to contacts of HIV-infected tuberculosis patients / A.C. Carvalho [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2001. — Vol. 164. — P. 2166–2171.
21. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis* / S. Gagneux [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — Vol. 103. — P. 2869–2873.
22. Werngren J., Hoffner S.E. Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 1520–1524.
23. WHO. Global tuberculosis control — surveillance, planning, financing. — Geneva, Switzerland: WHO; 2010.

#### Сведения об авторах

**Жданова Светлана Николаевна** — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр проблем семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, Иркутск, Карла Маркса, 3; тел. (3952) 333425, e-mail: svetnii@mail.ru)

**Огарков Олег Борисович** — к.б.н., заведующий лабораторией ФГБУ «Научный центр проблем семьи и репродукции человека» СО РАМН (664025, Иркутск, Карла Маркса, 3)

**Зарбуев Антон Найданович** — к.м.н., главный врач Республиканского клинического противотуберкулезного диспансера им. Г.Д. Дугаровой

**Унтанова Лариса Семеновна** — к.м.н., заведующий организационно-методическим отделом Республиканского клинического противотуберкулезного диспансера им. Г.Д. Дугаровой

**Савилов Евгений Дмитриевич** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» (664079, г. Иркутск, м-н Юбилейный, 100)