

УДК 577.29: 579.252.2

Ю.А. СКИБА¹, Г.А. ИСМАГУЛОВА¹, И.А. АХМЕТОЛЛАЕВ¹,
Н.П. МАЛАХОВА¹, Е.С. БЕЛОВА², В.Л. БИСМИЛЬДА², Н.А. АЙТХОЖИНА¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ КАЗАХСТАНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *MYSOBACTERIUM TUBERCULOSIS* И ОЦЕНКА ДОЛИ УЧАСТИЯ ШТАММОВ ПРЕОБ- ЛАДАЮЩИХ ГЕНОТИПОВ В ФОРМИРОВАНИИ ВЫСОКОГО УРОВНЯ ЛЕКАР- СТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ

При исследовании генетического разнообразия популяции *M. tuberculosis* в Республике Казахстан методом MIRU-VNTR типирования по 24 локусам выявлено доминирование штаммов семейства Beijing. По результатам типирования определен 71 генотип, 15 кластеров, включающих более одного изолята, для которых также определены генетические семейства и присвоены номера по номенклатуре MLVA MtbC15-9. Анализ распределения лекарственной устойчивости по ветвям филогенетического дерева выявил 2 кластера, образованных семействами Beijing и LAM, в которых множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) встречалась значительно чаще, чем среди других штаммов в выборке. Широкое распространение генотипа Beijing 94-32, обладающего МЛУ, позволяет предполагать преобладание в популяции типа инфицирования первично устойчивым возбудителем туберкулеза. Присутствие данного генотипа во всех областях доказывает, что этот штамм уже давно и повсеместно «расселился» на территории РК.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в 2009 году заболеваемость туберкулезом в Республике Казахстан составила 105,5 случаев на 100 тыс. населения, а смертность – 12,5 человек на 100 тыс. населения, что свидетельствует о снижении уровня заболеваемости туберкулезом в республике на 16,1 % и смертности на 26,1% по сравнению с показателями 2008г. Однако, несмотря на некоторое снижение этих показателей, на сегодняшний день Республика Казахстан остается в числе стран с высоким уровнем заболеваемости туберкулезом. При этом особое опасение вызывает тот факт, что наряду с простыми формами туберкулеза, распространенными на территории РК, в настоящее время выявлены штаммы *M. tuberculosis*, устойчивые к одному или нескольким лекарственным средствам, применяемым в химиотерапии (ЛУ-ТБ) [1].

По данным Национального центра проблем туберкулеза РК среди всех выявляемых случаев доля больных с лекарственной устойчивостью (ЛУ) составляет 63,7%, из которых 18,5% – первично выявленные случаи, а 45,2% – повторные. Особое внимание вызывают штаммы *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ), а также штаммы микобактерий с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ-ТБ). По определению, принятому Глобальной целевой группой ВОЗ по ШЛУ-ТБ в октябре 2006 года, МЛУ-ТБ является особой

формой туберкулеза, которая развивается в случае резистентности микобактерий, как минимум, к двум основным противотуберкулезным препаратам – изониазиду и рифампицину. ШЛУ-ТБ является формой туберкулеза, при которой в дополнение к лекарственной устойчивости, свойственной для МЛУ-ТБ, наблюдается резистентность ко всем фторхинолонам и к одному из трех инъекционных лекарств второй линии (капреомицину, канамицину или амикацину) [2]. По данным ВОЗ среди всех случаев заболевания туберкулезом выявлено полмиллиона случаев заболевания с МЛУ-ТБ, включая 50 000 случаев заболевания ШЛУ-ТБ [3]. Устойчивость к лекарственным средствам возникает при неправильном применении антибиотиков во время лечения пациентов с первоначально чувствительными к лекарственным формами туберкулеза. Распространение ЛУ-ТБ, передающегося воздушно-капельным путем и с трудом поддающегося лечению, представляет серьезную угрозу в борьбе с заболеванием и требует использования новых подходов в диагностике мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis*.

Использование новых молекулярно – генетических методов для диагностики и эпидемиологических исследований позволяет идентифицировать клинически важные штаммы, характеризующиеся повышенной трансмиссионностью и устойчивостью к современным лекарственным средствам, применяемым для лечения туберку-

леза. С помощью этих методов стало возможным проведение разностороннего генотипирования штаммов *M. tuberculosis*, определение генетических факторов, приводящих к появлению новых штаммов с признаками множественной и широкой лекарственной устойчивости, выявление очагов инфекции и области их распространения.

Целью данного исследования являлась идентификация генетических семейств и отдельных генотипов МТК, циркулирующих на территории Казахстана, и анализ взаимосвязи наиболее распространенных генотипов с высоким уровнем лекарственной устойчивости.

Материалы и методы

В данной работе использовано 160 клинических изолятов *M. tuberculosis*, выделенных из образцов мокроты больных туберкулезом легких 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 референс бактериологической лаборатории Национального центра проблем туберкулеза Республики Казахстан. Выделение ДНК из бактериальных культур проводили согласно протоколу W. Somerville [4].

MIRU-VNTR типирование изолятов *M. tuberculosis* проводили по 24-м вариабельным локусам: 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. Прямые и обратные праймеры для всех 24 локусов были синтезированы в соответствии с последовательностями, приведенными в методическом руководстве P. Supply [5]. Анализ продуктов ПЦР осуществляли электрофорезом в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в трис-бортатном буферном растворе в течение 60 мин при 100 В. Результаты электрофоретического разделения ампликонов обрабатывали при помощи системы гель-документирования GelDoc и программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad, США). Оценку соответствия размеров, полученных ПЦР фрагментов числу содержащихся в них повторов, проводили согласно P. Supply [5]. Генотип каждого штамма отображали как набор из 24-х цифр, где каждая цифра 24-значного номера обозначает

число копий соответствующего tandemного повтора.

Оценка дискриминирующей способности MIRU-VNTR анализа и аллельного разнообразия проводилась на основании индекса Хантера – Гастона (HGI) [6]. 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]. Кластерный анализ с построением дерева филогenetического родства проводили с использованием критерия UPGMA.

Результаты и обсуждение

Коллекция ДНК 160 исследуемых изолятов была собрана в 2007 году от впервые выявленных больных легочным туберкулезом и включала преимущественно образцы, выделенные из устойчивых культур. Однако, для получения репрезентативных результатов отбор изолятов в каждом из регионов носил случайный характер, а соотношение количества образцов, полученных из разных областей, в данной выборке приблизительно было равно соотношению всех новых случаев, выявляемых в этих регионах, на 100 тысяч населения.

Характеристика спектра лекарственной устойчивости культур *M. tuberculosis*, использованных в данном исследовании, приведена в таблице 1. Наибольший интерес с клинической точки зрения представляют мультирезистентные изоляты и образцы, для которых была определена устойчивость ко всем четырем антимикробным препаратам. Нас интересовало, является ли выборка лекарственно устойчивых штаммов, циркулирующих в казахстанской популяции, генетически однородной. В этом случае можно было бы предположить основной причиной МЛУ – вариант инфицирования первично резистентными микобактериями. И, напротив, если уровень генетического разнообразия популяции окажется достаточно высоким, то причиной МЛУ, в большинстве случаев, может являться селекция мутантных микобактерий, возникающих в результате лечения больного.

Для оценки генетического разнообразия популяции *M. tuberculosis* коллекция ДНК была проанализирована методом MIRU-VNTR-типи-

Таблица 1. Анализ устойчивости исследуемых изолятов к основным противомикробным препаратам

Устойчивость	Количество	%
Всего проанализировано	160	100
Чувствительных	32	20
Всего устойчивых	128	80
Любой тип, включая стрептомицин (SM)	122	76,3
Любой тип, включая изониазид (INH)	107	66,9
Любой тип, включая рифамицин (RMP)	83	51,9
Любой тип, включая этамбутол (EMB)	73	45,6
Всего монорезистентных	15	9,4
Только SM	9	5,6
Только INH	1	0,6
Только RMP	-	-
Только EMB	5	3,1
Мультирезистентные (INH+RMP)	77	48,1
SM + INH + RMP + EMB	55	34,4
Полирезистентные (любые комбинации кроме INH+RMP)	35	21,9

рования по 24 вариабельным локусам. Полученные результаты типирования были обработаны при помощи международной базы данных MIRU-VNTRplus. По результатам анализа генетических профилей исследуемых изолятов было построено филогенетическое древо с использованием критерия UPGMA. Выявлен 71 генотип, 15 кластеров, включающих более одного изолята, а также определены их генетические семейства и присвоены номера по номенклатуре MLVA MtbC15-9 для уже известных генетических профилей (рисунок 1). Всего кластеризовано 65 % изолятов. Самый большой кластер содержал 69 штаммов и имел генетический профиль, характерный для семейства Beijing.

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 казахстанских изолятов объясняются значительной мономорфностью популяции.

В ходе исследования среди изучаемых изолятов были идентифицированы следующие генетические семейства: Beijing (112 штаммов), LAM (17), URAL(10), Haarlem (3), Cameroon (1), Dehli/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 сходства профилей по ряду локусов эта группа была условно обозначена как KAZ-1 (рисунок 1).

Анализ лекарственной устойчивости штаммов различных генотипов показал ее неравномерное распределение по ветвям филогенетического дерева. Были выявлены 2 кластера, в которых встречаемость случаев с множественной лекарственной устойчивостью заметно отличалась от встречаемости МЛУ среди остальных штаммов в выборке. Первый из них был образован семейством Beijing. Из 77 образцов, определенных в выборке как МЛУ, 67 штаммов (87%) имеют генотип Beijing, из которых генетический профиль 94-32 характерен для 47 (61%). Обращает на себя внимание тот факт, что из 128 клинических изолятов с разными типами устойчивости 99 (77%) относятся к генетическому семейству Beijing. В результате проведенного типирования установлено, что штаммы данного семейства и, в частности, генотип 94-32 получили широкое распространение по регионам Казахстана.

Второй кластер, для которого отмечена встречаемость МЛУ, образован штаммами семейства LAM. Особенно любопытным оказался тот факт, что в данной группе наличие МЛУ было ассоциировано с присутствием аллельного варианта, равного 4 повторам в локусе Mtub-04. Но, к сожалению, проверить это пока не удалось, поскольку количество LAM изолятов в выборке слишком мало.

В результате проведенного анализа были выявлены случаи совпадения генотипа, профиля лекарственной устойчивости и региона, в котором была получена культура. Вероятно, эти случаи можно рассматривать как результат недав-

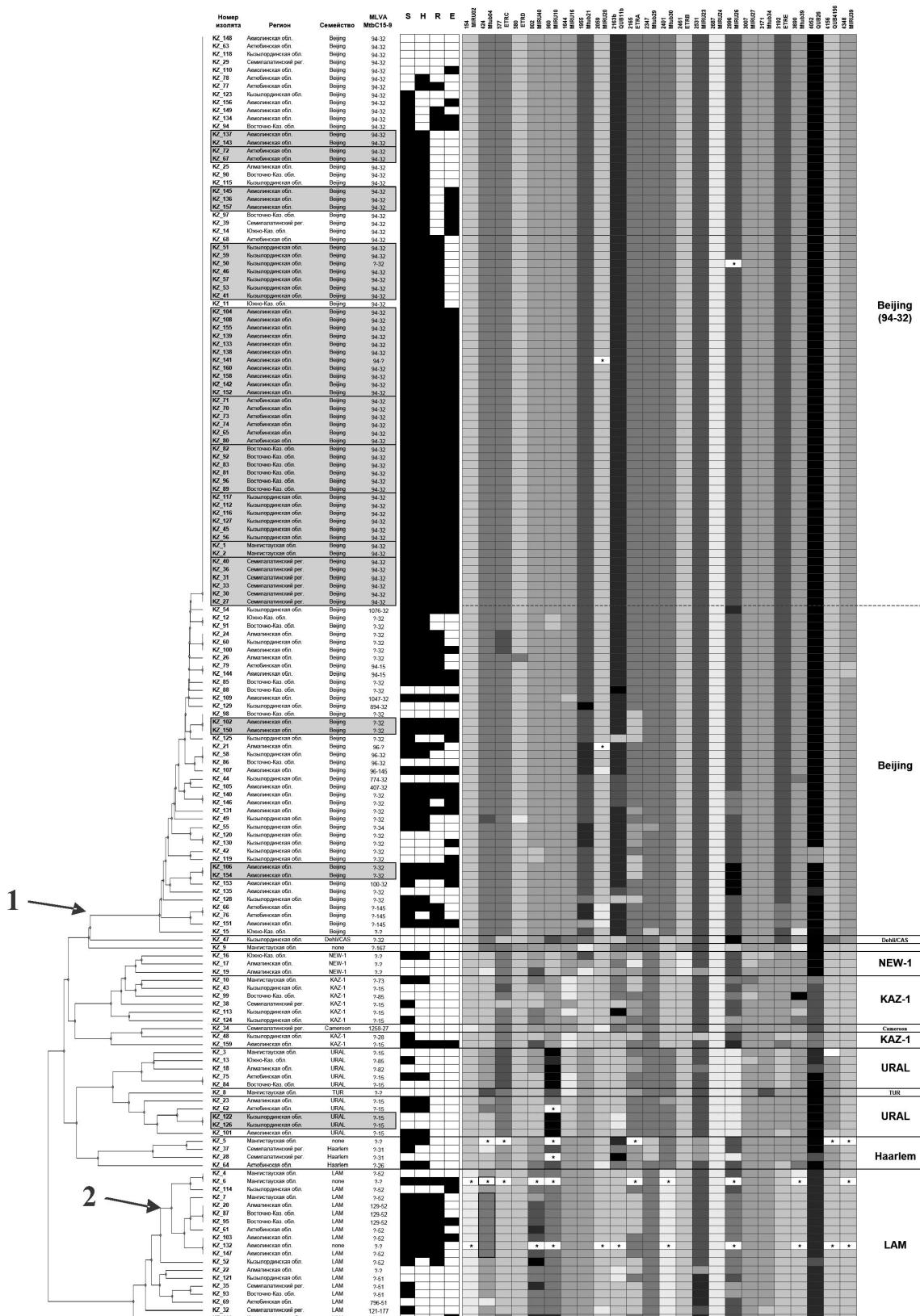


Рис. 1. Результаты MIRU-VNTR типирования 160 клинических изолятов

Количество повторов в 24-х MIRU-локусах обозначено цветом от белого к темно-серому.

Устойчивость к стрептомицину (S), изониазиду (H), рифампицину (R) и этамбутолу (E) показана черными ячейками.

Изолят, для которых совпали генотип, регион и профиль ЛУ, обозначены серыми прямоугольниками

ней передачи возбудителя от одного из больных другому, либо как случаи их заражения от общего источника. Также были выявлены кластеры с одинаковыми VNTR-профилями и местом проживания больного, но с отличающимися профилями устойчивости. Такие случаи могут являться фрагментами эпидемиологических цепочек с постепенным возникновением ЛУ в ходе селекционного процесса, имеющего место при нарушении больным схемы антибиотикотерапии. Однако, для того чтобы проследить в полной мере пути распространения этих штаммов при эпидемиологических исследованиях, для проведения MIRU-VNTR-типовирования необходимо формировать выборку из большего числа изолятов каждого конкретного региона. Кроме того, учитывая преобладание некоторых генотипов в казахстанской популяции и, как следствие, ее генетическую однородность, необходимо также учитывать дополнительную информацию, включающую спектр ЛУ, место проживания больного и др. Также в некоторых случаях целесообразно использование MIRU-VNTR в комбинации с другими методами типирования, основанными на иных системах маркеров.

Таким образом, при исследовании генетического разнообразия популяции *M. tuberculosis* в Республике Казахстан было выявлено доминирование штаммов семейства Beijing. Было показано, что доля Beijing изолятов в нашем исследовании составила 70%. Среди них выявлена высокогомологичная группа, ассоциированная с встречаемостью в ней мультирезистентности. Широкое распространение в популяции генотипа Beijing 94-32, обладающего МЛУ, позволяет предполагать, что в данном случае мы имеем дело с вариантом инфицирования первично устойчивым возбудителем туберкулеза, который давно и повсеместно «расселился» на территории РК. На основании полученных данных представляется возможным, используя комбинацию генетических маркеров, обладающих наибольшей дискриминирующей способностью, ускоренно выявлять потенциально опасные штаммы, ассоциированные с МЛУ. Все это может послужить в дальнейшем созданию диагностических подходов и тест-систем, результаты которых станут основанием для назначения пациенту схемы лечения против лекарственно-устойчивого туберкулеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Официальный сайт Министерства Здравоохранения РК <http://www.mz.gov.kz/>

2. Глобальная целевая группа ВОЗ по ШЛУ-ТБ, октябрь 2006 года: выводы и рекомендации. <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np29/tu/index.html>

3. ВОЗ Резолюция WHA 62.15. «Профилактика туберкулеза со множественной лекарственной устойчивостью и туберкулеза с широкой лекарственной устойчивостью и борьба с ним». Документы WHO/HTM/TB/2008.394.

4. Somerville W., Thibert L., Schwartzman K., and Behr M.A. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a question of containment // J. Clin. Microbiol. 2005. Vol. 43. P. 2996-2997.

5. Philip Supply. MIRU-VNTR typing manual. Institut Pasteur de Lille, France. 2005.

6. Hunter P.R., and Gaston M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity // J.Clin. Microbiol. 1988. Vol. 26. P. 2465 – 2466.

Summary

As the result of research of genetic diversity of *M. tuberculosis* population in the Republic of Kazakhstan using MIRU-VNTR typing on 24 loci the domination of Beijing family strains (70%) was identified. Using these results 71 genotype, 15 clusters including more than one isolate were defined; for the latter genetic families were identified and numbers according to MLVA MtbC15-9 nomenclature were given. Analysis of medicinal resistance distribution in the branches of phylogenetic tree elucidated 2 clusters formed by Beijing and LAM families, in which multidrug resistance (MDR) was recorded considerably more often than among other strains in the sample. The wide distribution of Beijing 94-32 genotype which possesses MDR allows suggesting that the type of infection by initially resistant tuberculosis agent is dominating in the population. Presence of the given genotype in all the regions proves that this strain has spread everywhere in Kazakhstan a long time ago.

Резюме

Қазақстан Республикасындағы *M. tuberculosis* популяцияларының генетикалық әртүрлілігін 24 локус бойынша MIRU-VNTR типке бөлу әдісі бойынша зерттеудің нәтижесінде Beijing (70%) тұқымдастырының басым болғаны анықталды. Типке бөлу нәтижесі бойынша 71 генотип, құрамында біреуден жоғары изоляттар бар 15 кластерлер, генетикалық тұқымдастар анықталып MLVA MtbC15-9 номенклатурасы бойынша нөмірлер берілді. Дәрілік тәзімділіктің таралуын филогенетикалық дінгек-тің тармақтары бойынша талдау нәтижесі Beijing және LAM тұқымдастарынан қураған 2 кластерді анықтады. Бұл тұқымдастарда дәрілік тәзімділіктің көптегін басқа штамдарға қарағанда айтарлықтай жиі кездескен. Дәрілік тәзімділіктің көптегімен ерекшеленген Beijing 94-32 гено-типінің кең көлемде таралуы, туберкулез қоздырыштарына бастапқы тәзімді популяцияларды болжауға мүмкіндік береді. Барлак облыстарда аталған штамның кездесуі КР аумағында бұрыннан тұтастай «мекендерегенің» дәлелдейді.

¹РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожсина», Алматы;

²Национальный центр проблем туберкулеза, Алматы

Поступила 21.09.2010 г.