

Ю. А. СКИБА<sup>1</sup>, Г. А. ИСМАГУЛОВА<sup>1</sup>, Н. П. МАЛАХОВА<sup>1</sup>,  
Е. С. БЕЛОВА<sup>2</sup>, В. Л. БИСМИЛЬДА<sup>2</sup>, Н. А. АЙТХОЖИНА<sup>1</sup>

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ  
ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ  
*MYCOSAFTERIUM TUBERCULOSIS*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ  
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

(<sup>1</sup>РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина», г. Алматы;

<sup>2</sup>Национальный центр проблем туберкулеза, г. Алматы)

В результате проведенного масштабного MIRU-VNTR генотипирования по 24 локусам, получена информация о молекулярно-генетическом разнообразии штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Казахстан. Создана коллекция ДНК 160 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных от больных легочным туберкулезом из 8 регионов Казахстана. Все использованные в исследовании штаммы были охарактеризованы по устойчивости к рифампицину, изониазиду, этамбутолу и стрептомицину. Среди исследованных изолятов выявлены штаммы относящиеся к семействам Beijing 79.3%, LAM 10.6%, URAL 6.3%, Haarlem 1.9%, NEW-1 1.9%, Cameroon 0.6%, Dehli/CAS 0.6%, TUR 0.6%, а также выявлено новое генетическое семейство обозначенное как KAZ-1 (5%). Было определено, что из 128 клинических изолятов с разными типами устойчивости 99 (77%) имеют генотип Beijing, при этом из них 67 являются мультирезистентными.

Туберкулез является одним из наиболее опасных инфекционных заболеваний человека, передающихся воздушно-капельным путем. Возбудителем этого заболевания являются микобактерии туберкулезного комплекса (МТК), в который входят несколько видов семейства *Mycobacteriaceae*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* и *M. pinnipedii* [1, 2]. Использование различных методов молекулярного генотипирования позволяет проводить генетическую характеристику штаммов, циркулирующих в популяциях, устанавливать их генетические профили, определять их родство и географическое распространение. Все это может иметь исключительное значение при проведении

эпидемиологических мероприятий, направленных на предупреждение новых случаев заболевания.

На сегодняшний день для генотипирования штаммов возбудителей туберкулеза широко применяется несколько молекулярно-биологических методов: IS6110-RFLP, сполиготипирование (spoligotyping) и MIRU-VNTR анализ. Из всех вышеуказанных методов, для исследований нами был выбран MIRU-VNTR, основанный на определении числа tandemных повторов в VNTR (variable number of tandem repeats) локусах генома *M. tuberculosis* [3]. Этот метод является наиболее информативным, имеет высокую дискриминирующую способность, и позволяет проводить идентификацию малокопийных штаммов или

штаммов с низким генетическим разнообразием по сравнению с методом IS6110-RFLP. Результаты анализа MIRU-VNTR имеют числовое значение, что дает возможность проводить статистическую обработку данных, записывать генотип штамма в виде цифрового кода и создавать унифицированные базы данных генотипов изолятов *M. tuberculosis*. Так как данный метод основан на применении ПЦР реакции, он является достаточно быстрым и не требует выделения больших количеств ДНК высокого качества очистки.

В данной статье нами представлены результаты масштабного исследования штаммов *M. tuberculosis*, циркулирующих на территории Республики Казахстан, методом MIRU-VNTR типирования по 24 вариабельным локусам.

**Материалы и методы.** В данной работе использовано 160 клинических изолятов *M. tuberculosis* полученных из Мангистауской, Южно-Казахстанской, Алматинской, Кызылординской, Актюбинской, Акмолинской, Восточно-Казахстанской областей и Семипалатинского региона. Все образцы охарактеризованы по устойчивости к рифампицину, изониазиду, этамбутолу и стрептомицину с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT-960 в микробиологической лаборатории Национального центра проблем туберкулеза Республики Казахстан.

Выделение ДНК из бактериальных культур проводили по стандартной методике W. Somerville с соавт. [4].

Предварительную проверку принадлежности штаммов к определенному виду микобактерий туберкулезного комплекса и одной из трех принципиальных генетических групп (ПГГ 1, 2, 3) осуществляли путем исследования видоспецифичных единичных нуклеотидных замен (SNP) в геноме микроорганизмов методом ПЦР-ПДРФ (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) [5-7].

Молекулярное типирование изолятов *M. tuberculosis* проводили с помощью MIRU-VNTR анализа путем амплификации 24 вариабельных локусов: ETR-A, B, C; MIRU-2, 4, 10, 16, 20, 23, 24, 26, 27, 31, 39, 40; Mtub-04, 21, 29, 30, 34, 39; QUB-11b, 26, 4156 [13]. Анализ продуктов ПЦР осуществляли электрофорезом в 1,5% агарозном геле, с последующей обработкой результатов при помощи системы гель-документирования GelDoc

и программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, США). Оценку соответствия размеров полученных фрагментов числу содержащихся в них повторов проводили согласно P. Supply [8].

Оценка дискриминирующей способности MIRU-VNTR анализа и аллельного разнообразия проводилась на основании индекса Хантера – Гастона (HGI) [9]. Статистический и филогенетический анализ, с последующей визуализацией полученных данных, а также идентификацию штаммов и генетических семейств, к которым они принадлежат, проводили при помощи онлайн базы данных MIRU-VNTRplus, содержащей MIRU-VNTR профили микобактерий, идентифицированных в различных странах мира [10]. Филогенетическое древо было построено методом UPGMA.

**Результаты и обсуждение.** В ходе исследования нами была создана коллекция ДНК 160 клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в период с 2007 по 2008 годы от больных легочным туберкулезом из разных регионов Казахстана. Коллекция была сформирована на основании результатов анализа устойчивости культур к основным препаратам противотуберкулезной терапии и включала преимущественно образцы, выделенные из устойчивых культур.

Анализ коллекции изучаемых изолятов показал высокий уровень (48,8%) множественной лекарственной устойчивости (мультирезистентность, МЛУ), то есть устойчивости штаммов к нескольким препаратам, среди которых одновременно присутствуют изониазид и рифампицин. В целом, устойчивость к одному и более препаратам первого ряда была определена для 128 (80%) клинических изолятов. При этом резистентными к изониазиду оказалось 107 образцов, к рифампицину 83, стрептомицину 122, этамбутолу 73. Так же было выявлено 15 монорезистентных штаммов и 55, имеющих устойчивость ко всем четырем антимикробным препаратам.

Для установления принадлежности исследуемых штаммов к определенным генетическим семействам микобактерий туберкулезного комплекса, а так же выяснения доли участия каждого из них в формировании высокого уровня МЛУ на территории Республики Казахстан, нами было проведено молекулярное генотипирование методами ПЦР-ПДРФ и MIRU-VNTR.

Анализ нуклеотидных замен в локусах gyrB676, gyrB756, gyrB1311, gyrB1410, gyrB1450 и katG463 методом ПЦР-ПДРФ, позволил исключить принадлежность исследуемых образцов к *M.microti*, *M.pinnipedii*, *M.africanum*, *M.bovis* и *M.caprae*. По результатам данного анализа 113 штаммов могли относиться к виду *M.canettii* или генотипу Beijing *M.tuberculosis*. Сорок семь образцов

были однозначно идентифицированы как *M.tuberculosis*.

MIRU-VNTR анализ с использованием 24 вариабельных локусов позволил определить генетические профили исследуемых изолятов. Выявленные аллельные варианты и индекс разнообразия для каждого локуса представлены в табл. 1.

Таблица 1. Аллельное разнообразие 24-х VNTR локусов казахстанских штаммов *M.Tuberculosis*

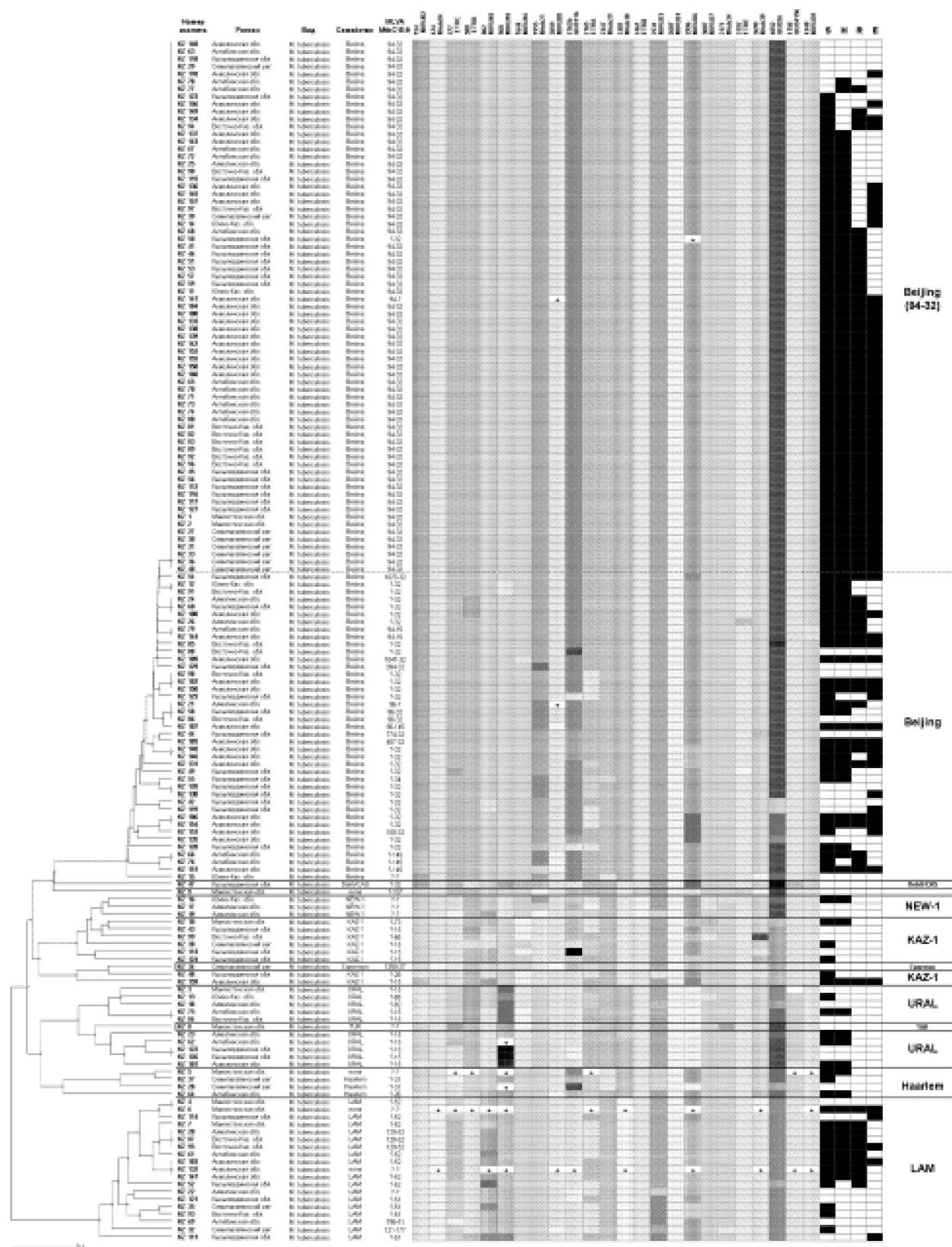
VNTR локус	Альтернативное название	Количество аллелей	Количество повторов	Аллельное разнообразие (HGI)
154	MIRU02	2	1-2	0,20
424	Mtub04	5	1-5	0,38
577	ETRC	4	2-5	0,32
580	MIRU04; ETRD	4	1-4	0,03
802	MIRU40	6	2-7	0,38
960	MIRU10	8	2-7, 9-11	0,40
1644	MIRU16	4	1-4	0,22
1955	Mtub21	7	1-7	<b>0,53</b>
2059	MIRU20	2	1-2	0,10
2163b	QUB11b	8	1-6, 8, <b>22</b>	<b>0,52</b>
2165	ETRA	4	1-4	0,40
2347	Mtub29	3	2-4	0,04
2401	Mtub30	4	1-4	0,34
2461	ETRB	3	1-3	0,04
2531	MIRU23	5	2-6	0,13
2687	MIRU24	1	1	0
2996	MIRU26	8	0-7	0,41
3007	MIRU27; QUB5	3	2-4	0,06
3171	Mtub34	3	2, 3, 5	0,03
3192	MIRU31; ETRE	4	2-5	<b>0,47</b>
3690	Mtub39	5	1-4, 8	0,27
4052	QUB26	8	3-10	<b>0,47</b>
4156	QUB4156	4	0, 2-4	0,16
4348	MIRU39	2	2-3	0,41

Наибольший индекс разнообразия (HGI) в данном исследовании был отмечен для локусов Mtub21 (0,53), QUB11b (0,52), MIRU31 (0,47) и QUB26 (0,47). Невысокие значения HGI для данной выборки из 160 казахстанских изолятов объясняются значительной мономорфностью популяции. Это становится очевидным из результатов VNTR анализа, поскольку 69 изолятов имеют идентичные генетические профили по всем 24 локусам и еще 53 штамма являются им подобными.

В ходе анализа амплифицированных фрагментов локуса QUB11b для образца KZ\_113 был выявлен неизвестный ранее аллельный вариант, содержащий 22 повтора. Для изолятов KZ\_21, KZ\_28, KZ\_50, KZ\_62 KZ\_141 было определено наличие в некоторых локусах двойных аллель-

ных вариантов (рисунок). Также двойные аллели были обнаружены в 6-10 локусах изолятов KZ\_5, KZ\_6, KZ\_132, что свидетельствует о присутствии генотипов двух различных микроорганизмов в каждом из этих образцов. Случай таких «двойных инфекций» отмечались ранее другой группой исследователей при анализе казахстанских изолятов методами сполиготипирования и IS6110-RFLP в 2001 году [11].

Полученные VNTR профили всех 160 штаммов были проанализированы при помощи интернет базы данных MIRU-VNTRplus. По номенклатуре MLVA MtbC15-9 полностью идентифицированы 14 ранее известных генотипов и присвоены соответствующие номера 86 штаммам. Для других 65 образцов генетические профили совпадали с известными частично и обозначены лишь



## Результаты MIRU-VNTR и типирования 160 клинических изолятов

Количество повторов в 24 MIRU локусах обозначено цветом от белого к темно-серому. Устойчивость к стрептомицину (S), изониазиду (H), рифампицину (R) и этамбутолу (E) показана черными ячейками

половиной составного номера либо MtbC15, либо MtbC9. Профили 6 штаммов оказались уникальными, не представленными ранее в базе данных. Три изолятов идентифицировать не удалось из-за наличия двойных генетических профилей. Все впервые выявленные генотипы, включая частично идентифицированные, были зарегистрированы нами в глобальной базе данных.

В результате сопоставления полученных нами данных с базой MIRU-VNTRplus и проведенного филогенетического анализа были идентифицированы следующие генетические семейства: Beijing (112 штаммов), LAM (17), URAL (10), Haarlem (3), Cameroon (1), Dehl/CAS (1), NEW-1 (3), TUR (1). Установить принадлежность 4 изолятов не удалось. При построении UPGMA – древа, включающего профили 160 казахстанских изолятов и 186 референтных, был выявлен кластер, образованный группой из 8 казахстанских штаммов. На основании характерного сходства профилей по ряду локусов эта группа была условно обозначена как KAZ-1.

Особого внимание среди прочих результатов исследования заслуживают данные, касающиеся штаммов генотипа Beijing. Нами было установлено, что из 160 проанализированных изолятов 112 (70%) являются представителями семейства Beijing, а 69 (43%) из них имеют абсолютно идентичный генетический профиль 94-32 (по номенклатуре MtbC15-9) (рисунок 1). Также результаты исследования демонстрируют широкое распространение штаммов данного семейства и, в частности, вариант 94-32 на всей территории Казахстана. Кроме того, из 77 образцов, определенных как МЛУ, 67 штаммов (87%) имеют генотип Beijing, из которых профиль 94-32 характерен для 47 (61%). Всего было отмечено, что из 128 клинических изолятов с разными типами устойчивости 99 (77%) относятся к генетическому семейству Beijing.

Таким образом, в данной работе методом MIRU-VNTR нам удалось подтвердить, что штаммы *M.tuberculosis* генотипа Beijing не только широко распространены и являются доминирующими на территории Республики Казахстан, но и в значительной степени ассоциируются с лекарственной устойчивостью. Кроме того, по результатам MIRU-VNTR анализа нами были определены не известные ранее аллельные варианты и генетические профили *M.tuberculosis*,

а так же выделено новое генетическое семейство KAZ-1.

Все полученные в ходе данного исследования результаты были занесены в созданную нами информационную базу данных, которая будет пополняться и использоваться для молекулярно эпидемиологического мониторинга штаммов *Mycobacterium tuberculosis* циркулирующих на территории Республики Казахстан.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Aranaz A., Liebana E., Gomez-Mampaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., Blazquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G., Dominguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. Caprae subsp.nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49, N 3. P. 1263-1273.
2. Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodriguez D., Loureiro J., Romano M. I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1305-1314.
3. Supply P., Lesjean S., Savine E., Kremer K., van Soo-lingen D., Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units // J. Clin. Microbiol. 2001. V. 39. P. 3563-3571.
4. Somerville W., Thibert L., Schwartzman K., Behr M. A. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 2996-2997.
5. Niemann S., Harmsen D., Rusch-Gerdes S., Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gvrB DNA sequence polymorphism analysis // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. P. 3231-3244.
6. Cockerill F.R. 3rd, Uhl J.R., Temesgen Z., Zhang Y., Stockman L., Roberts G.D., Williams D.L., Kline B.C. Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance // J. Infect Dis. 1995. V. 171. P. 240-245.
7. 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. V. 94. P. 9869-9874.
8. Supply P. MIRU-VNTR typing manual. Institut Pasteur de Lille, France. 2005.
9. Hunter P.R., Gaston M.A. Numeral index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // J. Clin. Microbiol. 1988. V. 26. P. 2465-2466.
10. Allix-Beguec C., Harmsen D., Weniger T., Supply P., Niemann S. Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // J. Clin. Microbiol. 2008. V. 46(8). P. 2692-2699.

11. Kubica T., Agzamova R., Wright A., Aziz M.A., Rakishov G., Bismilda V., Richter E., Rusch-Gerdes S., Niemann S. The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan // Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2005. V. 9(6). P. 1161-1167.

### Резюме

Зерттеу нәтижесінде 24 локус бойынша ауқымды MIRU-VNTR генотиптеу жүргізілп, Қазақстан Республикасының аумағында таралған *Mycobacterium tuberculosis* штамдарының молекулярлық-генетикалық әртүрлілігі туралы ақпарат алынды. Қазақстанның 8 аймағынан өкпе туберкулезімен ауыратын адамдардан бөлініп алынған *M.tuberculosis* изоляттарының 160 клиникалық түрінін ДНК коллекциясы жасалды. Зерттеуге қолданылған барлық штамдар рифампицинге, изониазидке, этамбутолға және стрептомицинге тәзімділігі бойынша сипатталды. Зерттелген изоляттар арасынан Beijng тұқымдастарына жататын 79.3%, LAM 10.6%, URAL 6.3%, Haarlem 1.9%, NEW-1 1.9%, Cameroon 0.6%, Dehli/CAS 0.6%, TUR 0.6% штамдар анықталды, сонымен қоса KAZ-1 (5%) дег

белгіленген жана генетикалық тұқымдас анықталды. Тәзімділігі өртүрлі 128 клиникалық изоляттар арасынан Beijng генотипі 99 (77%). Оның ішінде 67 мультирезистентті екені анықталды.

### Summary

The results of genetic diversity research of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in the Republic of Kazakhstan are given in the article, based on the high-scale MIRU-VNTR genotyping of 24 loci. A collection of 160 DNA samples, isolated from clinical material of pulmonary tuberculosis patients from 8 regions of Kazakhstan, was created. All strains were classified based on their resistance to rifampicin, isoniazid, ethambutol and streptomycin. Among characterized isolates 79.3% belonged to Beijing family, 10.6% - to LAM family, 6.3% - to URAL, 1.9% - to Haarlem, 1.9% - to NEW-1, 0.6% - to Cameroon, 0.6% - to Dehli/CAS, 0.6% - to TUR. Furthermore, we identified a new strain coded hereafter as KAZ-1 found in 5% of studied samples. Out of 128 tested strains with different drug resistance capability 99 strains (77%) have shown Beijing genotype, 67 of them were multi-resistant to tested drug array.