

Умпелева Т.В.<sup>1</sup>, Вязовая А.А.<sup>2</sup>, Кравченко М.А.<sup>1</sup>, Еремеева Н.И.<sup>1</sup>, Нарвская О.В.<sup>2</sup>

## Генотипирование изолятов *Mycobacterium tuberculosis* группы non-Beijing, циркулирующих в Уральском регионе

1 - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург; 2 - ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург.

*Umpeleva T. V., Vyazovaya A. A., Kravchenko M. A., Eremeeva N. I. Narvskaya O. V.*

## Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolate, nonBeijing group, circulating in Ural region

### Резюме

Методами MIRU-VNTR и сполиготипирования проведено генотипирование 80 изолятов *Mycobacterium tuberculosis* группы nonBeijing, выделенных от вновь выявленных больных туберкулезом легких – жителей Уральского региона. Мутации, обуславливающие лекарственную устойчивость к рифампицину и изониазиду, были определены тест-системой «ТБ-Биочип». Дискриминирующие способности 15-локусного MIRU-VNTR типирования и сполиготипирования составили 0,99 и 0,97 соответственно. Некоторые VNTR-кластеры могут содержать изоляты различающиеся сполиготипами и спектром мутаций устойчивости к рифампицину и изониазиду. Среди изолятов non-Beijing, по данным MIRU-VNTR типирования, преобладали представители генетических групп: LAM (31,25%) и Ural (26,25%).

**Ключевые слова:** *Mycobacterium tuberculosis*, генотипирование, VNTR, сполиготипирование, nonBeijing, ТБ-Биочип

### Summary

A total of 80 *Mycobacterium tuberculosis* isolates, nonBeijing genotype from newly detected TB patients, living in Ural region of Russia, were studied by using MIRU-VNTR typing and spoligotyping. Mutations associated with resistance to isoniazid and rifampicin were detected by microchip technology («TB-Biochip»). The discrimination powers of 15 locus MIRU-VNTR genotyping and spoligotyping were 0.99 and 0.97 respectively. Some MIRU-VNTR clusters may contain isolates with different spoligotypes and may differ in drug mutation. Predominant groups of isolates according to MIRU-VNTR data were LAM (31,25%) and Ural (26,25%).

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, genotyping, VNTR, spoligotyping, nonBeijing, TB-Biochip

### Введение

Одной из характерных черт молекулярно-генетической структуры популяции возбудителя туберкулеза на территории России является высокий удельный вес штаммов генетического семейства Beijing. В среднем, штаммы этого семейства составляют около половины популяции возбудителя туберкулеза. [1-6] Штаммы, принадлежащие к другим генетическим семействам, принято объединять в группу non-Beijing. Для генотипирования этой группы используют несколько методов: RFLP IS6110, сполиготипирование, MIRU-VNTR-типирование, RFLP IS6110, благодаря высокой дискриминирующей способности, по сей день служит «золотым стандартом», однако его широкое использование ограничивает ряд недостатков: длительность, трудоемкость, высокая стоимость, сложность интерпретации результатов генотипирования и др. [7-9] В последние годы все большую популярность завоевывают методы сполиготипирования и MIRU-VNTR-типирования *M. tuberculosis*, основанные на

полимеразной цепной реакции. Эти методы менее трудоемки, а результаты генотипирования легко сопоставимы между отдельными лабораториями. [10,11]

Цель настоящего исследования – оценить эффективность методов сполиготипирования и MIRU-VNTR-типирования изолятов *M. tuberculosis* группы non-Beijing в Уральском регионе.

#### Материалы и методы

178 изолятов *M. tuberculosis* были получены в период с июня 2009 по ноябрь 2011, от больных туберкулезом легких, находившихся на лечении в УНИИФ и СОГУЗ ПТД. Все пациенты принадлежали к группе вновь выявленных больных.

Культивирование *M. tuberculosis* проводили на среде Левинштейна – Йенсена. Определение лекарственной чувствительности (ЛЧ) к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП) осуществляли с помощью метода абсолютных концентраций. Мутации, обуславливающие лекарственную устойчивость к рифампицину и изониази-

ду определяли с помощью тест-систем ТБ-Биочип (MDR) производства ООО «Биочип-ИМБ» г. Москва.

Образцы ДНК получали из суспензии чистых культур МБТ в растворе, содержащем 9% NaCl и 20% глицерина, путем инкубации при 98°C - 30 мин.

MIRU-VNTR типирование осуществляли по 15 локусам [10]. Филогенетический анализ изолятов и принадлежность к генетической группе по MIRU-VNTR локусам осуществляли с использованием международной online - базы данных «MIRU-VNTRplus» (<http://www.miru-vntrplus.org>).

У 80(44,9%) изолятов с помощью тест-системы «Амплитуб-Beijing», производства ООО «Синтол» г. Москва и MIRU-VNTR типирования была определена принадлежность к группе «non-Beijing». Для этих изолятов, было выполнено сполитипирование [11].

Сполитип и принадлежность изолятов к генетическому семейству определяли с помощью международной online - базы данных SpoIDB4SITVIT\_WEB ([http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT\\_ONLINE/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/)) и ее обновленной версии SITVIT2 в Институте Пастера Гваделупы, включавшей на момент сравнения около 40 тысяч профилей сполитипирования.

Расчет индекса Хантера-Гастона (HGDI) осуществляли по формуле:

$$HGDI = 1 - \frac{1}{\sqrt{S(S-1)}} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

где S – число групп, на которое данный метод разделяет всю выборку штаммов;  $n_j$  – число штаммов в j-й группе; N – общее число штаммов в исследованной выборке.

## Результаты и обсуждение

По результатам MIRU-VNTR типирования и филогенетического анализа у изолятов, принадлежащих к группе nonBeijing, было определено 64 VNTR профиля, которые представляли в 6 генетических групп: LAM (25) Ural (21) Haarlem (14) Turf (1) S(1), 1 группу не удалось классифицировать с помощью этой базы: Unknown (18). Двадцать восемь изолятов, в том числе, LAM, Ural и Unknown с одинаковыми числовыми профилями VNTR, сгруппированы в 12 кластеров, содержащих по 2-4 изолята в каждом.

Анализ структуры DR области хромосомы, с помощью сполитипирования, позволил выделить 43 сполитипа, представленных 1 - 9 изолятами. Шесть изолятов имели сполитипофили, которые не были представлены в SITVIT. Изоляты различных сполитипов принадлежали к 15 генетическим семействам. Самым многочисленным оказалось семейство H3, объединяющее 22 (27,5%) изолятов, 20 из которых, по данным MIRU-VNTRplus, принадлежали к семейству Ural. Для 10 изолятов принадлежность к генетическому семейству не определена (unknown). Сравнительная оценка результатов типирования с помощью MIRU-VNTRplus и SITVIT представлена в таблице 1.

При анализе ПЦР-профилей (VNTR + сполитип) было выделено 8 групп, включавших по 2 - 3 изолята. Остальные изоляты (63), при наличии идентичных сполитипофилей, могли различаться по числу повторов в 1 - 13 локусах VNTR. Наоборот, в четырех случаях, изоляты с идентичными VNTR-профилями имели различные сполитипы (Таблица 1)

Анализ данных генотипирования и результатов определения мутаций устойчивости к ПТП позволил выявить принадлежность к группе LAM (MIRU-VNTRplus) пяти изолятов, несущих сочетание мутаций katG Ser315-Thr1, inhA\_T15, groB Asp516 - Val. При этом, по данным сполитипирования, 4 изолята (сполитип 252) были отнесены к семейству LAM9 и один изолят (сполитип 496) - к семейству T5\_RUS1. По данным культурального метода, только у этих изолятов наблюдалась одновременная устойчивость к шести противотуберкулезным препаратам: рифампицину, изониазиду, этамбутолу, стрептомицину, канамицину, каприномицину. Интересно отметить, что у 4 изолятов этой группы, в отличие от всех остальных изолятов в локусе MIRU10 было по 2 повтора и у одного 4 повтора.

Среди представителей генетического семейства H3 (Ural согласно MIRU-VNTRplus) был выявлен кластер (сполитип 35), объединяющий 7 изолятов, которые не содержали мутаций устойчивости к рифампицину и изониазиду. По данным MIRU-VNTR типирования, этот кластер характеризуется 8 повторами в локусе QUB 26. Второй кластер этого семейства (сполитип 262), объединял девять изолятов, пять из которых содержали мутации устойчивости к рифампицину и изониазиду, а три только к изониазиду (Таблица 1)

Значение HGDI для MIRU-VNTR типирования составило 0,99, для сполитипирования - 0,97.

По итогам генотипирования группы изолятов non-Beijing с использованием MIRU-VNTR (15 локусов) и сполитипирования дискриминирующая способность обоих методов оказалась сравнима (значения HGI 0,99 и 0,97 соответственно). Однако, в ряде случаев, при идентичных MIRU-VNTR профилям, сполитипофили изолятов различались. Кроме этого, использование двух баз данных позволяет более точно определять принадлежность изолятов к разным генетическим группам (семействам). Так, представители группы Unknown (согласно MIRU-VNTRplus), по результатам сполитипирования были отнесены к генетическим семействам T, T1, T2, T4, T5, T1-RUS2, H3. Большинство изолятов, принадлежащих к группе Ural (95,2% по данным MIRU-VNTRplus), согласно SITVIT2 принадлежали к семейству H3; представители группы LAM были классифицированы как LAM9 (28%), T5\_RUS1 (28%) и остальные изоляты как LAM4, LAM5, T1\_RUS2, T1, T4, S. Группа Haarlem была разделена на T1, X1, H1, H3.

Данные по мутациям устойчивости к ПТП дополняют данные генотипирования. Так, в 4 кластерах из 12 при одинаковых MIRU-VNTR профилях, изоляты различались по наличию и спектру мутаций устойчивости к рифампицину и изониазиду. В группе LAM выявлены

Таблица 1. Сопоставление результатов генотипирования, полученных с помощью онлайн баз данных SITVIT2 и MIRU-VNTRplus.

SITVIT			MIRU-VNTRplus		ЛЧ Блокип	rpoB	katG	InhA		
семейство	Столбчатый	число изолятов	семейство	15 MIRU-VNTR*					число изолятов	
H3	35	7	Ural	13865312243422-	1	RIFs INHs				
				138B53122434323	1	RIFs INHs				
				138B43232434423	2	RIFs INHs				
				138B43242434423	1	RIFs INHs				
				138B43231434422	1	RIFs INHs				
	262	9		128B43232434423	1	RIFs INHs				
				125643242534322	1	RIFr INHr	Ser531-Leu	Ser315-Thr1	T15	
					1	RIFs INHr		Ser315-Thr1	T15	
				127623721434322	1	RIFs INHr		Ser315-Thr1		
				124643121534322	1	RIFs INHs				
				124743231534322	1	RIFr INHr	Met515-Ile	Ser315-Thr1		
					1	RIFs INHr		Ser315-Thr1		
				127943251554322	2	RIFr INHr	Leu511-Pro	Ser315-Thr1		
				124743232534322	2	RIFs INHr		Ser315-Thr1		
				117733141443423	1	RIFr INHr	Ser531-Leu	Ser315-Thr1		
new	1	RIFr INHr	Asp516-Val	Ser315-Thr2						
new	1	RIFs INHs								
50	1	unkno wn	532332341432222	1	RIFs INHs					
294	1	Haarle m	31543343333242-	1	RIFs INHs					
H4	291	1	Ural	138B43112433423	1	RIFs INHs				
LAM4	60	1	LAM	516423523224122	1	RIFs INHs				
LAM9	252	3		626223253221322	1	RIFr INHr	Asp516-Val	Ser315-Thr1	T15	
T5_RUS1	496	1		526223253221322	3	RIFr INHr	Asp516-Val	Ser315-Thr1	T15	
LAM9	252	1				RIFr INHr	Asp516-Val	Ser315-Thr1	T15	
T5_RUS1	254	2		526423243221322		RIFs INHr			G8	
					3	RIFs INHs				
		4		526423223221322	1	RIFs INHs				
				52642324322B422	1	RIFs INHs				
				526323243223122	1	RIFs INHs				
LAM9	42	2		525423252221322	2					
LAM9	150	1		526322243221322	1	RIFs INHs				
				526413163223122	1	RIFs INHr		Ser315-Thr1		
				526422243231322	1	RIFs INHs				
LAM5	1337	2		525432243231322	1	RIFs INHs				
				534422261333222	1	RIFs INHs				
T1_Rus2	280	1	unkno wn	534332341432222	1	RIFs INHs				
	new	1								
unknown	46	3		527434572234222	2	RIFs INHs				
				527534573234222	1	RIFs INHs				
	237	1		535533333332422	1	RIFs INHs				
	3169	1		52443423332242-	1	RIFs INHs				
H1	531	2	Haarle m	527533332334223	1	RIFs INHs				
					537533333334223	1	RIFs INHs			

	47	1	""	435533533362423	1	RIFr INHr	Ser531-Leu	Ser315-Thr1	
X1	708	2		757534333354423	1	RIFs INHs			
	new	1		547534333344423	1	RIFs INHs			
				537532433354423	1	RIFs INHs			
unknown	56	2		53543333334223	1	RIFs INHs			
			TUR	13-43322-42-42-	1	RIFr INHr	Ser531-Leu	Ser315-Thr1	
T1	65	1	Haarlem	4384244333242-	1	RIFs INHs			
	264	1	LAM	526423233224122	1	RIFs INHs			
	1580	1		4384232343253222	1	RIFs INHs			
	2540	1		626423243223122	1	RIFr INHr	Ser531-Leu	Ser315-Thr1	
	732	1	unknow	535332441452222	1	RIFs INHs			
	53	3		43533242127222-	1	RIFs INHs			
				644322251332222	1	RIFs INHs			
			LAM	524423243221322	1	RIFs INHs			
	156	3	unknow	435332341472222	2	RIFs INHs			
	1597	1		435332341482222	1	RIFs INHs			
235332323422222				1	RIFs INHs				
3				RIFs INHr		Ser315-Thr1	T15		
435342642452222				1	RIFs INHs				
unknown	3152	2	545332351332212	2	RIFs INHs				
560	1	LAM	526421244223122	1	RIFs INHs				
			526423243221422	1	RIFr INHr	Ser531-Leu	Ser315-Thr2		
T4	40	2	unknow	334332433432322	1	RIFs INHs			
T	73	1	unknow	525332341541222	1	RIFs INHs			
T5	44	1	unknow	435332441451222	1	RIFs INHr			T15
S	1253	1	S	537341353431232	1	RIFs INHr		Ser315-Thr1	
	new	1	LAM	525413225224122	1	RIFs INHs			

15 MIRU-VNTR\*: MIRU26, MIRU31, QUB26, MIRU10, ETRA, Mtb21, QUB 11b, MIRU40, MIRU16, ETRC, Mtb39, Mtb04, Mtb30, MIRU4, QUB4156.

B – число повторов в локусе > 9

изоляты, содержащие сочетание мутаций устойчивости к изониазиду - katG Ser315-Thr1, inhA\_T15 и рифампицину - groV Asp516 – Val. По данным культурального метода, только у этих изолятов наблюдалась одновременная устойчивость к шести ПТП. Недавно такой же спектр мутаций был выявлен у штаммов LAM в Псковской области.[5]

## Заключение

При проведении молекулярно-эпидемиологических исследований на территории Уральского региона целесообразно использовать два метода ПЦП-типирования: MIRU-VNTR- и сполитотипирование с последующей оценкой генетического родства изолятов с помощью базы данных MIRU-VNTRplus и постоянно обновляемой базы SITVIT2. Дополнительную информацию дает определение спектра мутаций, ассоциированных с устойчивостью изолятов M. tuberculosis к ПТП.

Авторы благодарят NalinRastogin DavidCouvin за обработку данных, присвоение обозначений SIT/MIT и генетических линий, согласно базе данных Института Пастера Гваделупы (InstitutPasteurdelaGuadeloupe) - SITVIT2■

*Умпелева Т.В.*, научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «УНИИФ» Министерства здравоохранения России, г. Екатеринбург; *Вязовая А.А.*, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии ФГУН СПбНИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург.; *Кравченко М.А.*, к.б.н., зав. лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «УНИИФ» Министерства здравоохранения России, г. Екатеринбург.; *Еремеева Н.И.* к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных и диагностических методов исследования ФГБУ «УНИИФ» Министерства здравоохранения России, г. Екатеринбург.; *Нарвская О. В.*, д.б.н., профессор, зав. лаборатории молекулярной микробиологии ФГУН СПбНИИЭМ им. Пастера Роспотребнадзора, г. Санкт-Петербург.; Автор, ответственный за переписку - Умпелева Татьяна Валерьевна, 620039, г. Екатеринбург ул. 22 Партьсезда 50, тел. (343)3334466, tumpelleva@ya.ru

**Литература:**

1. Лац А. А., Жданова С. Н., Огарков О. Б., Алексеева С. И. Лекарственная устойчивость различных генотипов. Известия Иркутского государственного университета 2011; 4(4): 58–62.
2. Шемякин И. Г., Степаншина В. Н., Коробова О. В., Иванов И. Ю., Липин М. Ю. Сплайотипы клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных у больных туберкулезом в Центральном регионе России. Проблемы туберкулеза и болезней легких 2004; 4: 23–27.
3. Черноусова Л. Н., Поспелов Л. Е., Матрашкин А. Г., и соавт. Генотипическая характеристика штаммов *M. tuberculosis*, из республики Тыва. Проблемы туберкулеза и болезней легких 2004; 3: 37–40.
4. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in Russia: in search of informative VNTR loci. J. Clin. Microbiol. 2008; 3576–3584.
5. Вязовая А. А., Журавлев В. Ю., Мокроусов И. В., Оттент Ф., Павлова Е. П., Кришевич В. В., Вишневецкий Б. И., Нарвская О. В. Характеристика штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Псковской области. Журнал микробиологии 2011; 6: 27–31.
6. Kovalev S., Kamaev E., Kravchenko M. et al. Genetic analysis of *mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Ural region, Russian Federation, by MIRU-VNTR genotyping. Int. J. Tuberc. Lung Dis 2005; 9(7): 746–752.
7. 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. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 2607–2618.
8. Cowan, L. S., L. Diem, T. Monson, P. Wand, D. Temporado, T. V. Oemig, and J. T. Crawford. Evaluation of a two-step approach for large-scale, prospective genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. J. Clin. Microbiol. 2005: 688–695.
9. Van Embden J., Cave M., Crawford J. et al. Strain identification on *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 1993; 31: 406–409.
10. Supply P., Allix C., Lesjean S. et al. Proposal for Standardization of Optimized *Mycobacterium* Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 2006: 4498–4510.
11. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 1997; 35(4): 907–14.